

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES ET STRESS
ENVIRONNEMENTAUX DANS LES CŒLOMOCYTES
D'ÉCHINODERMES DU SAINT-LAURENT**

Thèse présentée

à l'Université du Québec à Rimouski

dans le cadre du programme de doctorat en océanographie

pour l'obtention du grade de philosophiae doctor ès sciences (PhD. Sc)

PAR
ÉMILIE DOUSSANTOUSSE

Dépôt final
Février 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

Composition du jury :

Karine Lemarchand, présidente du jury, ISMER-UQAR

Émilien Pelletier, directeur de recherche, ISMER-UQAR

Lucie Beaulieu, codirectrice de recherche, UQAR

Peter Campbell, examinateur externe, INRS-ETE

Dépôt initial le 5 octobre 2011

Dépôt final le 6 février 2012

REMERCIEMENTS

Un doctorat c'est aussi un travail d'équipe. J'ai eu la chance de travailler avec des personnes extraordinaires. Je ne pourrais pas citer toutes les personnes qui m'ont, de près ou de moins près, aidé à cheminer au travers de cette thèse. Mais voici.

J'aimerais remercier sincèrement mon directeur de recherche, Émilien Pelletier. Émilien, tu es un professeur et un chercheur exceptionnel qui sait passer sa passion pour la recherche. Merci de tout mon cœur pour ton soutien scientifique, moral, et financier. Ta bonne humeur, tes corrections, ton enthousiasme, tes encouragements et ta patience m'ont permis de passer au travers de ces quelques années de doctorat, pas toujours faciles.

Je tiens également à remercier ma co-directrice de recherche, Lucie Beaulieu. Merci Lucie pour ton soutien scientifique, tes corrections, tes questions mais aussi pour ton soutien moral, tes encouragements, ta patience également. Merci d'avoir été si enthousiaste quand Émilien et moi t'avons présenté le projet. Je suis très fière d'être ta première étudiante et ton amie.

Je remercie également chaleureusement mon jury de thèse, Karine Lemarchand et Peter Campbell. Merci d'avoir pris le temps de me lire, de me pousser dans la réflexion à chacune de nos rencontres ainsi que pour vos encouragements.

J'aimerais également remercier Réjean Tremblay. Merci Réjean d'avoir été si enthousiaste à l'idée d'une expérience sur l'acclimatation des échinodermes ! Ta patience, ta pédagogie m'ont fait découvrir un domaine fascinant. Merci pour tes corrections également et ton expertise au labo pendant les expériences. Ta bonne humeur et ton enthousiasme sont tellement contagieux.

Je tiens particulièrement à remercier Claude Belzile, Richard Saint-Louis, Fabrice Pernet, Claude Pelletier, Louis-Charles Rainville, Jacinthe Thibodeau, Khalida Békri, Jean Mamelona et Ahmed Siah pour leurs corrections, leurs encouragements, leurs conseils,

leurs explications. Merci à vous tous pour les questions que vous m'avez posée et qui ont aidées ma réflexion.

Dans mon équipe, j'ai aussi mes deux amours. Merci Stéphane d'avoir accepté mes multiples allers-retours entre Montréal et Rimouski pour que je puisse compléter ma thèse. Merci de m'avoir poussée, soutenue, encouragée. Merci Alexandre d'avoir regardé ta maman partir tant de fois en m'envoyant simplement un baiser volant. Merci mes amours de m'avoir partagée avec la recherche.

Dans mon équipe, j'ai également le personnel extraordinaire de l'UQAR. Merci à vous, personnel technique et administratif de l'ISMER, professeurs de l'ISMER, de la bibliothèque, du service aux étudiants. Merci du dévouement que vous avez, de l'énergie que vous transmettez, de toutes les petites tapes dans le dos que vous donnez aux étudiants. Alors merci, Marielle, Sylvie, Nycole, Jocelyne, Jean-François, Jean-Claude, Gilles, Ghislain, Sylvain, Gervais, Dominique, Pascal, Mélanie, Rachel, Marcelle, Mildred, Annie.

Je suis très chanceuse d'avoir été entourée de personnes aussi bienveillantes. Je remercie également sincèrement ma famille et mes amis pour leur soutien moral et leurs encouragements infailibles. Je voudrais remercier particulièrement Laure qui m'a accueillie à chacun de mes passages à Rimouski et qui a, spontanément, fait de son chez elle un peu de mon chez moi.

Pour terminer, je remercie vraiment beaucoup l'ISMER, Québec-Océan, la Fondation Gaspésie les îles et Toxcéan, pour le soutien financier que j'ai reçu. Merci aussi d'avoir fait parti de mon équipe.

RÉSUMÉ

Tous les organismes vivants ont la capacité de se débarrasser, dans une certaine mesure, des molécules toxiques grâce à leur système de biotransformation. Le mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR) permet d'expulser les molécules indésirables avant la biotransformation (phase 0) ou après (phase III). Il s'agit d'un véritable mécanisme de protection cellulaire de première ligne. Les mélanges toxiques de contaminants présents dans l'environnement peuvent compromettre ce mécanisme de défense lorsqu'ils interfèrent avec le transport de molécules indésirables par les protéines MXR. Dans ce cas, ils permettent aux substances toxiques normalement expulsées de s'accumuler dans la cellule. Les échinodermes de notre écosystème froid du Saint-Laurent ont un rôle écologique très important à jouer et peu d'études sont disponibles sur leur physiologie et leur toxicologie. Étant donné l'intérêt et l'importance des cœlomocytes autant pour l'organisme (système circulatoire responsable, entre autres, du système immunitaire) que pour l'écotoxicologue (outils potentiels d'évaluation de la santé d'une population), nous avons étudié la résistance aux xénobiotiques dans ces cellules. L'objectif général de ce projet était d'étudier le mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques dans les cœlomocytes de l'étoile de mer polaire *Leptasterias polaris*, de l'oursin vert *Strongylocentrotus dræbachiensis* et du concombre de mer commun *Cucumaria frondosa*. Nous avons aussi relié l'activité MXR avec les stress environnementaux que sont la température et les contaminants.

Dans un premier temps, nous avons pu établir la présence d'un mécanisme de protection cellulaire (MXR) dans les cœlomocytes de *L. polaris*, de *S. dræbachiensis* et de *C. frondosa*. Les résultats nous indiquent qu'il y a très probablement un transporteur de la famille des protéines associées à la résistance multiple (MRPs) et qu'au moins une deuxième protéine MXR est présente, peut être une P-glycoprotéine (Pgp). Nous avons utilisé deux méthodes de mesure. La première méthode en cytométrie en flux a donné d'excellents résultats et nous a amené à poser l'hypothèse qu'une protéine de type MRPs était probablement présente dans la membrane d'un organite cellulaire. La deuxième méthode d'identification était une mesure directe et devait nous indiquer plus précisément la nature de la ou des protéines MXR impliquées. Les résultats ont été moins significatifs probablement par manque de spécificité des anticorps (pour l'analyse de transfert de type Western) et le manque de purification des échantillons (pour l'analyse en spectrométrie de masse). Cela nous a cependant permis de confirmer la présence d'activité MXR et de trouver une protéine MVP (*Major Vault Protein*) dans les cœlomocytes de l'oursin vert, *S. dræbachiensis*.

Dans un deuxième temps, nous avons confirmé le profil des acides gras particulier des échinodermes dans les cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* : forte présence des acides gras eicosapentænoïc (20:5n-3), 20:2 NMI et gadoleïc (20:1n-11). Nous démontrons également une capacité de réorganisation des phospholipides membranaires

chez ces deux espèces en diminuant le degré d'insaturation des membranes, particulièrement le 20:5n-3 lors d'une augmentation de la température. Cependant, le cholestérol ne participe pas au réarrangement des membranes puisque sa quantité reste invariable, indépendamment de la température. Ainsi, *L. polaris* et *S. dræbachiensis* sont partiellement capables d'adaptation homéovisqueuse sans grande différence entre elles. De plus, l'augmentation de la température ne semble pas avoir d'incidence sur la sortie de la période de ralentissement métabolique observée l'hiver et mesurée sur les cœlomocytes par la méthode du sel de tétrazolium (MTT). La température n'est assurément pas le seul facteur faisant sortir les échinodermes de leur ralentissement métabolique hivernal, d'autant plus que la disponibilité de la nourriture était déficiente. Pour finir, en remodelant les lipides, l'environnement physique membranaire des transporteurs MXR devrait être maintenu malgré le changement de température et leur permettre d'assurer leur fonction protectrice de la cellule.

Dans un troisième temps, en travaillant avec un stress toxique induit par un composé simple ou une combinaison de deux contaminants, nous avons pu établir que les cœlomocytes de *L. polaris* étaient moins sensibles au tributylétain (TBT) que des cellules analogues d'autres espèces d'invertébrés ou de vertébrés et n'étaient pas sensibles, ni au phénanthrène (Phe) ni au dibutylétain (DBT). De plus, le TBT, en concentration non-toxique, semble avoir pour effet d'augmenter la toxicité du Phe sur les cœlomocytes de *L. polaris*. D'une part, le Phe serait probablement directement impliqué dans le mécanisme de transport MXR car il a engendré une augmentation de l'incorporation de la calcéine-AM dans les cœlomocytes. D'autre part, le TBT aurait plutôt un effet indirect sur le mécanisme MXR puisque qu'il n'a pas d'effet détectable sur l'incorporation d'aucun substrat mais plutôt un effet toxique supplémentaire lorsqu'il est combiné à la cyclosporine A.

L'étude de la contamination multiple est difficile et l'interprétation en est toujours ardue. Nous pensons que l'étude des transporteurs MXR et du potentiel de chimiosensibilisation des contaminants est très importante dans le suivi (de la description à la prise de décisions politiques) de la qualité de l'environnement. La recherche sur l'aspect environnemental des produits chimiques agissant comme des chimiosensibilisateurs n'en est encore qu'à ses balbutiements.

Mots clés : échinodermes, *Leptasterias polaris*, *Strongylocentrotus dræbachiensis*, *Cucumaria frondosa*, cœlomocytes, tributylétain, dibutylétain, phénanthrène, résistance aux xénobiotiques, stress environnementaux, température, contaminant multiple

ABSTRACT

All living organisms have the ability, to some extent, to get rid of toxic molecules due to their biotransformation system. The multixenobiotic resistance (MXR) can expel the unwanted molecules out of the cell before biotransformation (phase 0) or later on (phase III). The MXR transporters act as a first line of defence for the cell. Mixtures of environmental contaminants can compromise this defence mechanism when they interact with MXR proteins and the active transport of molecules. Toxic substances can then be accumulated into cells instead of being expelled. Among marine invertebrates, echinoderms of the cold St. Lawrence play a very important ecological role in ecosystem and few studies are available on their physiology and ecotoxicology. Given the interest and importance of coelomocytes for the echinoderm body itself (circulatory system responsible for, among other things, the immune system) and for ecotoxicologists (potential tools for assessing a particular population health), we studied the resistance of these cells to xenobiotics. The overall objective of this project was to study the biochemical mechanisms of cellular resistance to xenobiotics in coelomocytes of *Leptasterias polaris*, *Strongylocentrotus dræbachiensis* and *Cucumaria frondosa*. We also examined MXR activity in connection with environmental stressors such as temperature and contaminants.

In a first step, we established the presence of a MXR mechanism in coelomocytes of *L. polaris*, *S. dræbachiensis* and *C. frondosa*. Results indicated a probable presence of a family of transporters of multidrug resistance-associated proteins (MRPs) and at least one additional MXR protein, may be a P-glycoprotein (Pgp). Proteins were determined by two different methods. The first method using flow cytometry was very successful and led us to the hypothesis that a MRP-like protein was probably present in a membrane inside an unidentified cell organelle. The second method of identification was a direct measurement and should tell us more precisely which MXR protein was involved. The results were less significant, probably due to a lack of specificity of some antibodies (Western blot analysis) and an incomplete purification of samples (mass spectrometry analysis). MXR activity was however confirmed in coelomocytes and a protein MVP (Major Vault Protein) has been detected in coelomocytes of the sea urchin, *S. dræbachiensis*.

In a second step, we confirmed a particular fatty acids (FA) profile in the coelomocytes of echinoderms *L. polaris* and *S. dræbachiensis*; with a high proportion of FA: eicosapentænoic acid (20:5n-3), 20:2 NMI and gadoleic acid (20:1n-11). We also demonstrated the capacity for the reorganization of membrane phospholipids in both species by reducing the degree of membrane insaturation, especially FA 20:5n-3 when temperature is increasing. However, cholesterol was not involved in the membrane remodeling because its amount remained unchanged with temperature increase. Thus, coelomocytes of *L. polaris* and *S. dræbachiensis* are partially capable of an homeoviscous adaptation with no difference between species. In addition, a temperature increase did not seem to contribute to a re-activation of the winter metabolic slowdown (measured on

cœlomocytes by the method of the microculture tetrazolium salt assay). Temperature is certainly not the only factor bringing echinoderms out their winter metabolic slowdown, especially when food is not available. Finally, by remodeling their membrane lipids, the physical environment of membrane MXR transporters, and thus their protective function of the cell, should be maintained.

In a third step, working with a toxic stress induced by a single contaminant or a combination of two, we established that the *L. polaris* cœlomocytes were less sensitive to tributyltin (TBT) than similar cells from invertebrate species or vertebrates, and were not sensitive, to either phenanthrene (Phe) or dibutyltin (DBT). In addition, a non-toxic concentration of TBT appeared to increase Phe toxicity in *L. polaris* cœlomocytes. In first instance, Phe is probably directly involved in the transport by MXR proteins because it led to an increase of calcein-AM incorporation in the cœlomocytes. On the other hand, TBT would seem to have an indirect effect on the MXR mechanism, since no detectable effect on the incorporation of any substrate was recorded, but rather an additional toxic effect was observed when combined with cyclosporin-A.

The study of multiple contamination and its interpretation is a difficult task. We believe that the study of MXR transporters and the potential for chemosensitization of contaminants is a very important topic in environmental biomonitoring (from the descriptive level to the decision-making level). Research on the environmental behavior of chemicals that act as chemosensitizers is still in its infancy.

Mots clés : echinoderms, *Leptasterias polaris*, *Strongylocentrotus dræbachiensis*, *Cucumaria frondosa*, cœlomocytes, tributyltin, dibutyltin, phenanthrene, multixenobiotic resistance, environmental stress, temperature, toxic mixture

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xxiii

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Anatomie et physiologie des échinodermes.....	2
1.2. Les espèces à l'étude.....	5
1.2.1. L'étoile de mer polaire, <i>Leptasterias polaris</i>	5
1.2.2. L'oursin vert, <i>Strongylocentrotus dræbachiensis</i>	5
1.2.3. Le concombre de mer commun, <i>Cucumaria frondosa</i>	7
1.3. Les cœlomocytes : système circulatoire pour l'organisme.....	7
1.4. Vivre en milieu froid.....	9
1.5. La contamination de l'environnement.....	13
1.6. La résistance aux xénobiotiques.....	15
1.6.1. Historique des MXR.....	15
1.6.2. Protéines de transport MXR.....	16
1.6.3. Identité des substrats et des inhibiteurs.....	20
1.6.4. Méthodes d'analyse des protéines MXR.....	21
1.6.5. La résistance aux xénobiotiques chez les échinodermes.....	23
1.7. Objectif général.....	23
1.8. Hypothèses de travail et structure de la thèse.....	27
1.8.1. Objectif 1.....	27
1.8.2. Objectif 2.....	27
1.8.3. Objectif 3.....	28

CHAPITRE 2

RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES DANS LES CŒLOMOCYTES DE TROIS ESPÈCES D'ÉCHINODERMES.....	29
2.1. Résumé.....	31
2.2. Abstract.....	32
2.3. Introduction.....	33
2.4. Materials and methods.....	36
2.4.1 Animals and sampling cœlomocytes.....	36
2.4.2 Chemicals.....	37
2.4.3 Cytotoxicity test.....	37
2.4.4 MXR assay.....	38
2.4.5 Flow cytometry.....	39
2.4.6 Light and epifluorescence microscopy.....	39
2.4.7 Total proteins analysis, SDS-PAGE and Western blot analysis.....	39
2.4.8 Mass spectrometry analysis.....	41
2.4.9 Statistical analysis.....	42
2.5. Results.....	43
2.5.1. Cell distribution in cœlomic fluid.....	43
2.5.2. Cell viability.....	45
2.5.3. Measurement of MXR-like activity by FCM.....	47
2.5.4. Measurement of MXR-like proteins by SDS-PAGE and Western blot analysis.....	53
2.5.5. Identification of MXR-like proteins by mass spectrometry.....	55
2.6. Discussion.....	57
2.6.1. Rhodamine B incorporation.....	58
2.6.2. Calcein incorporation.....	59
2.6.3. Responses comparison.....	61
2.6.4. Western Blot confirmation of MXR-like proteins in cœlomocytes.....	62
2.7. Conclusion.....	65

CHAPITRE 3

EFFET D'UN ACCROISSEMENT DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PHYSIOLOGIE ET LE REMANIEMENT LIPIDIQUE DES CŒLOMOCYTES DE <i>LEPTASTERIAS POLARIS</i> ET <i>STRONGYLOCENTROTUS DRŒBACHIENSIS</i>	67
3.1. Résumé	69
3.2. Introduction.....	71
3.3. Matériel et méthodes.....	73
3.3.1. Les animaux	73
3.3.2. Le prélèvement des cœlomocytes	74
3.3.3. Les analyses.....	74
3.3.4. Analyses statistiques	79
3.4. Résultats & discussion.....	80
3.4.1. Taille et concentration des cœlomocytes	80
3.4.2. Taille des cœlomocytes	80
3.4.3. Concentration cellulaire	83
3.4.4. Protéines	85
3.4.5. Viabilité cellulaire.....	87
3.4.6. Consommation d'oxygène.....	92
3.4.7. Acide gras.....	95
3.4.8. Cholestérol	104
3.4.9. Conclusion.....	107

CHAPITRE 4

EFFET COMBINÉ DU PHÉNANTHRÈNE ET DES BUTYLÉTAINS ET RÔLE DE LA RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES DANS LA TOXICITÉ OBSERVÉE SUR LES CŒLOMOCYTES DE <i>LEPTASTERIAS POLARIS</i>	111
4.1 Résumé	113
4.2 Abstract.....	114
4.3 Introduction.....	115
4.4 Materials and methods.....	117
4.4.1. Animals and sampling of cœlomocytes	117
4.4.2. Chemicals	118
4.4.3. Cytotoxicity test	119

4.4.4. Interaction with MXR-like proteins activities 119

4.4.5. Statistical analysis..... 121

4.5 Results & discussion 122

4.5.1. Individual toxicants and their involvement with MXR-like proteins 122

4.5.2. Mixture of toxicants and the potential of the MXR inhibitors to act on Phe/TBT toxicity..... 128

4.6 Conclusion..... 134

CHAPITRE 5

CONCLUSION 137

5.1 Résumé du chapitre 2 139

5.2 Résumé du chapitre 3 142

5.3 Résumé du chapitre 4 145

5.4 Perspectives..... 148

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 157

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1 Toxicity of Calcein-AM (CAM, 0.5 μ M) on cœlomocytes of *L. polaris*. Cells were incubated with 1 μ M substrate \pm Verapamil (Ver, 50, 30 and 10 μ M), Mk 571 (Mk, 10, 5 and 1 μ M) or Cyclosporin-A (CsA, 10, 5 and 1 μ M).46

Tableau 3.1 Quantité de protéines (mg / mL) dans le liquide cœlomique ([LC], incluant les cellules) et les cœlomocytes ([cellules]) pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez *L. polaris* et *S. dræbachiensis*, mesurée par la méthode de Bradford (Kit Coomassie Plus).....86

Tableau 3.2 Viabilité cellulaire moyenne chez *L. polaris* et *S. dræbachiensis* mesurée au MTT avant l'expérience sur l'acclimatation à une moyenne de 9.7°C entre juillet et septembre 2006 (n= 3) et à 4.7°C entre novembre et décembre 2006 (n=5) et pendant l'expérience sur l'acclimatation à l'hiver 2007 à 1°C (n=7, température hivernale) et 10°C (n=7, température d'acclimatation).....91

Tableau 3.3 Consommation d'O₂ (mL d'O₂ / h / g) de *L. polaris* (3 individus) et *S. dræbachiensis* (5 individus) pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C, mesurée dans une chambre de 1 L à l'aide d'une sonde YSI (5331) et des électrodes (Yellow Springs).....94

Tableau 3.4 Composition en acides gras des cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C mesurée par chromatographie gazeuse.....97

Tableau 3.5 Quantité de cholestérol des cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C mesurée par chromatographie gazeuse..... 106

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Anatomie des échinodermes. A. Astéride B. Échinidé C. Holothurie. http://www.unice.fr/cours_biology/LSV1_Cours_Zoologie/Cours_ST_1/Echinodermes/Planche_Echinodermes.htm (dernière consultation 30 septembre 2011)4

Figure 1.2 Les espèces d'échinodermes à l'étude : A. *Leptasterias polaris* (Photo : Claude Nozères) B. Jeune *L. polaris* à la sortie de l'œuf (Photo : Émilie Doussantousse). C. *Strongylocentrotus dræbachiensis* (www.seascapesaquarium.org), D. *Cucumaria frondosa* (www.seawater.no/fauna). (Dernière visite le 30 septembre 2011).6

Figure 1.3. Cœlomocytes de concombre de mer. A. Hyalinocytes (échelle: 10 µm); B. Granulocyte (Lymphocyte) (échelle: 10 µm); C. Cellule cristalline (échelle: 5 µm); D. Cellules fusiformes (fc) (échelle: 5 µm); E Cellule vibratile (échelle: 5 µm); F. et G. Amœbocytes (échelle: 10 µm). Figure extraite de Xing *et al.* (2008).8

Figure 1.4 A. Bicouche membranaire d'une cellule illustrant les composantes principales de la membrane et leur organisation. B. Effet de la température sur l'ordre et la phase des membranes cellulaires. Figure extraite de Hochachka et Somero (2002).12

Figure 1.5 A. Transporteurs de la superfamille ABC conférant aux cellules une résistance. (Pérez-Tomas 2006) B. Cycle de transport d'une P-glycoprotéine (www.csc.mrc.ac.uk) (Dernière visite le 1^{er} octobre 2011).19

Figure 1.6 Prélèvement de liquide cœlomique sur *Leptasterias polaris* (Photo : Claude Nozères).....26

Figure 1.7 Schéma de thèse28

Figure 2.1 Flow cytometric signature of the cœlomocytes of (A) *Leptasterias polaris*, (B) *Strongylocentrotus dræbachiensis* and (C) *Cucumaria frondosa* illustrated by density-plots of forward scatter (FS) vs. side scatter (SS). Warmer colors represent regions with higher density of cells 44

Figure 2.2 Flow cytometric measurement of fluorescent Rhodamine B (RB) in (A) cœlomocytes of cœlomocytes of *Strongylocentrotus dræbachiensis*, (B) cœlomocytes of *Leptasterias polaris*, (C) vibratile cells of *S. dræbachiensis* and (D) cœlomocytes of *Cucumaria frondosa*. 48

Figure 2.3 Flow cytometric measurement of fluorescent calcein in (A) cœlomocytes of *Strongylocentrotus dræbachiensis*, (B) cœlomocytes of *Leptasterias polaris*, (C) vibratile cells of *S. dræbachiensis* and (D) cœlomocytes of *Cucumaria frondosa*. 50

Figure 2.4 Differential Interference Contrast and epifluorescence microscopy images of *Leptasterias polaris* cœlomocytes incubated with 0.5 µM calcein-AM without inhibitor (A, B) and with the inhibitor MK571 (C, D) 52

Figure 2.5 Fluorescence measurements by flow cytometry of (A) 0.5 µM Calcein-AM (CAM) with a dose-response of Mk571, (B) 1 µM Rhodamine B (RB) with a dose-response of Cyclosporine A, (C) a dose response of CAM and (D) a dose-response of RB. 54

Figure 2.6 (A) Silver-stained SDS-PAGE; and (B) Western blot of cœlomocytes extracts from echinoderms. Panel B, the mouse monoclonal antibody C9 was used. 56

Figure 2.7 (A) Silver-stained SDS-PAGE; (B) and Western blot of cœlomocytes extracts from echinoderms. Panel B, the mouse monoclonal antibody C219 was used. 58

Figure 2.8 Hypothetical scheme of P-glycoprotein (Pgp)-like protein and multidrug resistance-associated proteins (MRPs)-like protein distribution in cœlomocytes. The presence of MK571 explains the decrease of calcein-AM fluorescence.....	64
Figure 3.1 Taille moyenne des cœlomocytes pendant l'expérience (ti à t7) sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez <i>L. polaris</i> (A) et <i>S. dræbachiensis</i> (B).....	82
Figure 3.2 Concentration des cœlomocytes pendant l'expérience (ti à t7) sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez <i>L. polaris</i> (A) et <i>S. dræbachiensis</i> (B).....	84
Figure 3.3 Viabilité cellulaire des cœlomocytes pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez <i>L. polaris</i> (A) et <i>S. dræbachiensis</i> (B), mesurée par le test du tetrazolium en microculture.....	89
Figure 3.4 Index de saturation et quantité en mol % de l'acide gras 20:5n-3 dans les cœlomocytes de <i>S. dræbachiensis</i> (moyenne ± ET).....	100
Figure 3.5 Index de saturation et quantité en mol % de l'acide gras 20:5n-3 dans les cœlomocytes de <i>L. polaris</i> (moyenne ± ET).....	103
Figure 3.6 Quantité de cholestérol dans les cœlomocytes de <i>S. dræbachiensis</i> et ceux de <i>L. polaris</i> (moyenne ± ET).....	109
Figure 4.1 Toxicity of TBT (a and b), DBT (c and d) and Phe (e) on <i>L. polaris</i> cœlomocytes.	125
Figure 4.2 Flow cytometry measurements of fluorescent Rhodamine B (RB, left side) and Calcein-AM (CAM, right side) in <i>L. polaris</i> cœlomocytes.....	127

Figure 4.3 Co-exposure experiments using *L. polaris* coelomocytes with Phe (a and b), DBT (c and d) and TBT (e and f) and MXR inhibitors, 5 μ M Mk (left side) and 5 μ M CsA (right side)..... 130

Figure 4.4 Co-exposure experiments performed in *L. polaris* coelomocytes with a variable Phe concentration added to 0.05 μ M TBT (a) and 0.1 μ M DBT (c), and to a fixed Phe concentration (5 μ M) added to a variable TBT concentration (b) and a variable DBT concentration (d).. 133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

20:1n-11	Acide gadoleic / <i>Gadoleic acid</i>
20:4n-6	Acide arachidonique / <i>Arachidonic acid</i>
20:5n-3	Acide Eicosapentaenoic / <i>Eicosapentaenoic acid</i>
AG	Acides gras / <i>fatty acids</i>
AG-NMI	Acides gras non interrompus par un méthyle / <i>non-methyl interrupted fatty acids</i>
AGPI	Acides gras polyinsaturé / <i>Polyunsaturated fatty acids (PUFA)</i>
BCRP	Protéines associées à la résistance du cancer du sein / <i>Breast cancer related proteins</i>
Bts	Butylétains / <i>Butyltins</i>
CAM	Calcéine-AM / <i>Calcein-AM</i>
CsA	Cyclosporine A / <i>Cyclosporin-A</i>
DBT	Dibutylétain / <i>Dibutyltin</i>
DIC	Contraste de Phase / <i>Differential interference contrast</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde / <i>Dimethyl sulfoxide</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique / <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMF	Eau de mer filtrée / <i>Filtered sea water (FSW)</i>
FCM	Cytométrie en flux / <i>Flow cytometry</i>
GC	Chromatographie gazeuse / <i>Gaz chromatography</i>
GC-FID	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme / <i>Gaz chromatography - flame ionization detector</i>
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques / <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)</i>
HVA	Adaptation homéovisqueuse / <i>Homeoviscous adaptation</i>

LC	Liquide cœlomique / <i>Cœlomic Fluid</i>
MDR	Résistance aux multiples médicaments / <i>Multidrug resistance</i>
MEAG	Esters méthyliques d'acides gras / <i>Fatty acids methyl ester (FAME)</i>
Mk	Mk 571 / <i>Mk 571</i>
MRPs	Protéines associées à la résistance aux médicaments / <i>Multidrug resistance-associated proteins</i>
MTT	Test du tétrazolium en microculture / <i>Microculture tetrazolium assay</i>
MVP	Protéines voutes / <i>Major vault protein</i>
MXR	Résistance aux xénobiotiques / <i>Multixenobiotics resistance</i>
Pgp	P-glycoprotéine / <i>P-glycoprotein</i>
Phe	Phénanthrène / <i>Phenanthrene</i>
RB	Rhodamine B / <i>Rhodamine B</i>
TBT	Tributylétain / <i>Tributyltin</i>
Ver	Vérapamil / <i>Verapamil</i>
WB	Transfert de type Western / <i>Western blot</i>

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les échinodermes sont des animaux marins benthiques fascinants tant par leur diversité que par leur stratégie de survie (reproduction, alimentation, prédation ...). Ils forment un groupe très ancien dont les premières traces fossiles remontent à la période cambrienne (700 millions d'années). Ils dérivent de formes à symétrie bilatérale, les hétérostèles et les formes les plus anciennes sont sessiles. Ils ont laissé d'abondantes traces, en particulier avec les groupes des crinoïdes (plumes de mer) et des échinoïdes (oursins), présents dès l'ordovicien. Au total 23 classes et 13 000 espèces ont été identifiées (5 classes et 7000 espèces aujourd'hui). L'embranchement comprend : les astérides (étoiles de mer), les ophiuridés (ophiures), les échinidés (oursins), les holothuries (concombres de mer) et les crinoïdes (plumes de mer).

Ils sont présents à toutes les profondeurs océaniques et dans tous les océans, représentant parfois le phylum le plus abondant des grandes profondeurs. Ils ont un rôle important dans leur écosystème. Par exemple, les oursins herbivores ont un rôle écologique clé dans la distribution et l'abondance des macrophytes benthiques (Lawrence 1975). Dans l'estuaire du Saint-laurent, *Strongylocentrotus dræbachiensis* limite sévèrement la distribution du varech dans l'environnement rocheux subtidal (Gagnon *et al.* 2004). Les astéries sont de grandes prédatrices et jouent également un rôle majeur dans la structure des communautés (Gaymer *et al.* 2004).

Les échinodermes possèdent un certain nombre de caractéristiques uniques dans le monde animal dont les principales sont la symétrie radiale et le système aquifère. La forme adulte est organisée autour d'une symétrie pentaradiée. C'est leur forme embryonnaire bilatérale qui les range aux côtés des chordés dans le groupe des deutérostomiens. Les

deutérostomiens regroupent les organismes dont la bouche apparaît en second lors de la gastrulation de l'embryon. De l'ancêtre marin deutérostomien ont découlé les phylums hémichordés, échinodermes (phylums uniquement marins) ainsi que l'ancêtre des chordés. Ce statut d'invertébrés deutérostomiens leur procure une position phylogénétique significative, un lien entre les chordés et les invertébrés. Pour ces raisons, les échinodermes ont reçu beaucoup d'attention dans des domaines très variés de la recherche : écologie et évolution, génomique, développement embryonnaire, taxonomie, toxicologie et bien d'autres. Dans les dernières années, de plus en plus d'études en aquaculture ont vu le jour sur des espèces commerciales comme les concombres de mer (So *et al.* 2010, Xing *et al.* 2008). Les gamètes d'oursins ont longtemps servi de modèle embryonnaire dans l'étude de la fécondation, notamment en ce qui concerne les mouvements ioniques lors de la pénétration du spermatozoïde dans l'œuf (Hickman *et al.* 1996). Depuis plusieurs années, un biotest de routine utilisant les gamètes d'oursins est utilisé par Environnement Canada pour évaluer la toxicité sous létale en milieu marin (Canada 2011). Les autres groupes d'échinodermes sont cependant plus rarement utilisés en toxicologie aquatique ou dans une perspective de bio-surveillance environnementale du milieu marin. Beaucoup de données sont donc manquantes.

1.1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DES ÉCHINODERMES

Le nom échinoderme vient des protubérances épineuses externes (*papulae*) et les caractéristiques suivantes regroupent l'ensemble du phylum : endosquelette dermique, système vasculaire hydraulique composé de canaux dérivant de la cavité cœlomique, un système cœlomique et hémal, des podia, des branchies dermiques et une symétrie radiale ou biradiale (Fig. 1.1). L'endosquelette mésodermique calcifié est retrouvé chez l'ensemble du phylum et que ce soit sous la forme de plaques ou de petits ossicules éparpillés, il assure une fonction protectrice. Le système aquifère remplit la fonction de squelette hydraulique

permettant le mouvement de l'organisme. Ce système est ouvert sur l'extérieur par le madréporite qui agit comme une soupape (Smith, 1981). Parallèlement, le système cœlomique assure quelques unes des fonctions du sang et quelques autres comme les échanges gazeux, la locomotion et la nutrition. Le système digestif est complet et parfaitement fonctionnel. Les systèmes hémal et périhémal forment un réseau de communication à travers le tissu connectif et une analogie avec le sang des vertébrés est souvent effectuée (Binyon 1972). Le système hémal, entouré par le système périhémal, semble également permettre le transport de molécules complexes et des gaz. Le système périhémal est absent chez les holothuries qui ont un système hémal très bien développé (Smith, 1981). Le système nerveux est constitué d'un anneau autour de l'orifice buccal duquel s'étendent des nerfs radiaires. Il n'y a pas de système nerveux central ou de cerveau. Les ramifications des nerfs radiaires forment un réseau aux multiples connexions qui assure la coordination des mouvements. Les organes des sens, tels qu'on les connaît, sont rares. On peut signaler toutefois un système olfactif assez développé : les échinodermes perçoivent la présence et la nature de substances chimiques dissoutes dans l'eau de mer (Hickman *et al.* 1996).

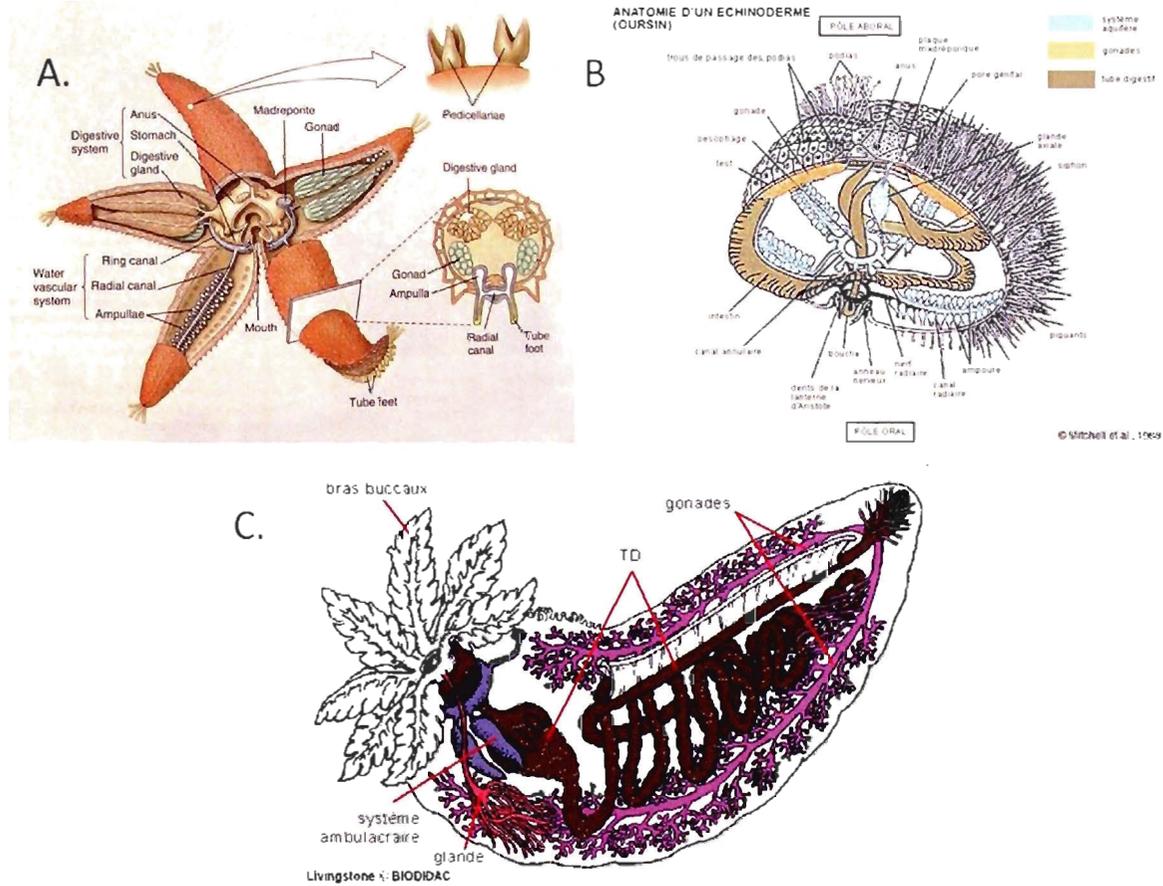


Figure 1.1 Anatomie des échinodermes. A. Astéride B. Échinidé C. Holothurie. http://www.unice.fr/cours_biologie/LSV1_Cours_Zoologie/Cours_ST_1/Echinodermes/Planche_Echinodermes.htm (dernière consultation 30 septembre 2011)

1.2. LES ESPÈCES À L'ÉTUDE

1.2.1. L'étoile de mer polaire, *Leptasterias polaris*

L'astéride *Leptasterias polaris* (Müller et Troschel 1842) est retrouvée le long des côtes américaines de l'Atlantique Nord et de l'Arctique (Chabot et Rossignol 2003). Elle évolue principalement dans les eaux froides, sombres mais riches du Saint-Laurent. Elle est très abondante dans la zone infralittorale de l'estuaire du Saint-Laurent (Vincent 1990). C'est une espèce prédatrice qui se nourrit principalement de moules bleues *Mytilus edulis* (Himmelman et Dutil 1991). *L. polaris* (Fig. 1.2A), comme les autres espèces du même genre, couve ses œufs en s'enroulant autour de la ponte à la fin décembre, jusqu'en mai et parfois un peu plus tard (Himmelman *et al.* 1982). Maintenu en aquarium alimenté en circuit ouvert avec l'environnement extérieur, le comportement de reproduction est synchronisé avec le milieu naturel et la chute de température à l'approche de l'hiver semble déclencher la ponte. Après 5 à 6 mois de couvain, une jeune étoile de mer identique à l'adulte sort de l'œuf (Fig. 1.2B) (Hamel et Mercier 1995).

1.2.2. L'oursin vert, *Strongylocentrotus dræbachiensis*

L'échinidé *Strongylocentrotus dræbachiensis* (Müller 1776) (Fig. 1.2C) est très abondant dans les habitats rocheux de la zone infralittorale de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (Vincent 1990). On le retrouve aussi sur des substrats meubles ou graveleux, et parfois dans les eaux profondes (Chabot et Rossignol 2003). Il s'agit de l'herbivore dominant du substrat rocheux d'Atlantique Nord-Ouest (Gagnon *et al.* 2004). La ponte de *S. dræbachiensis* a lieu au printemps et est reliée au bloom phytoplanctonique printanier (Starr *et al.* 1993).

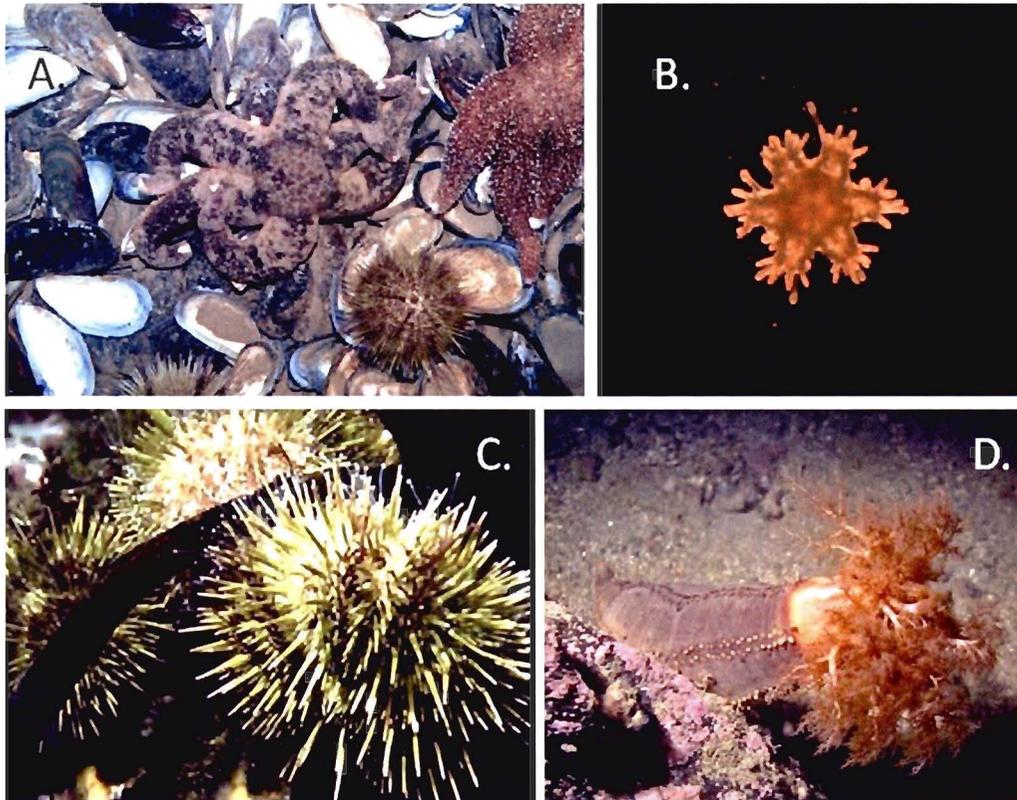


Figure 1.2 Les espèces d'échinodermes à l'étude : A. *Leptasterias polaris* (Photo : Claude Nozères) B. Jeune *L. polaris* à la sortie de l'œuf (Photo : Émilie Doussantousse). C. *Strongylocentrotus dræbachiensis* (www.seascapesaquarium.org), D. *Cucumaria frondosa* (www.seawater.no/fauna). (Dernière visite le 30 septembre 2011).

1.2.3. Le concombre de mer commun, *Cucumaria frondosa*

L'holothurie *Cucumaria frondosa* (Gunnerus, 1767) (Fig. 1.2D) est retrouvée en populations très denses sur les substrats rocheux dans le golfe et l'estuaire du Saint-Laurent (Hamel et Mercier 1996). Son régime alimentaire se compose d'une grande quantité de phytoplancton et parfois de petits crustacés, d'œufs ou de larves qu'il capte grâce à ses tentacules. Le cycle saisonnier de nutrition favorise l'alimentation au printemps et en été (Hamel et Mercier 1998). La ponte de *C. frondosa* a lieu en juin dans l'estuaire du Saint-Laurent. Les embryons et les larves flottent à la surface de l'eau avant de se fixer au substrat, rocheux de préférence, 48h après la fécondation (Hamel et Mercier 1996).

1.3. LES CŒLOMOCYTES : SYSTÈME CIRCULATOIRE POUR L'ORGANISME

Les cœlomocytes sont les cellules présentes dans la cavité cœlomique. Ces cellules sont également retrouvées dans les tissus conjonctifs et les épithéliums ainsi que dans les lacunes hémales (Chia et Xing 1996). Plusieurs types cellulaires ont été identifiés dans le liquide cœlomique des échinodermes mais ne sont pas retrouvés chez tous les échinodermes et leurs proportions varient. Chez les astéries, plus de 95% des cœlomocytes sont des amœbocytes, qui sont responsables de la phagocytose (Kaneshiro et Karp 1980 ; Chia et Xing, 1996). Chez les échinidés, quatre types cellulaires ont été dénombrés : les cellules sphériques rouges et sans couleur, les cellules vibratiles dotées d'un flagelle et les amœbocytes responsables de la phagocytose (Hillier et Vacquier 2003). Quant aux holothuries, six types cellulaires ont été décrits chez *Apostichopus japonicus* : les lymphocytes, les cellules morula, les amœbocytes, les cellules cristales, les cellules fusiformes et les cellules vibratiles. Non seulement on retrouve une grande diversité morphologique dans les cœlomocytes, mais également une grande diversité fonctionnelle (Xing *et al.* 2008).

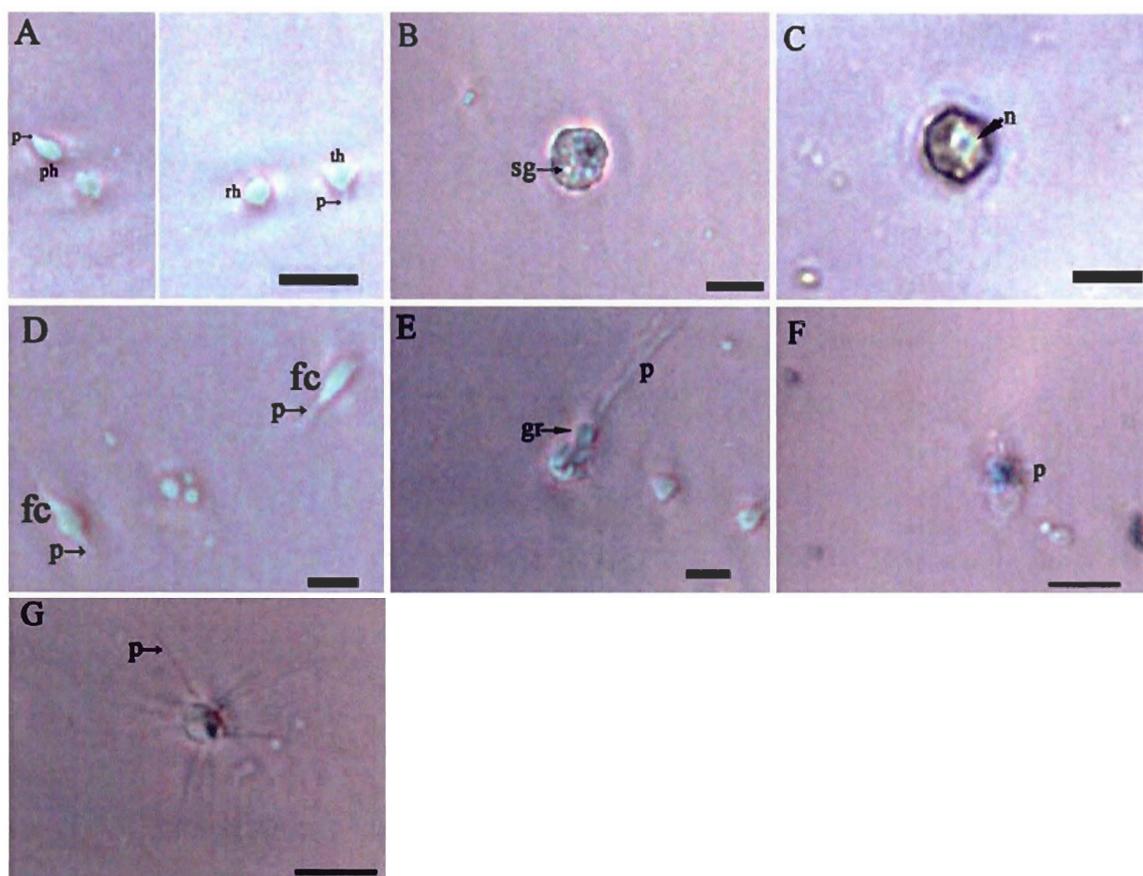


Figure 1.3. Cœlomocytes de concombre de mer. A. Hyalinocytes (échelle: 10 μm); B. Granulocyte (Lymphocyte) (échelle: 10 μm); C. Cellule cristalline (échelle: 5 μm); D. Cellules fusiformes (fc) (échelle: 5 μm); E. Cellule vibratile (échelle: 5 μm); F. et G. Amœbocytes (échelle: 10 μm). Légende: rh: Hyalinocyte rond, ph: hyalinocyte avec 2 pseudopodes, th: hyalinocyte triangulaire, p: pseudopode, sg: granules à sécrétion, n: noyau, gr: granule. Figure extraite de Xing *et al.* (2008).

Les cœlomocytes sont les cellules clés du système circulatoire et elles sont responsables de la formation du clou plaquettaire, de la phagocytose, du transport d'oxygène, de la synthèse et la sécrétion de protéines antibactériennes et antifongiques, entre autres. Elles ont aussi un rôle dans le transport et le stockage de nutriments ainsi que dans l'échange de gaz (Edds 1993). Sans avoir d'immunité adaptative, les échinodermes ont des réponses immunitaires non-spécifiques très bien développées ayant des similarités avec l'immunité innée des vertébrés supérieurs (Cavey et Arkel 1994). Des six types cellulaires décrits, seuls les amœbocytes et les sphérulocytes ont été reconnus comme acteurs importants des réponses immunitaires. De plus, les cœlomocytes sécrètent des facteurs antibactériens comme les agglutinines et les lysines (Chia et Xing 1996).

1.4. VIVRE EN MILIEU FROID

Les trois espèces d'échinodermes à l'étude sont des organismes d'eaux froides vivant dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. L'estuaire du Saint-Laurent, situé en zone subarctique, est un endroit unique, ponctué de longs hivers pendant lesquels la glace recouvre la surface de l'eau en milieu intertidal (El-Sabh et Silverberg 1990). Les propriétés hivernales (glace, vagues, basse température) influencent grandement la structure et la succession des communautés benthiques du Saint-Laurent du milieu intertidal (Bourget *et al.* 1985).

L'effet de la température est universel sur tous les taxa et l'omniprésence des gradients de température (en fonction des latitudes, de l'altitude, des profondeurs) conditionne la vie, et même peut la limiter dans certains cas. La température affecte grandement la physiologie des organismes, de la structure des macromolécules aux réactions chimiques (Hochachka et Somero 2002). Par exemple, le métabolisme des espèces augmente de façon croissante en fonction de la latitude, des zones polaires aux zones tropicales chez les poissons et les bivalves (Clarke et Johnston 1999, Peck 2002). Les

échinodermes sont des ectothermes, c'est-à-dire que la température de leur corps suit la température du milieu. Pour les ectothermes, les variations journalières et saisonnières de température influencent fortement les taux de respiration, l'alimentation, la croissance et la locomotion. La température altère particulièrement les réactions chimiques et enzymatiques, les taux de diffusion, la fluidité des membranes cellulaires et la structure des protéines (Hochachka et Somero 2002).

La température de l'eau peut donc engendrer un certain stress sur les organismes se faisant ressentir sur les activités des cœlomocytes. En effet, elle influe particulièrement sur les propriétés physiques des membranes influençant directement les processus s'y déroulant comme l'activité des protéines. Les processus membranaires sont très sensibles à la température, bien plus que les processus se déroulant dans la phase aqueuse de la cellule. Les membranes cellulaires ont alors un rôle primordial dans l'établissement des limites thermiques tolérables par les organismes vivants. Les membranes cellulaires (Fig. 1.4A) ont un rôle de barrière physique protégeant le milieu intracellulaire de l'extérieur et jouent un rôle majeur dans le transport de molécules. Elles ont aussi une fonction bioénergétique grâce au système de transport de protons et d'électrons pour la formation d'ATP. Les membranes sont également essentielles dans les processus de signalisation cellulaire (Hochachka et Somero 2002). Deux propriétés membranaires sont particulièrement influencées par la température (Fig. 1.4B) : l'ordre des membranes (fluidité) et la phase des membranes (viscosité) (Crockett 1998, Hochachka et Somero 2002). Selon le modèle de l'adaptation homéovisqueuse (HVA), malgré les variations de température, la membrane plasmique conserve un environnement physique optimal pour le fonctionnement des protéines. L'ordre est maintenu. Selon le modèle de l'adaptation homéophasique (HPA), malgré la variation de température, la membrane plasmique ne change pas d'état de phase puisque cela compromettrait son intégrité structurale. La phase est maintenue. Ces deux modèles impliquent un remaniement des lipides membranaires en cas de variation de température (Hochachka et Somero 2002). Il arrive cependant parfois que ces modèles n'expliquent que partiellement la compensation thermique qu'effectue les membranes cellulaires. C'est-à-dire qu'aucun remaniement ou seulement un remaniement partiel des

lipides est observé lors d'une variation de température sans que la cellule ne perde sa capacité fonctionnelle (Hazel 1995).

Les membranes cellulaires ont une composition lipidique très hétérogène et chaque acide gras possède des propriétés physiques et chimiques qui lui sont propres. La composition de l'ensemble des acides gras (AG) présents détermine la fluidité membranaire (Hazel 1995, Hulbert *et al.* 2005). Plusieurs invertébrés marins répondent positivement au modèle HVA, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de remanier leurs lipides membranaires afin de contrecarrer l'effet physique de la température et ainsi maintenir un environnement optimal pour les processus membranaires (Parent *et al.* 2008, Pernet *et al.* 2007).

Les échinodermes ont un profil lipidique très différents des autres espèces marines avec de fortes teneurs en acide arachidonique (20:4n-6) et monoénoïque (Σ 20:1 + 22:1) (Copeman et Parrish 2003, Sargent *et al.* 1983). Aucun profil n'est cependant disponible pour les cœlomocytes et aucune donnée n'est retrouvée quant à leur mécanisme d'ajustement à la température.

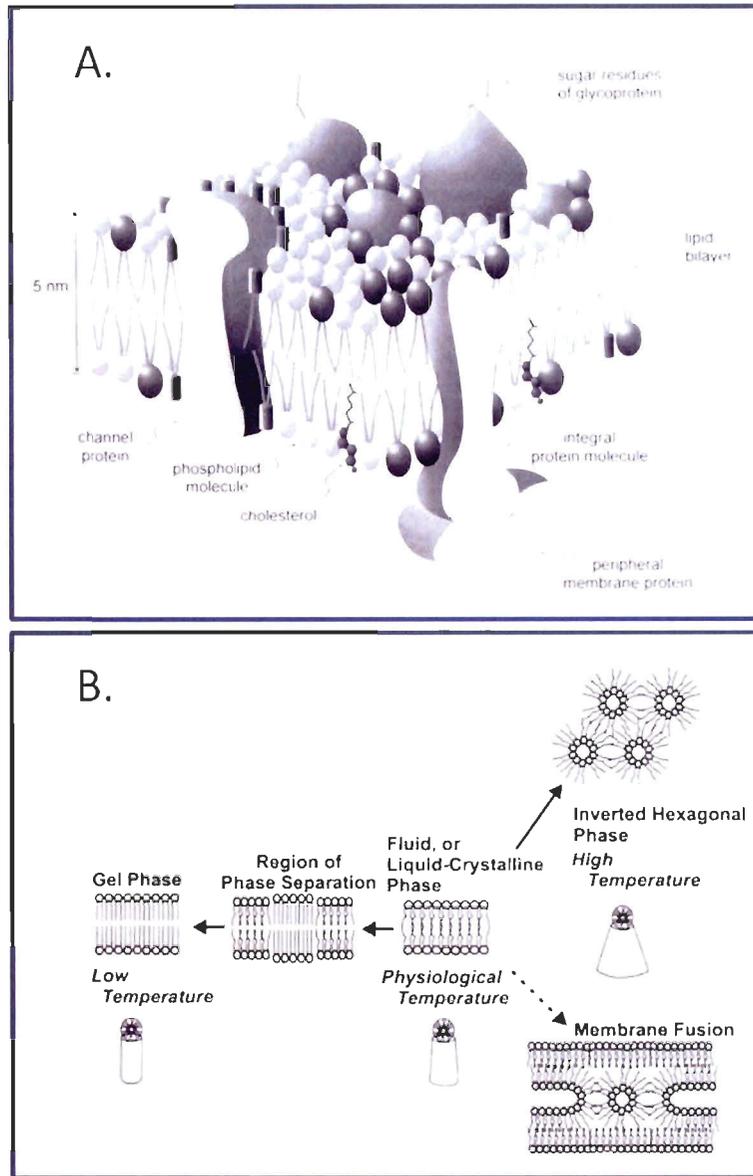


Figure 1.4 A. Bicouche membranaire d'une cellule illustrant les composantes principales de la membrane et leur organisation. B. Effet de la température sur l'ordre et la phase des membranes cellulaires. Figure extraite de Hochachka et Somero (2002).

1.5. LA CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT

La faune et la flore terrestre, aquatique et marine sont exposées à de multiples contaminants. Dans l'environnement du fleuve et de l'estuaire du Saint-Laurent, on retrouve un mélange de polluants composé de métaux (Gobeil *et al.* 2005), de xénoestrogènes (Aravindakshan *et al.* 2004), de composés organiques persistants (Metcalf-Smith *et al.* 1995, Viglino *et al.* 2004) et de pesticides (Ashpole *et al.* 2004). Dans un rapport gouvernemental rédigé en 2007, le ministère Pêches et Océans Canada mentionnait aussi la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des détergents et des produits pharmaceutiques en plus de ceux déjà cités (Dufour et Ouellet 2007). Tous ces contaminants sont retrouvés en concentration variable dans l'environnement et leur source n'est pas toujours connue (Gobeil *et al.* 2005). L'analyse chimique permet de connaître la quantité de contaminants présents dans les compartiments biotique et abiotique mais ne permet pas d'évaluer l'état de santé des organismes ni l'effet de la combinaison de plusieurs contaminants. Pour s'assurer de la qualité des milieux lors d'études environnementales, d'autres méthodes ont été développées, comme par exemple les biomarqueurs. Un biomarqueur est « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Amiard *et al.* 1998). L'utilisation de biomarqueurs permet d'évaluer l'état général d'un organisme et par lui, de l'écosystème. Cette méthode, bien que plus intégrative, ne permet pas non plus d'indiquer l'interaction exacte entre les contaminants présents.

Pourtant, des effets peuvent découler de la présence de plusieurs contaminants dans l'environnement car, une fois dans l'organisme, ces xénobiotiques peuvent interagir. Un xénobiotique se définit comme une « substance étrangère au milieu naturel ou à l'organisme possédant des propriétés toxiques même à faible dose » (Pelletier *et al.* 2004). La situation la plus simple est que l'effet du contaminant X n'interfère pas avec l'effet du

contaminant Y et/ou des autres. Dans d'autres cas, une action combinée réciproque ou non est possible : c'est ce qu'on appelle interaction (Borm et Henderson 1996).

Les interactions entre contaminants sur les organismes vivants sont réelles. Plusieurs études sont réalisées sur la phase toxicocinétique de l'exposition à de multiples contaminants. Un des exemples les plus fréquents est l'interaction sur la biotransformation : un contaminant A agit sur la biotransformation d'un contaminant B (Falahatpisheh *et al.* 2001, Kannan *et al.* 1998, Padros *et al.* 2003). Le résultat d'une exposition multiple peut se traduire par un simple effet additif de plusieurs composés aux mécanismes similaires ou encore être la résultante d'une action synergique (Sargian *et al.* 2005) ou antagoniste (Falahatpisheh *et al.* 2001) entre les différents composés. L'effet additif est défini de la façon suivante : l'effet combiné est égal à la somme des effets individuels des xénobiotiques. Une interaction est synergique quand l'effet combiné est plus grand que la somme des effets individuels. Elle est antagoniste quand l'effet d'une substance toxique est diminué ou annulé par la présence d'une autre substance (Borm et Henderson 1996). La concentration des xénobiotiques impliqués est souvent un facteur très important dans l'effet combiné (Bae *et al.* 2001, Padros *et al.* 2003).

Le mimétisme chimique est un autre genre d'interaction toxicocinétique qui perturbe la communication entre les cellules (Cheek *et al.* 1998). Par exemple, les contaminants de la catégorie des xénoestrogènes (œstrogène exogène) remplacent les oestrogènes indigènes et perturbent ainsi le système endocrinien (Cheek *et al.* 1998, Rassmussen *et al.* 2003).

L'interaction peut également avoir lieu au niveau du transport cellulaire. Par exemple, chez l'algue unicellulaire d'eau douce (*Chlorella* sp.), l'interaction entre le cuivre, le zinc et le cadmium peut être additive ou synergique dépendamment si le métal facilite l'entrée cellulaire d'un autre métal ou s'ils sont en compétition pour le même site de transport. Ainsi, l'effet combiné des métaux sur les paramètres cellulaires mesurés (croissance algale et superficie) ne peut absolument pas être déduit des effets individuels, si on ne connaît pas à l'avance l'effet de l'un sur le transport cellulaire de l'autre (Franklin *et al.* 2002).

1.6. LA RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES

Tous les organismes vivants ont la capacité de se débarrasser, dans une certaine mesure, des molécules toxiques grâce à leur système de biotransformation. Ce système de détoxification inclut généralement une phase d'oxydation par les enzymes du cytochrome P-450 (Phase I) suivi d'une conjugaison des molécules toxiques modifiées en phase I avec un fragment polaire comme, un monosaccharide, un sulfate ou un glutathion (phase II). Ces transformations faciliteront l'excrétion des molécules indésirables en augmentant leur solubilité (Epel *et al.* 2008). Le mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR) permet d'expulser les molécules indésirables avant la biotransformation (phase 0) ou après (phase III). Il s'agit d'un véritable mécanisme de protection cellulaire de première ligne.

1.6.1. Historique des MXR

L'étude des mécanismes MXR en écotoxicologie prend sa source dans la recherche médicale. Vers la fin des années 70, le phénomène de résistance des cellules cancéreuses commence à être observé dans les traitements du cancer chez l'humain (Biedler *et al.* 1975, Kessel *et al.* 1968). En effet, certaines cellules cancéreuses résistent aux différents agents chimiothérapeutiques utilisés. C'est le transport à travers la membrane cellulaire qui en est alors la cause (Inaba *et al.* 1979). Ce phénomène, la résistance aux multiples médicaments ou *multidrug resistance* (MDR), a été attribué à une protéine de transport nommée P-glycoprotéine (Pgp) (Ling *et al.* 1984). La surexpression de cette protéine transporteuse présente dans les cellules cancéreuses est corrélée avec la résistance aux agents chimiques (Gerlach *et al.* 1986). Lorsqu'un traitement de chimiothérapie échoue, le mécanisme MDR en est responsable dans 90% des cas (Aller *et al.* 2009). Le phénotype MDR n'est pas exclusivement dû à la Pgp puisqu'il existe plusieurs autres transporteurs impliqués dans la résistance cellulaire (Cole *et al.* 1992). Ainsi, au début des années 1990, une protéine procurant une forme de résistance aux médicaments mais différente d'une Pgp a été

décrite : la protéine associée à la résistance aux multiples médicaments (MRP) (Cole *et al.* 1992, McGrath et Center 1987, Mirski *et al.* 1987). Le phénomène MDR a finalement été retrouvé dans les cellules saines et surtout chez toutes les espèces (Bard 2000). C'est alors que le mécanisme a commencé à être étudié en environnement et qu'il prend toute son ampleur en écotoxicologie ces dernières années (Epel *et al.* 2008). Les mélanges toxiques de contaminants peuvent compromettre ce mécanisme de défense parce que les liaisons compétitives possibles avec les protéines transporteuses responsables des MXR peuvent carrément saboter l'activité de transport. Ou encore, des contaminants présents dans le mélange peuvent directement l'inhiber. Le résultat d'une compétition ou d'une inhibition est la diminution de l'activité des transporteurs permettant ainsi aux substances toxiques normalement expulsées de s'accumuler dans la cellule (Higgins 2007).

1.6.2. Protéines de transport MXR

Les protéines de transport impliquées dans le phénomène de MXR appartiennent à la superfamille des *ATP binding cassette* (transporteur ABC) dont les représentants se situent à tous les niveaux évolutifs, des procaryotes aux eucaryotes et dans tous les types cellulaires. Ces protéines transmembranaires, dépendantes de l'ATP, transportent les biomolécules de toutes sortes à travers la membrane plasmique (Higgins 2007). Des sept familles de transporteurs ABC, trois ont un rôle clair dans l'activité MXR (ou le phénotype MDR). Il s'agit de la famille des protéines Pgp (transporteurs ABCB), la famille des MRPs (transporteurs ABCC) et la famille des protéines associées à la résistance du cancer du sein (BCRPs) (transporteurs ABCG) (Haimeur *et al.* 2004).

La Pgp est la protéine MXR la plus étudiée (Smital *et al.* 2004). Le poids moléculaire de la Pgp dépend de sa glycosylation et varie entre 140 kDa et 170 kDa. La protéine provient du réticulum endoplasmique et atteint la surface cellulaire après maturation (Loo et Clarke 1994). Ce sont les gènes *mrd1* (ABCB) qui déterminent le phénomène de résistance et codent pour la Pgp, une protéine de près de 1280 acides aminés (Gros *et al.* 1986, Riordan *et al.* 1985). La Pgp comporte deux domaines cytoplasmiques

qui lie les nucléotides et hydrolyse l'ATP. C'est la partie commune avec les protéines de la super famille des transporteurs ABC. Elle comporte également deux domaines transmembranaires hydrophobes contenant généralement six hélices formant la voie de liaison des substrats au travers de la membrane (Figure 1.5) (Higgins 2007).

La famille des MRPs (ABCC) est aussi impliquée dans le phénomène MXR/MDR. À la MRP1 découverte en 1987, se sont ajoutées huit protéines du même type ayant des rôles très diversifiés et se distinguant très clairement dans les diagrammes évolutifs (Borst *et al.* 1999). La MRP1 est une protéine glycosylée de 190 KDa et les protéines MRPs comportent deux ou trois domaines cytoplasmiques et deux domaines transmembranaires comprenant six hélices (Figure 1.5A). Une particularité des protéines ABCC est que leur domaine cytoplasmique est asymétrique (Bakos et Homolya 2007). Toutes les protéines MRPs ont la capacité de transporter des médicaments mais toutes ne sont pas impliquées dans le phénotype MDR et la résistance des cellules cancéreuses. Des gènes et/ou des protéines associées à la famille des MRPs ont été observées chez des levures, des plantes, des nématodes et quelques vertébrés aquatiques dont le rouget de vase, *Mullus barbatus* (Sauerborn *et al.* 2004). En comparaison avec la Pgp, peu d'études ont été faites sur la présence de cette famille de protéines très importantes pourtant pour la résistance aux xénobiotiques. Puisqu'aucune différence n'est généralement faite entre les différentes MRPs chez les non-mammifères, nous utiliserons le terme MRPs pour cibler l'ensemble des protéines de la famille des MRPs.

La troisième famille de protéines impliquées dans le mécanisme MXR, la famille des BCRPs (ABCG), est beaucoup moins connue en général et particulièrement chez les non-mammifères. Cette protéine doit son nom à sa découverte à la fin des années 1990 dans une lignée humaine de cancer du sein (Doyle *et al.* 1998). Bien que nommée BCRP, il n'y a pas d'évidence d'une expression préférentielle dans les tissus mammaires. La BCRP est aussi beaucoup plus petite que la Pgp et les MRPs puisqu'elle ne contient qu'un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 1.5A) (Haimeur *et al.* 2004). Elle

semble surtout responsable de l'efflux des toxiques alimentaires (Epel *et al.* 2008). Très peu d'information est disponible sur son rôle dans le mécanisme MXR en environnement.

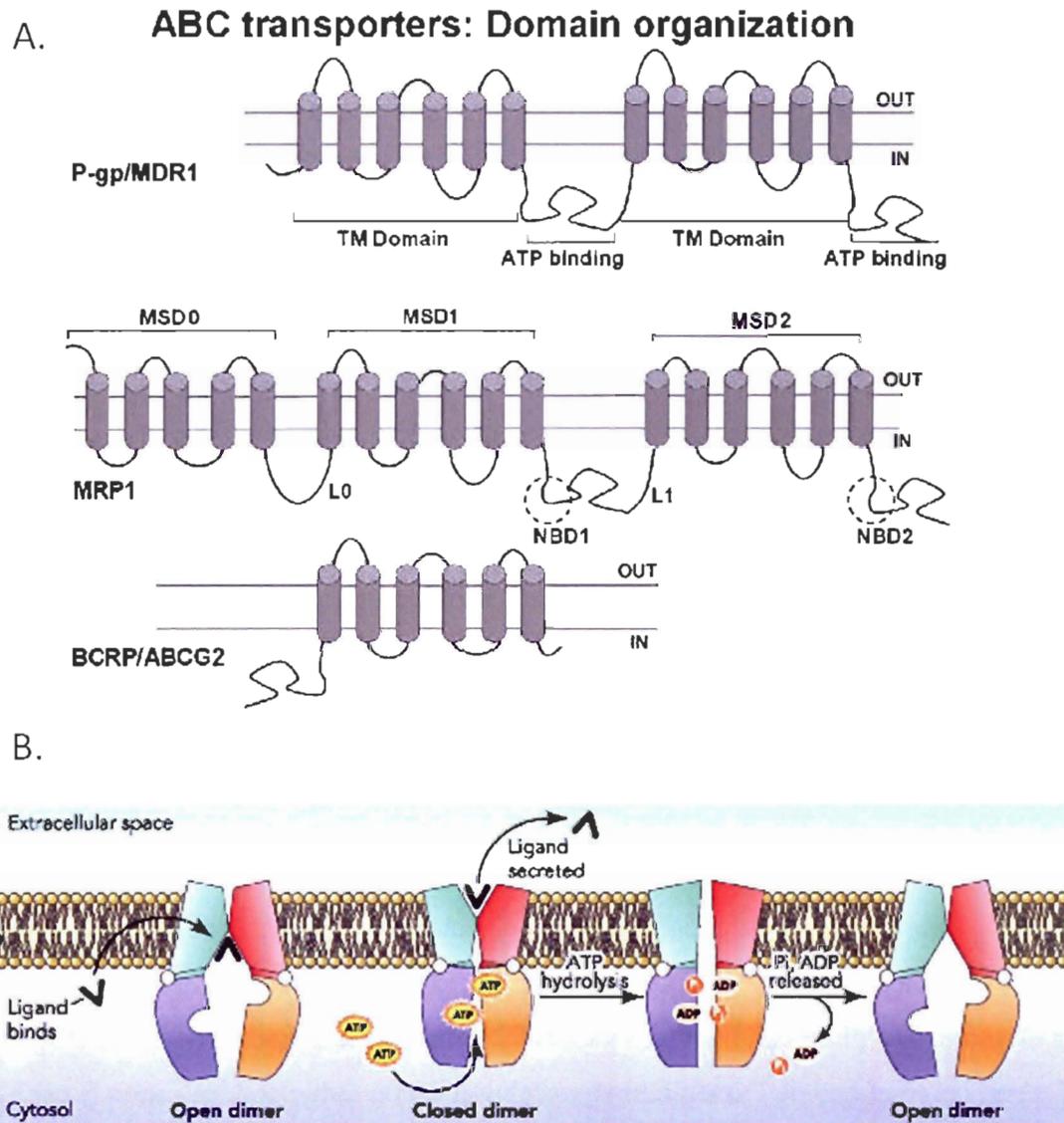


Figure 1.5 A. Transporteurs de la superfamille ABC conférant aux cellules une résistance. TM / MSD : domaine transmembranaire ; NBD : domaine liant les nucléotides (domaine cytoplasmique) P-gp1/MDR1 : P-glycoprotéine / gène *mdr1* ; MRP1 : Protéine de type 1 associée à la résistance aux médicaments ; BCRP : Protéine associée à la résistance du cancer du sein (Pérez-Tomas 2006) B. Cycle de transport d'une P-glycoprotéine (www.csc.mrc.ac.uk) (Dernière visite le 1^{er} octobre 2011).

1.6.3. Identité des substrats et des inhibiteurs

Les substrats des protéines MXR sont les molécules qu'elles exportent hors de la cellule et dont elles préviennent l'accumulation. Ces molécules peuvent être naturelles comme des extraits d'algues (Eufemia *et al.* 2002) ou anthropiques comme le diazinon (Zaja *et al.* 2011). Les substrats ont une cible cytologique différente, une structure chimique variée et des propriétés non communes (Bard 2000). Les protéines Pgp et MRPs ont moins de 20% d'acides aminés en commun et pourtant vont conférer aux cellules une protection à un spectre similaire, mais non identique, de molécules (Haimeur *et al.* 2004). La Pgp transporte généralement une très grande variété de substrats entre 330 daltons et plus de 4000 daltons. Beaucoup de détails sur le mécanisme de transport d'une Pgp ont récemment été confirmés (Aller *et al.* 2009). Cependant, très peu de percées ont été faites sur l'identité chimique des substrats et des inhibiteurs des transporteurs Pgp et des autres transporteurs associés au mécanisme MXR. Ainsi, notre connaissance de ces molécules reste vague et décrite comme suit : hydrophobicité moyenne, molécule amphiphile, charge positive ou neutre, un atome simple d'azote et un poids moléculaire important (Litman *et al.* 2001, Zaja *et al.* 2011). À cette description s'ajoutent, pour la famille des MRPs, des molécules toxiques conjuguées par exemple au glutathion. Le pesticide metolachlor est un exemple de molécules transportées par une protéine MRP1 (humain) lorsqu'il est conjugué au glutathion. De plus, certaines études démontrent que la protéine MRP1 transporterait également un conjugué de l'arsenic lorsque celui-ci est en faible concentration (Leslie *et al.* 2001, 2005). Quant à la spécificité connue des substrats des BCRPs, elle est beaucoup moins grande que celle des Pgp et MRPs (Haimeur *et al.* 2004).

Les inhibiteurs de la Pgp sont également très différents les uns des autres. De nombreux inhibiteurs sont en réalité des substrats et leur mode d'action est compétitif, c'est-à-dire qu'ils entrent en compétition pour le site de transport bloquant ainsi l'accès aux molécules normalement exportées. La cyclosporine A et le vérapamil sont des inhibiteurs compétitifs (Saeki *et al.* 1993). Par exemple, le vérapamil est considéré comme un inhibiteur car il est extrêmement rapide à re-pénétrer la cellule une fois qu'il a été exporté

par la protéine MXR (Eytan *et al.* 1996). Quant à la Cyclosporine-A, cet inhibiteur compétitif perturbe la reconnaissance du substrat (Ambudkar *et al.* 1999). D'autres inhibiteurs ont un mode d'action allostérique sur la protéine. Par exemple, le *cis*-(Z)-flupentixol inhibe le transport des substrats en bloquant leur translocation et leur éventuel dissociation du transporteur (Maki *et al.* 2003). Certains contaminants de l'environnement semblent être de vrais inhibiteurs de Pgp comme l'endosulfane (Zaja *et al.* 2011).

1.6.4. Méthodes d'analyse des protéines MXR

Plusieurs méthodes de mesures directes ou indirectes sont utilisées pour détecter l'activité ou la présence de transporteurs MXR. Voici les méthodes les plus utilisées dans les études environnementales.

Méthodes de mesure indirecte

La majorité des méthodes utilise la fluorescence. Le principe est le suivant : il s'agit d'exposer le tissu animal à un substrat fluorescent connu de la protéine de transport (exemple rhodamine) avec et sans inhibiteur de cette protéine (exemple vérapamil). L'accumulation de ce substrat fluorescent en présence d'un inhibiteur est considérée comme une preuve indirecte de l'activité de la protéine transporteuse cherchée. Parmi les outils mesurant la fluorescence citons le microscope en épifluorescence, le lecteur de microplaque en fluorescence, le spectrofluorimètre et le cytomètre en flux.

La microscopie en épifluorescence est une méthode très utilisée pour l'étude des transporteurs MXR. La quantification de la fluorescence se fait de plusieurs façons : couplage à un photosenseur et un voltmètre pour transformer la fluorescence émise en unités de fluorescence (Holland-Toomey et Epel 1993, Cornwall et al. 1995); utilisation de la photographie et le couplage au photosenseur (Holland-Toomey et Epel 1993) ou le traitement d'image avec le logiciel MetaMorph (Hamdoun et al. 2004).

Le lecteur de microplaque peut également être utilisé pour lire la fluorescence émise par l'accumulation des substrats séquestrés dans la cellule. La fluorescence du puits est normalisée selon le nombre de cellules viables (Marin *et al.* 2004). Cette méthode permet de traiter un maximum d'échantillons et, selon le type de lecteur, permet également d'établir une cinétique de transport.

Le spectrofluorimètre est également utilisé pour mesurer la fluorescence (Hamdoun *et al.* 2002, Essodaïgui *et al.* 1998). Cette méthode de mesure a l'avantage de pouvoir être utilisée pour déterminer la cinétique de transport grâce à une mesure continue de la fluorescence (Essodaïgui *et al.* 1998).

Pour finir, le cytomètre en flux est également un outil de mesure avantageux pour la quantification de la fluorescence induite dans une particule comme, par exemple, dans les œufs de nématodes et ainsi détecter la présence d'activité de transporteurs MXR (Kerboeuf *et al.* 2003).

Méthodes de mesure directe

L'analyse de transfert de type Western est également une méthode très répandue pour détecter directement la présence de protéines MXR. Cette méthode utilise des anticorps connus qui lient la protéine recherchée. Plusieurs anticorps sont disponibles et le plus utilisé est l'Ac C219 qui reconnaît une section très conservée commune à tous les transporteurs MDR (Achard *et al.* 2004, Endicott et Ling 1989, Minier *et al.* 1999, Roepke *et al.* 2006). Cet anticorps reconnaît ainsi toutes les Pgp sans distinction des isoformes (Bard 2000). L'utilisation de plusieurs anticorps est recommandée car l'Ac C-219 peut aussi réagir avec d'autres protéines qui utilisent de l'ATP (Hemmer *et al.* 1995).

Les outils de la biologie moléculaire sont également utilisés. L'analyse de transfert de type Northern par l'utilisation de sondes d'ARN hautement conservés par l'évolution peut également être mise à profit pour la détection de l'expression de transporteurs Pgp ou MRPs (Zaja *et al.* 2007).

1.6.5. La résistance aux xénobiotiques chez les échinodermes

Il y a peu d'information sur la résistance aux xénobiotiques chez les échinodermes, et les données disponibles proviennent majoritairement des gamètes, des embryons et des larves d'oursins. Alors qu'il n'y a qu'une activité très faible de la Pgp, les embryons de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* présentent plutôt un phénomène MXR relié à la présence d'une protéine de type MRPs. Les analyses de PCR en temps réel ont également révélé dans les œufs la présence de deux gènes codant pour des protéines semblables à une MRP (mrp2 et 5) (Hamdoun *et al.* 2004). Roepke et co-auteurs (Roepke *et al.* 2006) ont également démontré la présence d'une protéine de type Pgp (ABCB) et de type MRP (ABCC) dans les œufs et les oocytes d'étoiles de mer (*Asterina miniata* et *Pisaster ochraceous*) en utilisant des méthodes de mesures directes (transfert de type Western) et indirectes (mesure de l'incorporation de colorants fluorescents). Dans les deux études, la présence de protéines MXR a été reliée à la protection des œufs ou des larves contre des molécules toxiques. À notre connaissance, aucune information n'est disponible sur le concombre de mer.

1.7. OBJECTIF GÉNÉRAL

Dans notre laboratoire, des études menées sur l'étoile de mer *L. polaris* ont démontré que cette espèce tolérait de fortes doses de contaminants comme les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et le TBT (tributylétain) (Békri et Pelletier 2004, Doussantousse 2005, Le Breton 2002). Une exposition à un sédiment contaminé aux métaux et aux biphényles polychlorés ainsi qu'une exposition à une diète contaminée en cadmium a induit une diminution de la phagocytose et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans les cœlomocytes de l'astérie *Asterias rubens* (Coteur *et al.* 2005, Coteur *et al.* 2003). Cet effet sur le système immunitaire peut conduire à l'incapacité

de cette étoile à se débarrasser de bactéries causant une infection (Coteur *et al.* 2005). Hernroth et co-auteurs (Hernroth *et al.* 2011) ont démontré qu'une acidification des océans telle que prévu en 2100 aurait également pour effet de réduire l'activité phagocytaire chez *A. rubens*, compromettant ainsi la résistance aux pathogènes. Chez l'oursin, beaucoup d'études toxicologiques ont été réalisées sur les embryons et les larves. Par exemple, le naphthalène, le fluorène et le pyrène n'ont démontré aucune toxicité sur la croissance des larves d'oursins (Bellas *et al.* 2008) tandis que le phénanthrène a eu un effet important sur la croissance des larves et sur les gonades d'oursins (Bellas *et al.* 2008, Schafer et Kohler 2009). À notre connaissance, aucune étude écotoxicologique n'a été menée sur les cœlomocytes d'échinidés ni d'holothurie.

Travailler en écotoxicologie sur les cœlomocytes des échinodermes, responsables du système immunitaire de l'organisme, offre plusieurs avantages. Tout d'abord, l'impact de la contamination sur une population adulte peut être évalué via son système immunitaire étant donné l'importance de ce dernier pour la survie d'une population. On peut directement travailler sur les cœlomocytes sans sacrifier l'animal puisque celles-ci se prélèvent à l'aide d'une seringue comme le sang des vertébrés (Fig. 1.6). Pour finir, les quelques études toxicologiques menées sur les échinodermes permettent de se rendre compte de l'intérêt de développer une telle connaissance et du potentiel de développement d'un biotest avec les cœlomocytes comme indicateur de stress environnemental (Pinsino *et al.* 2008). Le caractère inductible des transporteurs MXR pourrait permettre de faire une distinction entre les sites contaminés et les sites moins contaminés (Bard *et al.* 2002, Minier *et al.* 1999). Une forte présence en transporteurs MXR indiquerait la présence de chimiosensibilisateurs et ainsi ciblerait les sites plus sensibles à la contamination (Pain et Parant 2007).

À la lumière des connaissances disponibles sur les transporteurs MXR, il semble raisonnable d'émettre l'hypothèse que les échinodermes possèdent également une activité MXR chez les adultes. Cependant, les connaissances limitées sur les cœlomocytes

d'échinodermes soulèvent plusieurs questions précédant toutes les autres. Par exemple, les protéines MXR étant des protéines transmembranaires, la question de l'activité de ces protéines en hiver survient très rapidement. Les échinodermes ont-ils une capacité à s'ajuster à la température afin de maintenir le fonctionnement de leurs cellules ? Aussi, quel est le rôle de ces transporteurs dans la protection des organismes face au mélange complexe de contaminants présent dans l'environnement ? Étant donné l'intérêt et l'importance des cœlomocytes autant pour l'organisme (système circulatoire responsable, entre autres, du système immunitaire) que pour l'écotoxicologue (outils potentiels d'évaluation de la santé d'une population), la résistance aux xénobiotiques dans ces cellules est au cœur de ce projet de thèse.

L'objectif général de ce projet est d'étudier le mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques dans les cœlomocytes d'échinodermes adultes présents dans le golfe et l'estuaire du Saint-Laurent en présence de facteurs de stress. Plus spécifiquement, nous avons étudié deux facteurs de stress environnementaux, la température et la contamination (un HAP et un organométal).

Afin de répondre à cette préoccupation générale, trois objectifs spécifiques ont été définis :

1 Démontrer la présence d'un mécanisme MXR dans les cœlomocytes d'échinodermes adultes (*L. polaris*, *S. dræbachiensis* et *C. frondosa*).

#2 Étudier le comportement physiologique des cœlomocytes de l'étoile de mer, *L. polaris* et de l'oursin, *S. dræbachiensis*, lors d'un stress de température.

3 Évaluer le stress toxique du phénanthrène seul et en combinaison avec un composé butylétain et d'évaluer le rôle potentiel de la résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR) grâce aux cœlomocytes de *L. polaris*.

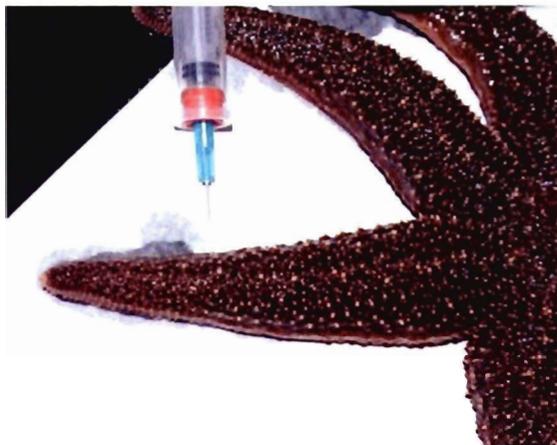


Figure 1.6 Prélèvement de liquide cœlomique sur *Leptasterias polaris* (Photo : Claude Nozères)

1.8. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET STRUCTURE DE LA THÈSE

1.8.1. Objectif 1

Le premier objectif était de démontrer la présence d'un mécanisme MXR dans les cœlomocytes d'échinodermes (*L. polaris*, *S. dræbachiensis* et *C. frondosa*). L'hypothèse de départ était qu'un mécanisme de protection MXR était présent dans les cœlomocytes des échinodermes. Cela fait l'objet du deuxième chapitre intitulé « La résistance cellulaire aux xénobiotiques dans les cœlomocytes de trois espèces d'échinodermes ».

Une fois la démonstration de l'activité MXR réalisée dans les cœlomocytes, les deux facteurs de stress choisis ont été : la température (chapitre 3) et le stress toxique (chapitre 4). Le schéma (Fig. 1.7) présente la structure de thèse.

1.8.2. Objectif 2

Le deuxième objectif était d'étudier le comportement physiologique des cœlomocytes de l'étoile de mer, *L. polaris* et de l'oursin, *S. dræbachiensis*, lors d'un stress thermique. L'hypothèse générale était que les organismes répondent, dans une certaine mesure, à la variation de température en modifiant les lipides membranaires des cœlomocytes. Cela fait l'objet du troisième chapitre intitulé « Effet d'un accroissement de la température sur la physiologie et le remaniement lipidique des cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* ». Ainsi, en remodelant les lipides, l'environnement membranaire des transporteurs MXR serait maintenu leur permettant d'assurer leur fonction protectrice.

1.8.3. Objectif 3

Le troisième objectif était d'évaluer le stress toxique du phénanthrène seul et en combinaison avec un composé butylétain dans les cœlomocytes de l'étoile de mer polaire, *L. polaris*. Nous avons également pour objectif d'aborder le rôle potentiel de la résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR). Notre hypothèse était que le phénanthrène et/ou le tributylétain modifierait le transport des protéines MXR. Cela fait l'objet du quatrième chapitre intitulé « Effet combiné du phénanthrène et des butylétains et rôle de la résistance aux xénobiotiques dans la toxicité observée sur les cœlomocytes de *L. polaris* ».

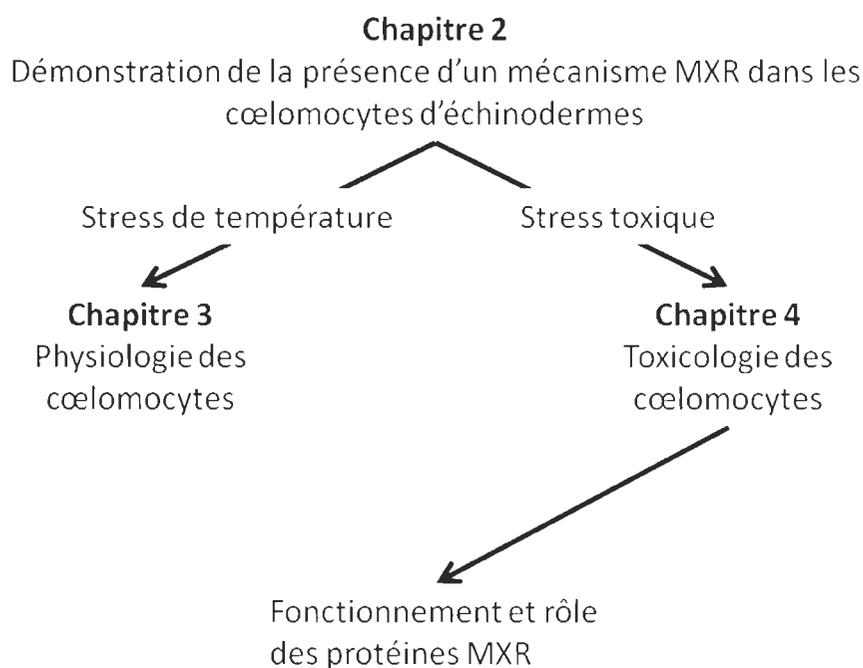


Figure 1.7 Schéma de thèse

CHAPITRE 2

RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES DANS LES CŒLOMOCYTES DE TROIS ESPÈCES D'ÉCHINODERMES

MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE IN CŒLOMOCYTES FROM THREE ECHINODERM SPECIES

Émilie Doussantousse, Émilien Pelletier, Lucie Beaulieu, Louis-Charles Rainville et
Claude Belzile

Aquatic Biology (2011) Vol. 12 p.81-96

Une version abrégée de cet article a été présentée au *5th North American Echinoderm Conference* à Melbourne (Floride, É.-U.) en juillet 2008 et le résumé de la conférence (*Multixenobiotics resistance in cœlomocytes of two echinoderms species*) a été publié dans *Conference Abstract for the Fifth North American Echinoderm Conference*. 20 to 25 July 2008. Florida Institute of technology, Melbourne, Florida, USA. Gulf of Mexico Science (2008) [2009] 26(2):136-170.

2.1.RÉSUMÉ

La résistance aux xénobiotiques (MXR) est présente dans tous les organismes vivants mais très peu d'études ont été effectuées sur les échinodermes, en particulier leurs cœlomocytes. L'objectif de cette étude était de démontrer la présence d'activité MXR dans les cœlomocytes de l'oursin vert *Strongylocentrotus dræbachiensis*, de l'étoile de mer polaire *Leptasterias polaris*, et du concombre de mer commun *Cucumaria frondosa*. Les cellules ont été exposées à des substrats fluorescents (1 µM Rhodamine B [RB] ou 0.5 µM Calcein-AM [CAM]) avec et sans inhibiteurs (50 µM Verapamil [Ver], 5 µM Cyclosporine-A [CsA] et 5µM Mk571 [Mk]). La fluorescence cellulaire a été mesurée au cytomètre en flux. Une augmentation de la fluorescence a été observée avec les combinaisons RB + CsA et RB + Ver dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* et *L. polaris* cœlomocytes, ainsi que les cellules vibratiles de *S. dræbachiensis*. Une augmentation de la fluorescence a également été observée avec la combinaison RB + Mk dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* et *C. frondosa*. Enfin, une diminution de la fluorescence a été mesurée avec la combinaison CAM + Mk dans les cœlomocytes de *L. polaris* et les cellules vibratiles de *S. dræbachiensis*. Ces résultats confirment la présence d'une activité MXR dans les cœlomocytes probablement due à la présence de transporteurs de type-P-glycoprotéine et associés à la résistance aux multiples médicaments (MRPs). L'analyse de transfert de type Western (Ac C219 et Ac C9) a également permis de démontrer la présence de transporteurs MXR (Pgp et MRP) sans toutefois discriminer l'une ou l'autre des protéines. Une activité MXR a donc été démontrée dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* et *L. polaris* et *C. frondosa* même si l'identité des protéines en cause reste à confirmer.

Mots clés: Résistance aux xénobiotiques (MXR), Échinodermes, Cœlomocytes, P-glycoprotéine (Pgp), Protéine de résistance aux multiples médicaments (MRPs)

2.2. ABSTRACT

MultiXenobiotic Resistance (MXR) proteins are known to be present in most living organisms but only a few studies were conducted on echinoderms and especially on their circulating cells, the cœlomocytes. The objective of this study was to investigate the presence of MXR activity in cœlomocytes of sea urchin *Strongylocentrotus dræbachiensis*, the sea star *Leptasterias polaris* and the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. Cells were exposed to fluorescent substrates (1 µM Rhodamine B [RB] or 0.5 µM Calcein-AM [CAM]) with or without inhibitors (50 µM Verapamil [Ver], 5 µM Cyclosporine-A [CsA] and 5µM Mk571 [Mk]) and single-cell fluorescence was measured by flow cytometry. The combinations RB + CsA and RB + Ver induced a fluorescence increase in *S. dræbachiensis* and *L. polaris* cœlomocytes, as well as in *S. dræbachiensis* vibratile cells. The combination RB + Mk induced a fluorescence increase in *S. dræbachiensis* and *C. frondosa* cœlomocytes. Finally, the combination CAM + Mk induced a fluorescence diminution in *L. polaris* cœlomocytes and *S. dræbachiensis* vibratile cells. This difference in fluorescence incorporation indicated an MXR-like activity in cœlomocytes, probably due to the presence of a P-glycoprotein (Pgp) and a multidrug resistance-associated protein (MRP)-like transporter. Western blot analysis was also carried out (Ab C219 and Ab C9) in order to detect potential MXR proteins using anti-MXR antibodies. Both Pgp and MRP were detected but could not be further discriminated. MXR activity was clearly demonstrated in cœlomocytes of *S. dræbachiensis*, *L. polaris* and *C. frondosa* although the identity of proteins responsible for this activity needs to be confirmed.

Keywords

Multixenobiotic resistance (MXR), Echinoderms, Cœlomocytes, P-glycoprotein (Pgp), Multidrug resistance-associated proteins (MRPs)

2.3. INTRODUCTION

The way in which organisms handle xenobiotics is of prime importance for their survival in the environment. One of the key cellular processes is biotransformation, a metabolic process facilitating the excretion of potentially toxic molecules. Located upstream and downstream to that process, multixenobiotics resistance (MXR) is part of a large “cellular housekeeping system” that handles toxic molecules. This excretion mechanism is highly dependent upon non-specific transporters using ATP to expel toxic moieties and residues (Epel, 1998). MXR proteins can transport a wide range of metabolites and xenobiotics through the cell membrane resulting in a lower intracellular concentration of xenobiotics and thus a lower toxic potential, and playing a key role in regulating cellular and tissular levels of toxic agents (Ambudkar *et al.* 1999). Several proteins are involved in xenobiotics resistance but the most studied ones in an environmental context are the P-glycoprotein (Pgp) and proteins from the Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs) family.

Pgp is known to be the primary active transporter of unmodified xenobiotics (Zaja *et al.* 2007), transporting mostly large and moderately hydrophobic cations (Litman *et al.* 2001). It is widely distributed in tissues and has a variety of physiological roles in healthy cells, such as lipid transport, intracellular cholesterol trafficking and the cytotoxic activity of NK and T cells (Johnstone *et al.* 2000). Among the MRPs family, MRP1 facilitates the extrusion of numerous glutathione, glucuronate and sulfate conjugates. MRP1 is a ubiquitous protein taking part in various physiological functions including defence against xenobiotics and endogenous toxic metabolites, leukotriene-mediated inflammatory responses as well as protection from the toxic effects of oxidative stress (Bakos and Homolya 2007).

A combination of substrates and inhibitors is often used to indicate MXR activity (Cornwall *et al.* 1995, Marin *et al.* 2004, Neyfakh 1988). Since some substrates and

inhibitors are more specific to one MXR protein than to another, it is sometimes possible to discriminate among the proteins involved. For example, Rhodamine B (RB) is often used as a Pgp substrate (Minier et Moore 1996, Reungpatthanaphong *et al.* 2003, Zaja *et al.* 2006), and a similar molecule, Rhodamine 123, is used as a Pgp- and MRPs-like substrate (Daoud *et al.* 2000, Hollo *et al.* 1996). Calcein-AM (CAM) is also known as a substrate for both Pgp-like and MRPs-like proteins, but calcein, its fluorescent hydrolysis product, is only a substrate for MRPs-like transporters (Essodaïgui *et al.* 1998, Hollo *et al.* 1996). Among the inhibitors, cyclosporin-A (CsA) is a competitive Pgp inhibitor interacting with the active site of Vinca alkaloids (Saeki *et al.* 1993, Tamai et Safa 1990). Specifically, CsA is an ATPase inhibitor and induces the perturbation of substrate recognition (Ambudkar *et al.* 1999). The verapamil (Ver) involvement in drug resistance has also been known for a long time (Willingham *et al.* 1986). Ver stimulates Pgp ATPase activity (Müller *et al.* 1996) as it is transported by Pgp proteins (Romsicki et Sharom 1999). Although it plays the role of a substrate, Ver is considered as an inhibitor as it rapidly re-enters the cell after being exported and can, thus, effectively compete with the export of other endogenous or exogenous substrates (Eytan *et al.* 1996). Although CsA and Ver are not fully specific inhibitors of Pgp, as they also interact with MRPI at micromolar concentrations (Haimeur et al. 2004), they are still widely used as reference compounds to detect Pgp activity (Kagan *et al.* 2010). The last inhibitor to be used in this study, was MK571 (Mk), a leukotriene D₄ receptor antagonist and itself a glutathione conjugate. MK is the best example of a class of modulators that are generally specific to the MRP-related transporters but not to a certain MRP (Haimeur *et al.* 2004).

The drug resistance phenomenon has been known for a long time in cancer research (Biedler *et al.* 1975, Foxwell *et al.* 1989, Kessel *et al.* 1968). Drug resistance in some cases of cancer is caused by the overexpression of one or several proteins, leading to the failure of chemotherapy. The main drug resistance proteins are Pgp, the MRP family and breast cancer resistance proteins (BCRPs) (Haimeur *et al.* 2004). These proteins are also present in healthy cells and the resistance mechanism is widespread among mammals (Johnstone *et al.* 2000) but also in fish (Hemmer *et al.* 1995), insects (Dressen *et al.* 1988), molluscs and

worms (Cornwall *et al.* 1995, Holland Toomey et Epel 1993, Köhler *et al.* 1998), echinoderms (Hamdoun *et al.* 2004), as well as vascular plants and unicellular algae (Dudler et Hertig 1992, Scherer *et al.* 2008). From an evolutionary perspective, Pgp and MRPs are well preserved (Bard 2000, Minier *et al.* 1999). MRPs only have a 15% amino acid homology with Pgp (Smital *et al.* 2004).

Major MRP activity and minor Pgp activity were observed in the fertilised eggs and embryos of sea urchin *Lytechinus anamesus*, where electrophoresis analysis revealed 2 genes coding for reference proteins similar to human MRPs (Hamdoun *et al.* 2004). To our knowledge, this is the only documented mention of a MXR mechanism in an echinoderm species.

Echinoderms occupy a special place in evolution, and they remain enigmatic, even with recent progress in the study of species evolution (Smith 2008). Based on their embryonic development features, they are deuterostomes like the chordates, but their evolutionary paths have been distinct for hundreds of millions of years. Echinoderms are mostly stenohaline organisms and are found at all depths and salinities. The species studied here are common in the estuary and gulf of St. Lawrence River, Canada: the green sea urchin *Strongylocentrotus dræbachiensis* (class of echinoids), the 6-armed sea star *Leptasterias polaris* (class of asteroids), and the common sea cucumber *Cucumaria frondosa* (class of holothurians). There is limited information on the way echinoderms handle xenobiotics, and on the role of their cœlomocytes. The aim of the present study was to investigate the presence of a MXR-like mechanism in echinoderms living in a northern cold environment, as year-around low temperatures may induce some particular behaviours. The search for MXR proteins has been conducted in cœlomocytes sampled from adult organisms. Most echinoderms have large and extensive body cavities filled with cœlomic fluid and circulating cœlomocytes. At least 6 types of cœlomocytes have been identified but all types are not present in all species (Chia et Xing 1996), not even in all specimens of the same species from the same environment (Xing *et al.* 2008). Most of them are classified as either phagocytes (called amœbocytes), spherule cells, progenitor cells, hæmocytes,

vibratile cells and crystal cells. Cœlomocytes are of prime importance for echinoderms, as they are responsible for the immune system, clot formation, transport of nutrients, gas exchange, nutrient storage, graft rejection, and clumping and encapsulation of foreign bodies (Edds 1993).

2.4. MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Animals and sampling cœlomocytes

Echinoderms (*L. polaris*, *S. dræbachiensis*, *C. frondosa*) were sampled in St. Lawrence Estuary and kept in flow-through tanks for the summer (June to mid-October) at the ISMER aquaculture laboratory (Rimouski, Quebec, Canada). *L. polaris* and *S. dræbachiensis* were fed *ad libitum* twice a week with *Mytilus sp.* and *Laminaria sp.*, respectively, whereas a cocktail of microalgae (*Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis sp.*) was given to *C. frondosa*. The water temperature varied from 0 to 12°C, following seasonal conditions, and salinity was nearly constant at 31.

Cœlomic fluid containing cœlomocytes was withdrawn (2.5 mL) into a 5-mL syringe (caliber 23) half pre-loaded with ice-cold calcium- and magnesium-free artificial sea water containing 50 mM EDTA (Békri et Pelletier 2004). Cœlomic fluid portions from 9 organisms (with no sex distinction) were pooled to avoid inter-individual variability and to obtain enough cells for each experiment. Samples were always obtained in the morning to minimize daily physiological variation and all experiments were repeated 3 times (i.e. 3 different pools of cœlomic fluid were used for each treatment). Cœlomic fluid was filtered on a 40 µm cell nylon strainer from VWR Canlab to remove debris and agglomerated cells. The cell concentration was determined using a hæmocytometer (Bright-Line, Neubauer) in light microscopy at 20X magnification.

2.4.2 Chemicals

CsA, RB, Ver, tetrazolium, 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide salt, (MTT), DMSO and Coomassie blue (R-250) were purchased from Sigma-Aldrich. CAM was obtained from VWR Canlab. Mk was obtained from Cayman Chemicals. Focus protease arrest and recombinant murine C10/CCL6 antibody were purchased from Biolynx. Human P-glycoprotein (Pgp/MDR1) membranes and mouse anti-MRP1 monoclonal antibody C9 were obtained from Pharmigen BD Biosciences. Mouse anti-Pgp monoclonal antibody C219 was obtained from Calbiochem (VWR). Standard ovalbumin was purchased from Fisher-Scientific. Mk, CAM and CsA stock solutions were prepared in DMSO. Final DMSO concentrations never exceeded 0.01%. Sea water from the aquaculture laboratory was filtered through 0.2 µm mesh to obtain filtered sea water (FSW) conserved at 4°C for a maximum of 5 d. MTT solution was prepared in FSW.

2.4.3 Cytotoxicity test

Cytotoxicity of reagents was tested with the microculture tetrazolium MTT assay, which is a first choice for assessing the viability of adherent cells (Lindl *et al.* 2005) like cœlomocytes. The yellow tetrazolium MTT is reduced by metabolically active cells, in part by the action of dehydrogenase enzymes, to generate the reducing equivalents of purple formazan. The method was adapted for cœlomocytes according to the protocol developed for blue mussel hæmocytes (Marin *et al.* 2004).

Cœlomocytes were exposed to 3 concentrations of CAM (or RB) with or without inhibitors (Ver, CsA or Mk) to test cell toxicity of these treatments. Cells (600 000) were deposited on a 96-wells microplate (12 wells treatment⁻¹) for 1 h at 10°C in the dark. Free cells were washed out by aspiration of overlaying coelomic fluid, and only adhered cells were exposed for 2 h to substrate solution with or without inhibitors in FSW. Substrates and inhibitors were then removed, and wells were rinsed with FSW. Wells were filled with MTT solution in FSW (final concentration 0.5 mg/mL) for 2 h at 10°C. MTT solution was washed out with FSW, and DMSO was added to wells to dissolve formazan crystals formed

in adhering cells (Twentyman et al. 1987). Absorbance was recorded with Spectrafluor Plus microplate spectrometer (Tecan®). The ratio between absorbance measured at 535 nm and 700 nm was used as a measure of cell viability, to avoid variability due to medium quenching and background level from a variation of the number of cells in each well (Supino 1995).

2.4.4 MXR assay

Determination of MXR activity is based on the use of model MXR inhibitors and substrates. The choice of substrates and inhibitors was made according to their affinities for MXR-like proteins, as previously reported by many authors (Essodaïgui *et al.* 1998, Haimeur *et al.* 2004, Litman *et al.* 2001). RB and CAM were used as model substrates, each in combination with 3 inhibitors: Ver, Mk and CsA. Based on the results of the cytotoxicity tests described above, the RB concentration was 1 μM and CAM concentration was 0.5 μM . Inhibitor concentrations were 50 μM for Ver and 5 μM for CsA and Mk. Cells were exposed 2 h to substrates with or without inhibitors (total 3 mL) in the dark and in FSW, before individual cell fluorescence measurements were carried out by flow cytometry (FCM). Treatments were done in triplicate, and each experiment was repeated 3 times.

Dose-response curves were obtained for the inhibitors and the transport of substrates. For the inhibition of transport, the substrate concentration was fixed at 1 μM for RB and 0.5 μM for CAM. The concentration of each inhibitor ranged between 0 and 10 μM . No inhibitor was used for the transport of substrates. The substrate concentration was between 0 and 1 μM for CAM and 0 and 4 for RB. The MXR activity measurement was as described above, done in triplicate for each combination. Only *L. polaris* and *S. dræbachiensis* were used for the dose-response work.

2.4.5 Flow cytometry

Single-cell fluorescence was measured by FCM; 1.9 μm Fluoresbrite beads (Polysciences) were added to each tube as an internal standard. Cells were analyzed with an Epics Altra® flow cytometer (Beckman Coulter, Ontario, Canada) fitted with a 488 nm laser operated at 15 mW. The fluorescence of MXR substrates was measured at 525 ± 20 nm for CAM and 575 ± 20 nm for RB. The data were analyzed using Expo32 v1.2b software (Beckman Coulter). Forward scatter (FS) versus side scatter (SS) plots were used to identify cœlomocyte types (see Fig. 2.1). The average fluorescence of cells with FS and SS signals typical of healthy cells was measured and expressed relative to the fluorescence of the Fluoresbrite beads. The measured cell fluorescence was corrected by subtracting the natural auto-fluorescence of cells measured without CAM or RB addition; this auto-fluorescence represented between 0.05 and 18 % of the fluorescence of the stained cells but generally $< 10\%$.

2.4.6 Light and epifluorescence microscopy

The concentration of fluorescing calcein inside organelles in *L. polaris* cœlomocytes (see Discussion: Calcein incorporation) was verified by epifluorescence microscopy. Cœlomocytes were exposed to 0.5 μM CAM with and without MK for 3 h in the dark at 10°C. Differential interference contrast (DIC) and epifluorescence (Ex 450-490, Em BP 515-565) images were acquired with an Axio Observer Z1 inverted microscope (Carl Zeiss) fitted with an AxioCam MRc5 color camera.

2.4.7 Total proteins analysis, SDS-PAGE and Western blot analysis

After counting cells, cœlomic fluid was centrifuged at $500 \times g$ for 8 min at 4°C. Pelleted cells were resuspended in 9 mL Tris buffer (250 mM, pH7 and pre-filtered through 0.2 μm membrane) containing 1% focus protease arrest. Cells were disrupted by a brief

sonication, followed by centrifugation at $14\,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The supernatant was conserved, and total proteins were determined using the Coomassie Plus Protein Assay kit from Pierce (Thermo Scientific). Bovine serum albumin (BSA) was used as the standard (Fraction V, Thermo Scientific). All samples were stored at -40°C until analysis.

Samples were subjected to SDS-PAGE electrophoretic transfer to nitrocellulose and immunoblotting procedures for the detection of Pgp/MDR1 and MRP1. Haemocyte samples from *Mytilus sp.* were used as a positive control since Pgp activity has been demonstrated in these cells (Marin *et al.* 2004). Pgp/MDR1 membranes and recombinant murine C10 (MRP1) were used as positive controls, while ovalbumin (0.2 µg) was used as negative control. SDS-PAGE was performed under reducing conditions using NUPAGE™ 4-12% Bis-Tris precast gels (Invitrogen) on a X-Cell Sure Lock Mini Cell system (Invitrogen). Of the total proteins, 1 and 3 µg were loaded on the gel for each sample. The protein bands were visualized by silver staining (Silver Staining Plus kit, Bio-Rad). Following electrophoresis, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Bio-Rad) at 130 mA for 60 min using transfer buffer (Invitrogen) with the Xcell II blot module. The membrane was blocked overnight at 4°C with 3% non-fat dry milk phosphate-buffered saline (PBS) solution from Amplified Opti-4CN Detection Kit (Bio-Rad). After 2 washes with 0.1% Tween-20 in PBS (PBST), the membrane was incubated for 1 h at ambient temperature with mouse anti-Pgp monoclonal antibody C219 (146 µg mL⁻¹) or mouse anti-MRP1 monoclonal antibody C9 (250 µg mL⁻¹) in PBST-BSA 1% solution. Each antibody recognizes a preserved sequence. C219 recognizes the sequence VQEALD and VQAALD (Calbiochem, VWR) and C9 recognizes particularly the amino acids sequence between 864 and 952 (Pharmigen BD Biosciences). After 4 washes with PBST, the membrane was incubated for 1 h at ambient temperature with a goat anti-mouse-IgG-HRP Amplified Opti-4CN Detection Kit (Bio-Rad, Ontario, Canada) in PBST-BSA 1% (dilution 10 000 times). After few washes with PBST, the membrane was incubated with Streptavidin-HRP (Bio-Rad) in PBST-BSA 1% solution. Color was detected according to the Opti-4CN Detection Kit protocol (Bio-Rad). Pictures were taken with Alpha-Digidoc system from Alpha Innotech (Fisher Scientific).

2.4.8 Mass spectrometry analysis

For each sample, 14 μg of total proteins were loaded on 2 gels for electrophoresis with the above conditions. On the first gel, the protein bands were visualized by Coomassie (G-250, Bio-Rad). On the second one, immunotransfer was done under the conditions described above. In order to obtain protein identification by mass spectrometry, bands of interest were excised from the gel using a scalpel, placed in an Eppendorf tube and stored in pure water. MS analysis was done using a proteomic platform by Centre g nominique de Québec (Quebec, Canada). The excised protein spots were digested with trypsin using MassPrep liquid handling robot (Waters) according to the manufacturer's specifications and the protocol by Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.* 1996) with some modifications suggested by Havlis *et al.* (Havlis *et al.* 2003). Briefly, the excised spots were destained with 50 μL of 50 mM ammonium bicarbonate and 50 μL acetonitrile, washed once with 50 μL of 100 mM ammonium bicarbonate and then dehydrated with 50 μL of acetonitrile. The proteins were subsequently reduced in gel with 10 mM DTT for 30 min at 37°C and alkylated with 55mM iodoacetamide for 30 min at room temperature. Trypsin digestion was performed using 105 mM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 58°C for 1h. The digested proteins were extracted twice first with 30 μL of 1% formic acid /2% acetonitrile followed by 12 μL 1% formic acid/50% acetonitrile.

The recovered peptide extracts were pooled, dried by vacuum centrifuge and resuspended in 5 μL of 0.1% formic acid. Peptides were analyzed for protein identification by mass spectrometry.

The digested protein samples were introduced into a tandem mass spectrometer, LTQ linear ion trap (ThermoFisher) equipped with a Thermo Surveyor MS pump (ThermoFisher) using a PicoFrit column BioBasic C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter, (New Objective) at a flow rate of 200 nL min^{-1} , with a linear gradient from 2% acetonitrile in 0.1% formic acid to 50% acetonitrile in 0.1% formic acid over 30 minutes. Tandem mass spectrometry (MS/MS) spectra were acquired by Xcalibur software version 2.0 (ThermoFisher) using a data-dependent acquisition mode. The MS survey scan was 400

to 2000 m/z and was followed by collision-induced dissociation of the 7 most intense ions for the LTQ. The internal parameter was set to 30 sec for dynamic exclusion, and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%.

All MS/MS spectra were analyzed using Mascot (Matrix Science) for peptide identification. Mascot was set up to search the Uniref100_12_7_Eukaryota_2759 database assuming the digestion enzyme trypsin. The following search criteria were used: 2 missed cleavages, the iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification and the oxidation of methionine was specified as a variable modification. Peptide tolerance was 2.0 Da for the precursor and 0.5 Da for MS/MS. The Mascot score corresponded to $10 \times \log(p)$, where p is the probability that the observed match with a given MS/MS spectra is a random event. A high score indicates identity of extensive sequence homology.

2.4.9 Statistical analysis

Data analysis and graphs were performed using SYSTAT 12 and SIGMAPLOT 10 (Systat Software). All data were analyzed by 2-way ANOVA (experiments x treatments). Homogeneity of variances was tested using 1-way ANOVA on the absolute value of residuals. The normality of residuals was tested using Lilliefors' test. If the conditions were not met, ANOVA was performed according to the non-parametrical approach suggested by Conover (Conover 1980). In this case, ANOVA was done on ranked data (NP). To indicate a significant difference, p must be <0.01 . Post hoc Tukey' HSD was carried out.

2.5. RESULTS

2.5.1. Cell distribution in cœlomic fluid

Not all cœlomocyte types are present in all echinoderms, and their relative proportions may vary among species and with sampling periods. Only 1 population of cœlomocytes was observed in *L. polaris* by FCM (Fig.2.1A). This observation is consistent with previous reports (Kaneshiro et Karp 1980) since the phagocytic amœbocytes are the most abundant of circulating cœlomocytes in asteroids. Amœbocytes, red cells, and small flagellated cells can be observed by light microscopy in *S. dræbachiensis* (data not shown), but only 2 populations of cœlomocytes could be discriminated by FCM (Fig. 2.1B). We considered the small *S. dræbachiensis* vibratile cells as they are easy to distinguish from other the cœlomocytes (Fig. 2.1B). Although several cell types are present in *C. frondosa* cœlomic fluid (Noble 1970), only 1 general population of cells could be consistently discriminated and was considered to be cœlomocytes (Fig. 2.1C).

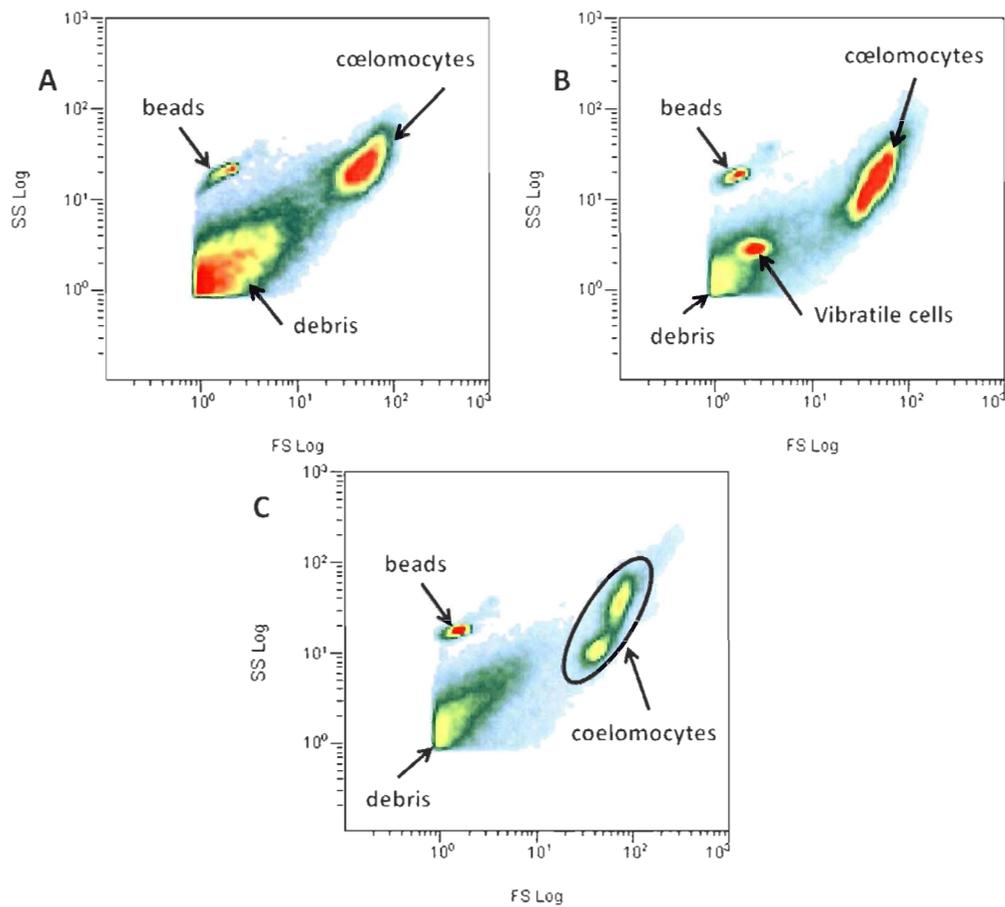


Figure 2.1 Flow cytometric signature of the coelomocytes of (A) *Leptasterias polaris*, (B) *Strongylocentrotus dræbachiensis* and (C) *Cucumaria frondosa* illustrated by density-plots of forward scatter (FS) vs. side scatter (SS). Warmer colors represent regions with higher density of cells

2.5.2. Cell viability

RB (1 μ M) with or without inhibitors, had no effect on the viability of *S. dræbachiensis* and *L. polaris* cœlomocytes, as measured by MTT (data not shown). CAM (0.5 μ M), with or without inhibitors, also had no effect on the viability of *S. dræbachiensis* cœlomocytes, as measured by MTT (data not shown). However, some combinations of CAM and inhibitors had a small, although statistically significant, effect on the viability of *L. polaris* cœlomocytes ($p < 0.001$; $R^2 = 0.491$; Table 2.1); CsA induced a decrease in viability at 10 μ M ($p = 0.004$) and 5 μ M ($p = 0.004$) and Mk induced a viability decrease at 10 μ M ($p = 0.007$). The cell concentration in *C. frondosa* cœlomic fluid was too low to carry out the microculture tetrazolium MTT assay. Taking into account the measured cell sensitivity and the concentrations commonly used in the literature, 50 μ M for Ver and 5 μ M for CsA and Mk were used in all experiments.

Table 2.1 Toxicity of Calcein-AM (CAM, 0.5 μM) on cœlomocytes of *L. polaris*. Cells were incubated with 1 μM substrate \pm Verapamil (Ver, 50, 30 and 10 μM), Mk 571 (Mk, 10, 5 and 1 μM) or Cyclosporin-A (CsA, 10, 5 and 1 μM). Cytotoxicity was measured with MTT in a microplate (500 000 cells) after 2 h in the dark at 10°C. All values are means (\pm SE). * $p < 0.01$ when compared to the control; (1-way ANOVA, Tukey post-hoc). FSW: filtered sea water

Treatment	Cell viability (ABS 535 nm / 700 nm)
FSW	2.47 \pm 0.07
CAM	2.55 \pm 0.12
Ver 50	2.62 \pm 0.15
Ver 30	2.41 \pm 0.14
Ver 10	2.49 \pm 0.08
CsA 10*	1.98 \pm 0.09*
CsA 5*	2.22 \pm 0.06*
CsA 1	2.15 \pm 0.09
Mk 10*	1.95 \pm 0.06*
Mk 5	1.95 \pm 0.11
Mk 1	2.00 \pm 0.07

2.5.3. Measurement of MXR-like activity by FCM

Rhodamine B

Treatments with inhibitors induced an increase of fluorescence in *S. dræbachiensis* cœlomocytes (NP-2-way ANOVA $p < 0.001$; $R^2 = 0.911$, Fig. 2.2A) and vibratile cells (NP-2-way ANOVA $p < 0.001$; $R^2 = 0.871$, Fig. 2C). All 3 inhibitors induced a significant fluorescence increase in *S. dræbachiensis* cœlomocytes ($p < 0.001$; $p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively), while only Ver and CsA induced an increase in vibratile cells (both $p < 0.001$).

Because there was a significant interaction between experiments and treatments in *L. polaris* cœlomocytes (NP-2-way ANOVA experiments x treatments: $p = 0.004$; $R^2 = 0.834$) data for different experiments are presented separately (Fig. 2B). Ver (Expt 1, post-hoc Tukey: $p = 0.007$) and Mk (Expt 2, post-hoc Tukey: $p = 0.002$) induced a significant increase of RB accumulation in one of the experiments. CsA induced an increase of RB accumulation in all experiments (Expts 1, 2 and 3, post-hoc Tukey: $p < 0.001$; $p = 0.008$; $p = 0.002$, respectively).

A significant interaction between experiments and treatments was also observed in *C. frondosa* cœlomocytes (2-way ANOVA experiments x treatments: $p = 0.001$; $R^2 = 0.946$), and data for different experiments are presented separately (Fig. 2.2D). Inhibitors induced an increase of RB accumulation, although not always in a statistically significant way. Ver induced a significant increase for 2 experiments (Expts 2 and 3, post-hoc Tukey: both $p < 0.001$). Mk induced a significant increase of RB accumulation for all experiments (Expts 1, 2 and 3, post-hoc Tukey: all $p < 0.001$). CsA induced an increase for 1 experiment (Expt 3, post-hoc Tukey: $p < 0.001$).

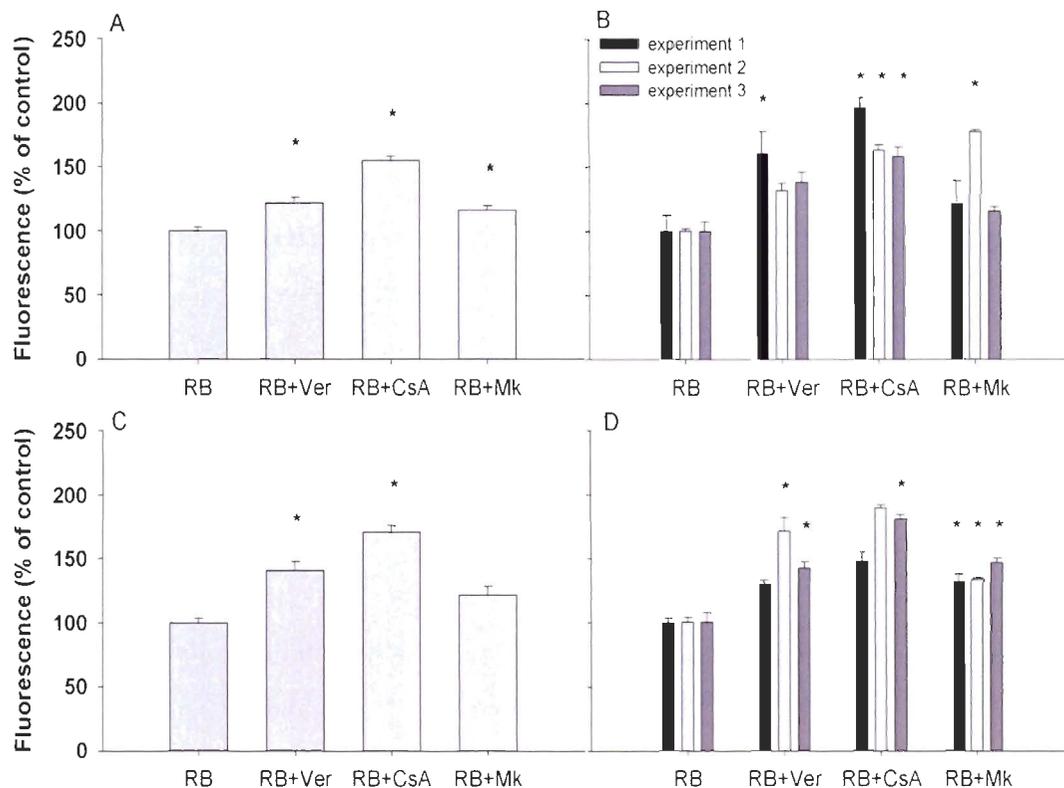


Figure 2.2 Flow cytometric measurement of fluorescent Rhodamine B (RB) in (A) cœlomocytes of *Strongylocentrotus dræbachiensis*, (B) cœlomocytes of *Leptasterias polaris*, (C) vibratile cells of *S. dræbachiensis* and (D) cœlomocytes of *Cucumaria frondosa*. Cells were incubated with 1 μ M RB \pm Verapamil (Ver, 50 μ M), Cyclosporine A (CsA, 5 μ M) or Mk571 (Mk, 5 μ M) for 3 h in the dark at 10°C. RB alone was used as the control. Values are mean (\pm SE) of 3 separate assays in which the treatment was done in triplicate (Panels A & C; 2-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments). Three separate assays were done, and values are mean (\pm SE) of triplicates of each treatment (Panels B & C; 2-way ANOVA, Tukey post-hoc on experiment x treatments). * p < 0.01 when compared to the control

Calcein-AM

Mk treatment had a significant effect on calcein fluorescence in *L. polaris* cœlomocytes (2-way ANOVA: $p < 0.001$; $R^2 = 0.683$) and *S. dræbachiensis* vibratile cells (NP-2-way ANOVA: $p < 0.001$; $R^2 = 0.792$) (Fig. 2.3B, C). Mk induced a significant decrease of calcein accumulation in *L. polaris* cœlomocytes (post-hoc Tukey: $p < 0.001$, Fig. 3B) and *S. dræbachiensis* vibratile cells (post-hoc Tukey: $P < 0.001$, Fig. 3C). None of the inhibitors had a significant effect on *S. dræbachiensis* (2-way ANOVA: $p < 0.001$; $R^2 = 0.919$, post-hoc Tukey failed, Fig. 3A) or *C. frondosa* (2-way ANOVA: $p = 0.028$, Fig. 3D) cœlomocytes, even if a decrease in fluorescence was apparent, but not significant, among definite criterion after MK treatment on *C. frondosa* cœlomocytes (post-hoc Tukey: $p = 0.031$). The incorporation of CAM in *L. polaris* cœlomocytes observed by epifluorescence microscopy revealed the presence of fluorescent granules inside the cœlomocytes when the cells were treated with the inhibitor MK, but also in the absence of the inhibitor (Fig. 2.4).

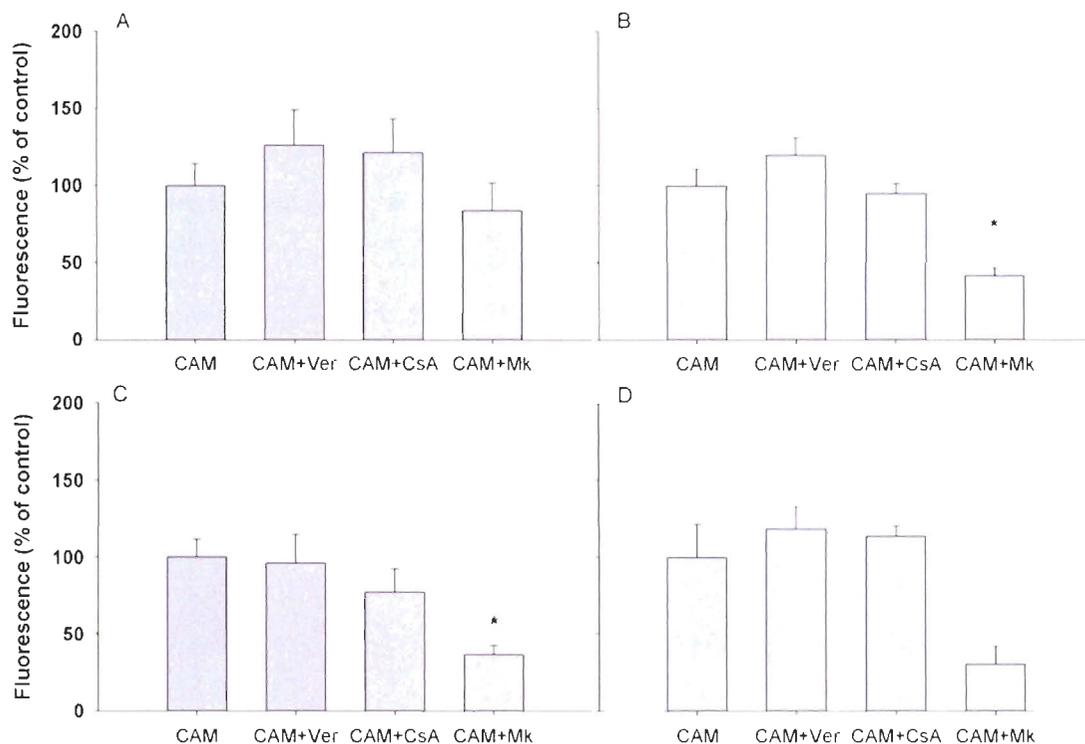


Figure 2.3 Flow cytometric measurement of fluorescent calcein in (A) cœlomocytes of *Strongylocentrotus dræbachiensis*, (B) cœlomocytes of *Leptasterias polaris*, (C) vibratile cells of *S. dræbachiensis* and (D) cœlomocytes of *Cucumaria frondosa*. Cells were incubated with 0.5 μ M Calcein-AM (CAM) \pm Verapamil (Ver, 50 μ M), Cyclosporine A (CsA, 5 μ M) or Mk571 (Mk, 5 μ M) after 3 h in the dark at 10°C. CAM alone was used as the control. All values are mean (\pm SE) of 3 separate assays in which the treatment was done in triplicate. * $p < 0.01$ when compared to the control (2-way ANOVA: Tukey post-hoc on treatments)

Dose-response measurements

Dose-response curves for the inhibition of substrate transport and for the transport of substrates are shown in Fig. 5. The inhibitor treatments had a significant effect on substrate fluorescence in *L. polaris* cœlomocytes (ANOVA: $p < 0.001$; $R^2 = 0.823$ [CsA, Fig. 2.5A] and $R^2 = 0.848$ [Mk, Fig. 2.5B]). The Mk concentrations of $5\mu\text{M}$ and $10\mu\text{M}$ (Fig. 2.5A) induced a significant decrease of calcein accumulation in *L. polaris* cœlomocytes (post-hoc Tukey: $p = 0.003$ and $p = 0.001$, respectively). The action of the inhibitors on substrate accumulation in *L. polaris* cœlomocytes is described by a hyperbolic decay for Mk ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.941$) and CsA ($p < 0.001$, $R^2 = 0.876$). CsA concentrations of $5\mu\text{M}$ and $10\mu\text{M}$ (Fig. 2.5B) induced a significant increase of RB accumulation in *L. polaris* (post-hoc Tukey: $p = 0.006$ and $p = 0.01$, respectively). The Mk treatment showed no statistically significant effect on CAM accumulation in *S. dræbachiensis* cœlomocytes (ANOVA: $p = 0.038$; $R^2 = 0.607$, Fig. 2.5A). The CsA treatment also had no significant effect on RB accumulation ($p = 0.026$; $R^2 = 0.639$, Fig. 2.5B). Even though no statistical differences were demonstrated by ANOVA in *S. dræbachiensis*, a clear tendency could be observed. Indeed, the action of the inhibitors on substrate accumulation was described by a hyperbolic decay for Mk ($p < 0.01$, $R^2 = 0.743$) and hyperbolic increase for CsA ($P < 0.01$, $R^2 = 0.769$) in *S. dræbachiensis* cœlomocytes. No vibratile cells in *S. dræbachiensis* cœlomic fluid were observed the day of this experiment. CAM transport (Fig. 2.5C) was described by a hyperbolic dose-response relationship in cœlomocytes of both *L. polaris* ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.877$) and *S. dræbachiensis* ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.974$). RB transport (Fig. 2.5D) was described by a linear dose-response relationship in cœlomocytes of *L. polaris* ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.997$) and *S. dræbachiensis* ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.987$). The fluorescence of vibratile cells was too low to be include in this figure. The fluorescence of *S. dræbachiensis* cœlomocytes was always lower than that the *L. polaris* cœlomocytes.

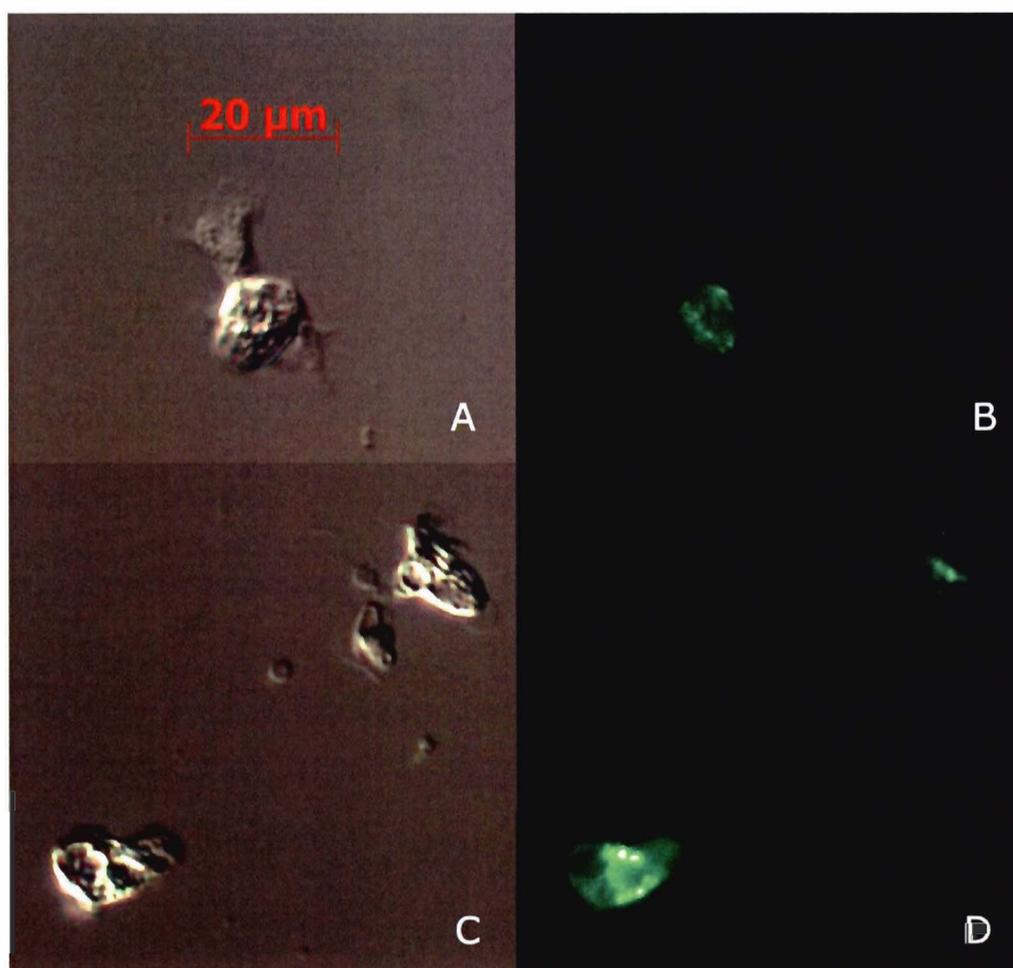


Figure 2.4 Differential Interference Contrast and epifluorescence microscopy images of *Leptasterias polaris* cœlomocytes incubated with 0.5 μM calcein-AM without inhibitor (A, B) and with the inhibitor MK571 (C, D)

2.5.4. Measurement of MXR-like proteins by SDS-PAGE and Western blot analysis

Sample proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by silver staining as well as by immunoblotting to detect the presence of MXR-like proteins (Figs. 2.6 & 2.7). The bands with a rapid and intense signal after staining of the PVDF membrane were associated with MXR-like proteins if their molecular weight corresponded to similar proteins analyzed in other animal species. The bands identified with an arrow in Figs. 2.6B & 2.7B corresponded to these criteria. As illustrated in Fig. 2.6A, silver staining highlighted many more proteins in echinoderm samples than in the bivalve *Mytilus sp.* Using the anti-MRP1 monoclonal antibody C9, 3 main protein bands were observed in echinoderm samples, while only 2 were visible in *Mytilus sp.* samples (Fig. 2.6B; indicated by arrows). The molecular weights of the 3 main protein bands in *S. droebachiensis* were >191, 100 and 65 kDa, respectively. Comparatively, the stained bands were 190, 100 and 40 kDa in *L. polaris* and *Cucumaria frondosa* extracts. In *Mytilus sp.*, they were 100 and 40 kDa. The signal detected from the control recombinant murine C10 was weak (Fig. 2.6B; circled band). Use of the C219 anti-MDR1 antibody allowed the detection of 3 main bands in echinoderms and 2 main bands in *Mytilus sp.* (Fig. 2.7B; indicated with arrows). The observed bands have the same apparent mass as those detected using the anti-MRP1 antibody (>191, 100 and 65 kDa for *Strongylocentrotus droebachiensis*; 190, 100 and 40 kDa for *Leptasterias polaris* and *Cucumaria frondosa*). The same concordance between detected bands was observed in *M. edulis*. The 2 antibodies thus appear to have identified the same bands. In the positive control (human membrane preparation containing Pgp), the antibody C219 anti-MRP1 detected proteins of 100, 65 and 40 kDa (Fig. 2.7; Lane 2).

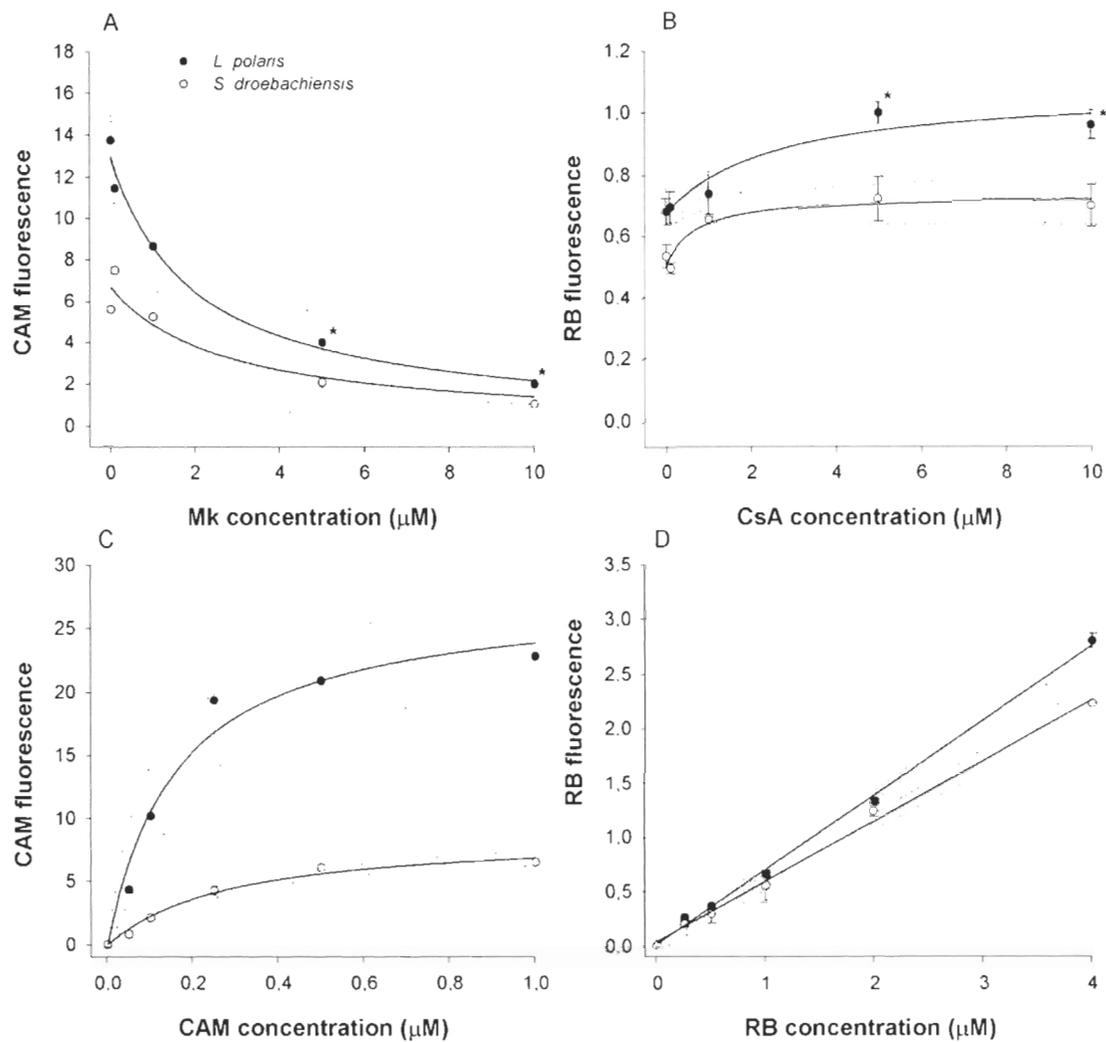


Figure 2.5 Fluorescence measurements by flow cytometry of (A) 0.5 μM Calcein-AM (CAM) with a dose-response of Mk571, (B) 1 μM Rhodamine B (RB) with a dose-response of Cyclosporine A, (C) a dose response of CAM and (D) a dose-response of RB. Cells were incubated for 2 h in the dark at 10°C. Values are means (\pm SE) of triplicate (1-way ANOVA, $P < 0.01$). * indicate statistical difference between the concentration and the zero of the dose-response curve (post-hoc Tukey: $p < 0.01$). A regression curve (solid line) and its 95% confidence intervals (dotted lines) were drawn for each dose-response treatment.

2.5.5. Identification of MXR-like proteins by mass spectrometry

Several bands were analyzed by MS in order to identify MXR-like proteins in *Strongylocentrotus droebachiensis* (191, 170, 100 and 65 kDa), in *Cucumaria frondosa* (191, 170, 100 and 40 kDa) and in *Leptasterias polaris* (170, 100 and 40 kDa). A protein that could be associated with the MXR/MDR family was found in *S. droebachiensis* extract from the 100 kDa band. The molecular weight of this protein was 96 kDa as established by MS/MS spectra using the Mascot program and it was attributed to a major vault protein (MVP) from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Accession No. Q5EA1J7). The identification was made from 4 peptides (sequence coverage of 8.4%) with a Mascot score of 100%.

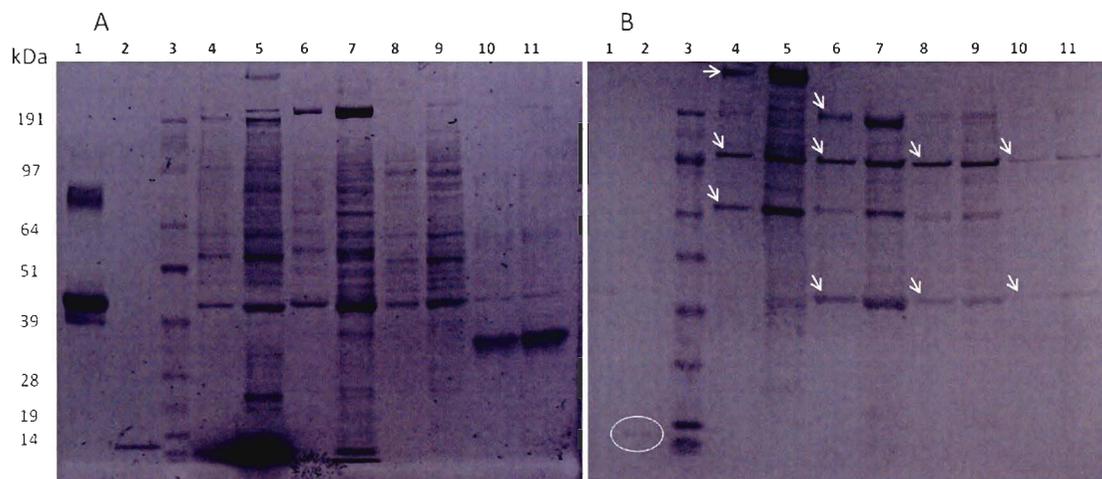


Figure 2.6 (A) Silver-stained SDS-PAGE; and (B) Western blot of cœlomocytes extracts from echinoderms. The following lane descriptions apply to both. Lane 1: negative control protein ovalbumine (Fischer-Scientific), lane 2: recombinant murine partial C10 (Biolyntx), lane 3: molecular weight standards SeeBlue Plus2, 4 to 250 kDa (Invitrogen), lane 4 and 5: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Strongylocentrotus dræbachiensis* cœlomocytes extract, lane 6 and 7: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Leptasterias polaris* cœlomocytes extract, lane 8 and 9: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Cucumaria frondosa* cœlomocytes extract, lane 10 and 11: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Mytilus edulis* haemocytes extract. Panel B, the mouse monoclonal antibody C9 was used (BDBiosciences Pharmigen). The positive control reaction of multidrug resistance-associated proteins is circled and the positive reactions of extracts with antibody are indicated by arrows.

2.6. DISCUSSION

Cœlomocytes play a crucial role for all echinoderm species as their immune system is dependent upon these circulating cells (Chia et Xing 1996). The present work is the first comparative study of cœlomocytes from 3 different echinoderm species using exactly the same protocol to assess MXR-like activity. Our study provides evidences of the presence of MXR activity in these cœlomocytes but the identity of the proteins needs to be confirmed by other techniques. Indeed, the cœlomocytes showed MXR activity, as indicated by the effect of MXR inhibitors on the accumulation of model MXR substrates (measured by FCM). In addition, WB enabled the detection of potential MXR proteins using anti-MXR antibodies, even though the identity of the proteins could not be confirmed.

The presence of MXR proteins has already been reported in various invertebrates, including the sponge *Suberites domuncula* (Müller *et al.* 1996), the marine worm *Urechis caupo* (Holland Toomey et Epel 1993), as well as in hæmocytes from freshwater (Zaja et al. 2006) and marine mussels (Marin *et al.* 2004, Minier et Moore 1996). Even though they are several studies available on invertebrate MXR, only 1 study discussed MXR activity in an echinoderm. Indeed, a MRPs-like activity seems to be the major MXR activity in the eggs and embryos of sea urchin *S. purpuratus* even if a low level of a Pgp-like activity was revealed (Hamdoun *et al.* 2004).

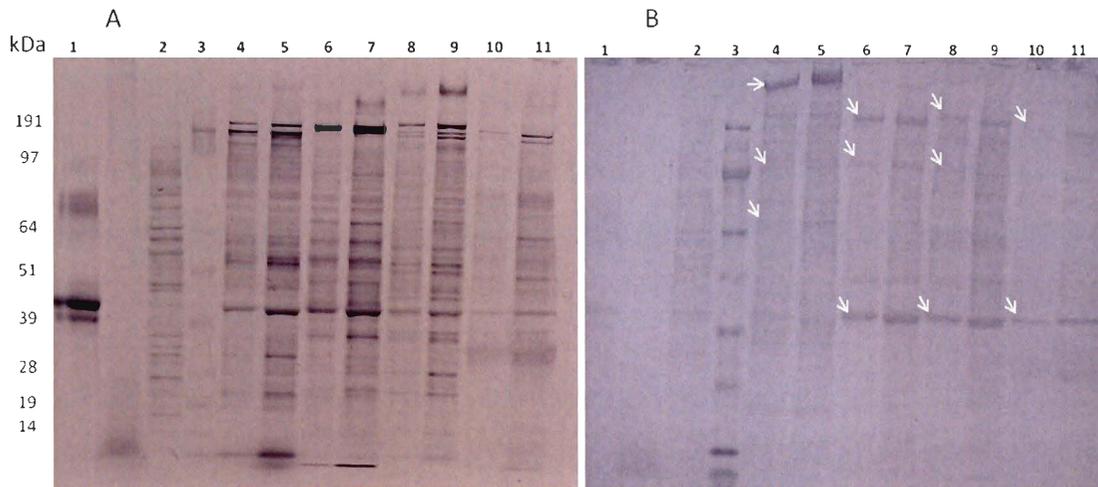


Figure 2.7 (A) Silver-stained SDS-PAGE; (B) and Western blot of cœlomocytes extracts from echinoderms. The following lane descriptions apply to both. Lane 1: negative control protein ovalbumine (Fischer-Scientific), lane 2: membrane P-gp human (BD Biosciences) lane 3: molecular weight standards SeeBlue Plus2, 4 to 250 kDa (Invitrogen), lane 4 and 5: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Strongylocentrotus dræbachiensis* cœlomocytes extract, lane 6 and 7: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Leptasterias polaris* cœlomocytes extract, lane 8 and 9: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Cucumaria frondosa* cœlomocytes extract, lane 10 and 11: 3 μ g and 5 μ g proteins from *Mytilus edulis* haemocytetes extract. Panel B, the mouse monoclonal antibody C219 was used (Calbiochem). The positive reactions of extracts with antibody are indicated by arrows.

2.6.1. Rhodamine B incorporation

The presence of a MXR transporter was confirmed in cœlomocytes of all studied echinoderms using RB as a model substrate. When MXR inhibitors were used, an increase of the fluorescence was noted as previously reported in other species (Cornwall *et al.* 1995, Hamdoun *et al.* 2004, Kerboeuf *et al.* 1999, Marin *et al.* 2004, Zaja *et al.* 2006).

This observed MXR activity could be due to the presence of both Pgp-like and MRPs-like proteins, since, as previously mentioned, RB is probably transported by both types of proteins. Regarding the specificity of inhibitors (Ambudkar *et al.* 1999, Eytan *et al.* 1996, Foxwell *et al.* 1989), the combination RB with CsA and Ver could highlight a Pgp-like activity in *S. dræbachiensis*, *L. polaris* cœlomocytes and in *S. dræbachiensis* vibratile cells, whereas the combination RB with Mk could highlight the presence of MRPs-like protein in *S. dræbachiensis* and *C. frondosa* cœlomocytes. MK is specific to the MRP family (Gekeler *et al.* 1995, Leier *et al.* 1994), although, it is not possible to determine which MRP is involved.

2.6.2. Calcein incorporation

The presence of MXR transporters was also confirmed in *L. polaris* cœlomocytes and *S. dræbachiensis* vibratile cells using CAM as a model substrate. The inhibitor Mk induced a significant decrease of CAM fluorescence in *L. polaris* cœlomocytes and *S. dræbachiensis* vibratile cells (Fig. 2.3B, C) as well as a similar trend in *S. dræbachiensis* and of *C. frondosa* cœlomocytes, although high variability led to non-significant results (Fig. 2.3A, D). This MXR response could be due to the presence of MRPs-like protein, Mk being specific to this class of transporters. Mk was previously used in order to detect

MRPs-like protein transporters in many species (Bakos et Homolya 2007, Gekeler *et al.* 1995, Lüders *et al.* 2009, Wu *et al.* 2005, Zaja *et al.* 2008). A decrease of fluorescence was generally not observed, but has previously been reported in mussel haemocytes using a

combination of RB and Ver (Svensson *et al.* 2003). The results showing a fluorescence decrease could be explained by localization of the involved protein in membranes of intracellular compartments. Based on tests with the lysosomal volume compartment in mussels haemocytes using the neutral red uptake assay, Svensson *et al.* (2003) hypothesized that Pgp was localized in the lysosomal membrane instead of the cellular membrane. The presence of Pgp was also found in the lysosomal compartment of specialized cells in the hepatopancreas of crustacean *Carcinus maenas* (Köhler *et al.* 1998). This is in accordance with our data as calcein fluorescence in *L. polaris* cœlomocytes was localized in intracellular granules as observed by epifluorescence microscopy with and without MK (Fig. 2.4B and D), an indication of MRPs-like proteins localized in the membranes of intracellular compartments. Actually, Pgp and MRP1 have been identified on intracellular membrane in human cancer cell line (Bour-Dill *et al.* 2000, Laochariyakul *et al.* 2003). The presence of MXR proteins inside the cœlomocytes could also be due to the fundamental role of the cœlomocytes which are engulfing solid foreign material by their cell membrane. Due to the high rate of plasma membrane turnover associated with the endocytosis process, the membrane protein turnover should be high as well. This may explain why P-gp and MRP proteins could be observed in membranes of intracellular compartments.

Our results reveal that the MXR activity of cœlomocytes induces a quite complex response toward model substrates and inhibitors. Not all observations reported here can be explained by this process particularly when comparing the role of cells where intracellular MDR was revealed. The cœlomocytes (present paper) and haemocytes (Svensson *et al.* 2003) are indeed phagocytic cells, which was not the case for the cancer cell lines used by Bour-Dill *et al.* (2000) and Laochariyakul *et al.* (2003). MXR proteins could be present both in the plasma membrane and in an inner membrane of the cell, as illustrated by the scheme in Fig. 2.8. Following this scheme, calcein could be less accumulated inside the vesicles in the presence of the MRPs inhibitor, but could still be pumped out of the cell by the Pgp-like transporters, causing fluorescence diminution as observed at the whole cell level by FCM.

2.6.3. Responses comparison

This indirect measurement method has been used for a long time and is still used for the detection of Pgp-like and MRPs-like activities (Hamdoun et al. 2004; Kerboeuf et al. 1999; Lüders et al. 2009; Neyfakh 1988) as well as for the detection of MXR/MDR activity (Caminada et al. 2008; Cornwall et al. 1995; Holland Toomey and Epel 1993; Zaja et al. 2006). The CsA and Ver are not as specific as first claimed 10 years ago. Even if they are still used as a potent Pgp inhibitor by some authors (Kagan *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010), there are a few indications of their transport by MRP1 (Kerr *et al.* 2010, Zaja *et al.* 2007). In the present study, all combinations inducing fluorescence change have to be taken into account. Indeed, through dose-response curves (Fig. 2.5), there is a strong indication of the presence of 2 different types of MXR activity in cœlomocytes. The first MXR protein was revealed by a decrease of the CAM fluorescence in a Mk dose-dependent response in *S. dræbachiensis* and *L. polaris* (Fig. 2.5A). To our knowledge, no information on the interaction of Mk with Pgp was previously available. Mk is linked to the transport inhibition of the MRP family. As a recent example in invertebrates, the combination Flura 2/MK571 was used in crustacean tissues (Lüders et al. 2009) to highlight MRPs-like protein activity. The second MXR protein in this study was revealed by the increase of RB fluorescence in a CsA dose-dependent response in *S. dræbachiensis* and *L. polaris*. Due to this contrary observation (increase instead of decrease for Mk) and the fact that CsA is a potent Pgp inhibitor, the MXR activity observed here is probably due to the Pgp presence in cœlomocytes. As recent example in invertebrates, the combination of RB with CsA or Ver was used in gill tissue of the bivalve *Unio pictorum* (Zaja et al. 2006) to highlight Pgp-like protein.

A difference in substrate transport between *S. dræbachiensis* and *L. polaris* was observed, with *L. polaris* cœlomocytes accumulating more fluorescence (CAM and RB) than *S. dræbachiensis* cœlomocytes, despite similar cell size. This could be due to a lower MXR activity in *L. polaris* cœlomocytes. Additional information, like time course

responses, would be necessary in a future MXR characterization in echinoderm cœlomocytes.

2.6.4. Western Blot confirmation of MXR-like proteins in cœlomocytes

Results obtained by WB confirmed the presence of MXR-like proteins in echinoderm cœlomocytes. Proteins reacting in WB (Figs. 2.7B, 2.8B) were not necessarily the most abundant as showed by silver staining (Figs. 2.7A, 2.8A). The molecular weights of the proteins recognized by antibodies were about the same as described by other authors in invertebrates (Cornwall *et al.* 1995, Roepke *et al.* 2006). Nevertheless, no discrimination between MXR could be done with this method because C9 and C219 antibodies seemed to react with targeted proteins with the same molecular weight. Little information is available on MXR in echinoderms, and, to our knowledge, this is the first time these 2 antibodies have been used on the same extract of echinoderm cœlomocytes. The molecular weights of Pgp and MRPs are quite similar and change with species. For instance, a 135 kDa Pgp was reported in *Corbicula fluminea* gills (Waldmann *et al.* 1995) while a 170 kDa Pgp was reported in *M. edulis* and *M. Californianus* gills (Cornwall *et al.* 1995, Minier et Moore 1996) and a 145 and a 220 kDa Pgp in *M. Galloprovincialis* (Galgani *et al.* 1996), all determined by WB with the C219 antibody. Finally, other MRPs with other molecular weights could be recognized by C9 although, this is an antibody against MRP1, a 190 kDa protein (Cole *et al.* 1992). The MRPs are indeed a big family of many homologues (Borst *et al.* 1999, Leslie *et al.* 2001). MRP members share preserved sections, particularly MRP1, MRP2, MRP3 and MRP6, for wich most of amino acids are shared in common (Leslie *et al.* 2001).

Glycosylation also plays a role in determination of the molecular weight of Pgp proteins (Kartner *et al.* 1985); *S. dræbachiensis* and *C. frondosa* cœlomocytes contain glycoproteins but their molecular weight could not be linked to the proteins reacting in our WB analysis (data not shown).

MS analysis did not allow to confirm the presence of Pgp- or MRP-like proteins and to identify them by their structure but this does not necessarily mean that the proteins are absent from cœlomocytes. The amount of MXR proteins in comparison with other proteins in band extracts were too low to be detected by MS analysis (S. Bourassa, Centre genomique de Québec, pers. comm.). In order to enable better discrimination of these proteins in MS and WB, immunoprecipitation should be performed as a first step to purify the sample. Furthermore, other antibodies like MRPm6 or M₂I-4 (Sauerborn Klobucar *et al.* 2010) and other WB methods (utilizing preincubation of specific peptides according to the epitopes of antibodies) have to be tested in an attempt to discriminate the involved proteins. Finding MVP in the cœlomocytes of *S. dræbachiensis* is new and unexpected. The sea urchin MVP showed 20.4% of similarity with the human Pgp recognized by Ab-C219, while only 6.4% similarity was seen with the human MRP1 recognized by Ab-C9. Human MRP1 (Accession No. P33527), human Pgp (Accession No. P08183) and sea urchin MVP (Accession No. Q5EAJ7) amino acids sequence data were submitted to BLAST tools from the Swiss Institute of Bioinformatics (SwissProt) libraries to obtain and compare the above percents of similarity.

MVP is the main component of vaults - cytoplasmic megastructures located near the nucleus of the cell. MVP is highly preserved in evolution and has been found in most eukaryotic organisms (Kickhoefer *et al.* 1996, Steiner *et al.* 2006). MVP has been identified in the eggs and embryos of the sea urchin *Lytechinus pictus* (Hamill et Suprenant 1997). The involvement of MVP in drug resistance has been proposed (Herlevsen *et al.* 2007, Meschini *et al.* 2002, Steiner *et al.* 2006) although this is still under debate (Mossink *et al.* 2002, van Zon *et al.* 2004). Finding of MVP in *S. dræbachiensis* offers a new research perspective, as the role of MVP in detoxification processes of cœlomocytes has yet to be explored.

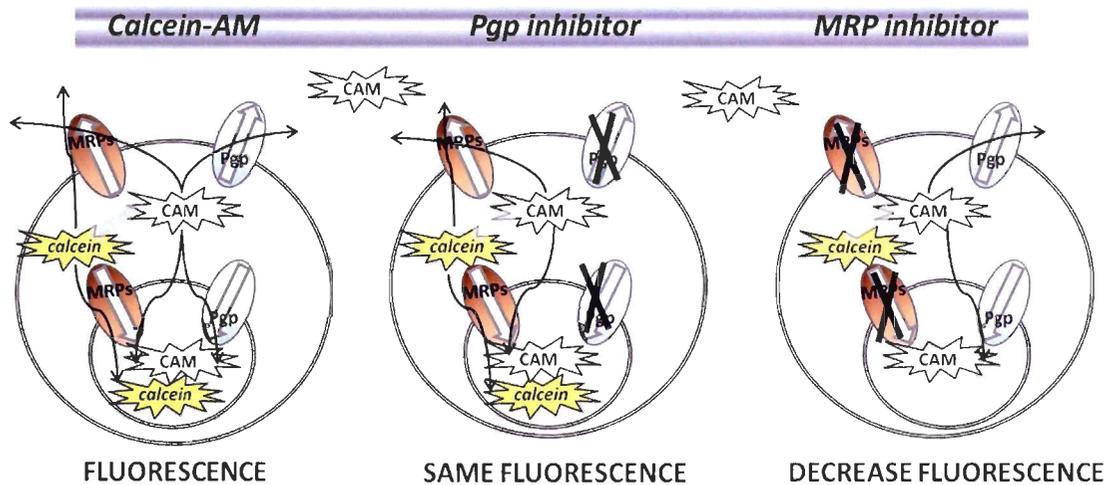


Figure 2.8 Hypothetical scheme of P-glycoprotein (Pgp)-like protein and multidrug resistance-associated proteins (MRPs)-like protein distribution in cœlomocytes. The presence of MK571 explains the decrease of calcein-AM fluorescence.

2.7.CONCLUSION

The cœlomocytes in all 3 echinoderms showed MXR activity. This activity is tentatively attributed to a Pgp-like transporter in *S. dræbachiensis* cœlomocytes and vibratile cells and in *L. polaris* cœlomocytes as the RB+CsA and RB+Ver combinations led to a change in the RB accumulation. Another type of MXR activity was observed with the CAM+Mk combination. This could be attributed to the presence of MRPs-like transporters in *C. frondosa*, *S. dræbachiensis* and *L. polaris* cœlomocytes.

The results of the present study have increased our knowledge on cœlomocytes physiology and on the differences among echinoderm species. Through the use of anti-Pgp antibodies and MS, a MVP has been identified in *S. dræbachiensis* cœlomocytes (including vibratile cells). This raises the question about the link between MVP and xenobiotics resistance. Further studies are necessary in order to learn more about the physiology of cœlomocytes and their MXR activity.

Acknowledgments

This research was support by an operating grant (É.P.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, a student grant (É.D.) from the Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER-UQAR) and by grants from both the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (Quebec, Canada) and La Fondation Communautaire Gaspésie-Les-Iles (Quebec, Canada). The Authors thank Ms. Isabelle Desbiens (ISMER-UQAR), Ms. Dominique Lavallée (ISMER-UQAR), Ms. Jacinthe Thibodeau (UQAR-MAPAQ), Dr Richard Saint-Louis (ISMER-UQAR) and Dr Khalida Békri (NRCC-Institute for Marine Biosciences) for their assistance in the course of this project. Many thanks to unknown reviewers for their valuable comments and suggestions in the reviewing process of this paper. All experiments conducted in the course of this work complied with the regulations set down by the Canadian council on Animal Care. The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the contents of this paper.

CHAPITRE 3

**EFFET D'UN ACCROISSEMENT DE LA TEMPÉRATURE SUR LA
PHYSIOLOGIE ET LE REMANIEMENT LIPIDIQUE DES CŒLOMOCYTES DE
LEPTASTERIAS POLARIS ET *STRONGYLOCENTROTUS DRŒBACHIENSIS***

Émilie Doussantousse, Émilien Pelletier, Réjean Tremblay et Lucie Beaulieu

Article en préparation.

3.1.RÉSUMÉ

La température a un effet très important sur les processus membranaires en agissant directement sur les propriétés physiques des membranes des ectothermes dont font parti les échinodermes. Peu d'études ont cependant été réalisées sur les échinodermes et leur capacité de réagir à une variation de température, au niveau de leur cœlomocytes, cellules responsables entre autres, du système immunitaire. L'objectif de cette recherche était d'étudier le comportement physiologique des cœlomocytes de l'étoile de mer, *L. polaris* et de l'oursin, *S. dræbachiensis*, lors d'un changement de température (1°C vers 10°C). Les lipides (acides gras et cholestérol) ont été mesurés dans les cœlomocytes par GC-FID. La consommation d'oxygène de l'organisme, la concentration et la taille des cœlomocytes (mesurées au compteur électronique de particules), la quantité de protéines (méthode de Bradford) et la viabilité des cœlomocytes (test du tetrazolium en microculture) ont également été mesurées. Les organismes étaient acclimatés à la température locale hivernale de 1°C avant d'être déplacés. Trois bassins (contenant trois étoiles de mer polaires *L. polaris* et cinq oursins vert *S. dræbachiensis*) ont été maintenus à cette température et trois autres ont été graduellement augmentés à 10°C à raison d'un degré par jour. Les mesures pour chaque bassin ont été prises avant l'augmentation de la température (t_i), lors de l'atteinte de la température de 10°C (t_0) puis chaque semaine durant sept semaines (t_1 à t_7). Les deux échinodermes *L. polaris* et *S. dræbachiensis* ont un profil de lipides très particulier dans les cœlomocytes tel que la forte présence des acides gras 20:5n-3, 20:2 NMI et 20:1n-11. Plus particulièrement, ces organismes ont démontré une certaine capacité de réorganiser leurs phospholipides membranaires en diminuant le degré d'insaturation des membranes, particulièrement le 20:5n-3 lors d'une augmentation de la température. Le cholestérol ne participe pas ou très peu au réarrangement des membranes puisque sa quantité reste inchangée chez *L. polaris* et varie très peu chez *S. dræbachiensis*. Ainsi, ces organismes sont capables d'adaptation homéovisqueuse par réarrangement des acides gras phospholipidiques membranaires sans participation du cholestérol. Cependant,

l'augmentation de la température n'a pas permis de constater une reprise de l'activité des cœlomocytes. La température n'est assurément pas le seul facteur de reprise d'activité pour les cœlomocytes.

Mots clés : adaptation homéovisqueuse - acide gras - cholestérol- cœlomocytes - *Leptasterias polaris* - *Strongylocentrotus dræbachiensis* - température -

3.2. INTRODUCTION

Chez les ectothermes, comme les échinodermes, la température a un effet important sur la physiologie de l'organisme particulièrement au niveau des processus membranaires. La température influe particulièrement sur les propriétés physiques des membranes et ainsi, a une influence directe sur les processus s'y déroulant comme les activités des protéines qui s'y trouvent (Hochachka et Somero 2002). Les membranes cellulaires ont un rôle très important pour l'activité biologique de l'organisme car elles permettent entre autres de créer une barrière physique avec le milieu environnant. Elles sont également nécessaires dans le processus de création d'énergie ainsi que dans la signalisation intercellulaire (Hochachka et Somero 2002). Deux propriétés membranaires sont particulièrement influencées par la température : l'ordre des membranes (une augmentation de la température fluidifie la membrane tandis qu'une diminution l'ordonne) et la phase des membranes (une phase liquide-cristalline doit être conservée à basse température) (Crockett 1998, Hochachka et Somero 2002). Afin de maintenir une activité optimale, certains organismes vont compenser l'effet de la température en remaniant leurs lipides membranaires. C'est l'adaptation homéovisqueuse. Chaque acide gras (AG) a des propriétés physiques et chimiques qui lui sont propres et la composition de l'ensemble des AG présents détermine la fluidité membranaire (Hazel 1995, Hulbert *et al.* 2005). Un changement de température implique souvent un changement des AG, des phospholipides et des stérols présents dans la membrane cellulaire (Copeman et Parrish 2003). La structure moléculaire particulière des stérols fait en sorte que leurs incorporations au travers des phospholipides membranaires agissent comme agent rigidifiant. Chez les poissons et les bivalves, les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont considérés très importants pour l'adaptation en milieu froid (Parrish *et al.* 1996). Les animaux marins en général n'ont pas la capacité de synthétiser *de novo* les AGPI à longues chaînes comme le 20:5n-3, le 20:3n-3 et le 22:6n-3. Ils doivent se les procurer par leur diète (Glencross 2009).

Il y a peu d'études effectuées sur l'effet de la température sur les échinodermes et particulièrement sur leurs cœlomocytes, les cellules circulantes du liquide cœlomique (LC). Les cœlomocytes sont des cellules ayant des activités variées comme le transport et le stockage de nutriments, l'échange de gaz, l'encapsulation de particules étrangères et de la phagocytose ainsi que la formation du clou plaquettaire. Elles sont responsables du système immunitaire des échinodermes (Edds 1993). Au moins six types de cœlomocytes ont été identifiés chez les échinodermes mais tous ne sont pas représentés chez toutes les espèces (Chia et Xing 1996) ni même chez tous les spécimens de la même espèce provenant du même environnement (Xing *et al.* 2008). Dans l'estuaire du Saint-Laurent, les organismes subissent une saison hivernale très marquée avec des températures très froides. Les étoiles de mer, *Leptasterias polaris*, et les oursins, *Strongylocentrotus dræbachiensis*, sont présents le long des côtes l'été dans la zone infralittorale. La température n'a pas vraiment d'effet sur le déplacement de *S. dræbachiensis* à l'automne. C'est plutôt l'augmentation de l'hydrodynamisme des vagues qui a une influence sur son déplacement (Lauzon-Guay et Scheibling 2007). Ces organismes restent actifs l'hiver et la reproduction de *L. polaris* a d'ailleurs lieu lorsque la température devient très froide (Hamel et Mercier 1995). Observées en aquarium semi-ouvert dont la température varie entre un minimum de 0°C l'hiver et un maximum de 12° à la fin de l'été, ces deux espèces conservent la capacité de se nourrir en hiver. Cependant, les déplacements sont très lents et les mesures d'activité des cœlomocytes, cellules circulantes du cœlome, sont très faibles (observation personnelle).

L'objectif de cette recherche était d'étudier le comportement physiologique des cœlomocytes de l'étoile de mer, *L. polaris* et de l'oursin, *S. dræbachiensis*, lors d'un changement de température. Les organismes acclimatés à une température hivernale (1°C) ont été graduellement soumis à une température estivale (10°C) telle qu'observée dans l'estuaire du Saint-Laurent d'où ils proviennent. La consommation d'oxygène de l'organisme a été mesurée ainsi que plusieurs paramètres cellulaires tels que la concentration et la taille des cœlomocytes, la quantité de protéines et la viabilité des

cœlomocytes. Les lipides membranaires ont également été mesurés dans les cœlomocytes afin de vérifier si *L. polaris* et *S. dræbachiensis* ont une capacité d'adaptation homéovisqueuse. L'hypothèse générale est que les organismes répondent à la variation de température en modifiant les lipides membranaires des cœlomocytes. L'originalité de cette étude est l'approche comparative entre deux espèces d'échinodermes, peu étudiées dans le cas de *L. polaris*, acclimatées à l'hiver et soumises à des températures d'été.

3.3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.3.1. Les animaux

Les étoiles de mer polaire *L. polaris* (taille du disque central: 4 cm) et les oursins *S. dræbachiensis* (entre 4 et 5 cm de diamètre) ont été récoltés dans l'estuaire du Saint-Laurent entre juillet et octobre 2006. Les organismes ont été par la suite maintenus en aquarium semi-ouvert à la station aquicole de l'ISMER (Rimouski, Qc, Canada). La température de l'eau y a varié entre 0°C et 12°C selon la saison et la salinité est demeurée constante autour de 31. Les animaux ont été nourris *ad libitum* deux fois par semaine avec des moules bleues *Mytilus sp.* (pour *L. polaris*) et avec des laminaires *Laminaria sp.* (pour *S. dræbachiensis*).

L'expérience sur l'acclimatation a débuté en janvier (T° de l'eau: entre 0.5 et 1°C). Cinq oursins et trois étoiles de mer (aucune distinction des sexes) ont été transférés dans chaque bassin participant à l'expérience et ont cessé d'être nourris pendant toute la durée de l'expérience afin de ne pas engendrer de différence de nutrition entre les deux groupes. En effet, les organismes se nourrissent très peu à 1°C même si la nourriture est présente alors qu'ils se nourrissent autant qu'ils le peuvent à 10°C. Les différents paramètres décrits ci-après ont été mesurés une première fois lors du changement de bassin, ce qui correspond à l'échantillonnage ti. La température des trois bassins contrôle (1°C) correspondait à la

température hivernale habituellement atteinte en aquarium semi-ouvert tandis que la température des trois autres bassins a été graduellement augmentée à 10°C (température estivale) sur une période d'acclimatation de 10 jours (1° par jour). Un premier prélèvement a été fait lorsque la température a atteint 10°C (t0) puis une fois par semaine pendant sept semaines (t1 à t7).

3.3.2. Le prélèvement des cœlomocytes

Le liquide cœlomique (LC) (2.5 mL) a été prélevé à l'aide d'une seringue de 5 mL avec une aiguille de calibre 23, préalablement remplie à la moitié avec de l'eau de mer artificielle froide (4°C) préparée sans calcium ni magnésium et additionnée d'EDTA (50 mM). Cette eau de mer artificielle a servi d'anticoagulant pour le prélèvement des cellules (Békri et Pelletier 2004). Le LC est regroupé par espèce et par bassin afin d'éliminer la variabilité interindividuelle et de maximiser la quantité de cellules pour la mesure de tous les paramètres à l'étude. Les prélèvements ont toujours été effectués le matin pour minimiser toute variation physiologique due à l'heure de la journée. Immédiatement après le prélèvement, le LC a été passé sur un tamis cellulaire en nylon de 40 µm (VWR Canlab, Qc, Canada) afin d'écarter tous débris ou agrégats cellulaires dus au prélèvement.

3.3.3. Les analyses

Caractéristiques des cœlomocytes : taille et concentration

La taille et la concentration cellulaire ont toujours été les premières mesures effectuées à l'aide d'un compteur électronique à particules (Beckman Coulter Counter Z2). Le compteur a mesuré toutes les particules (cellules) entre 5 et 16 µm pour *L. polaris* et entre 3 et 12 µm pour *S. dræbachiensis*.

Caractéristiques des cœlomocytes : dosage de protéines dans le liquide cœlomique et dans les cellules seules

La concentration en protéines totales dans 800 000 cellules a été dosée dans le LC (liquide + cellules) ainsi que dans les cœlomocytes. Pour récupérer les cœlomocytes, environ 5 mL de LC ont été centrifugés à 2000 rpm pendant 8 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été resuspendues dans du tampon tris (50 mM). Le dosage a été effectué sur glace grâce au kit Coomassie Plus de Pierce (Thermo Scientific). La protéine BSA a été utilisée comme standard (Fraction V, Thermo Scientific).

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par le test du tétrazolium en microculture (MTT) qui est le 1^{er} choix lorsqu'on travaille avec des cellules adhérentes comme c'est le cas des cœlomocytes (Lindl *et al.* 2005). Le sel jaune de tétrazolium est réduit par les enzymes cellulaires actives sous la forme mauve Formazan. Cette méthode colorimétrique a été adaptée du protocole développé sur les hémocytes de la moule bleue (Marin *et al.* 2004).

Les cœlomocytes (600 000 par puits) ont été déposés sur une microplaque 96 puits (3 répliquas de mesure par échantillon). Après 1h à 10°C à l'obscurité, le surnageant a été aspiré ne laissant que les cellules adhérentes dans les puits. La solution de MTT dans l'eau de mer filtrée (concentration finale 0.5 mg mL⁻¹) a ensuite été déposée dans les puits pour une période de 2h à 10°C à l'obscurité. Puis, la solution a été aspirée et du DMSO a ensuite été ajouté pour dissoudre les cristaux de Formazan des cellules adhérentes (Twentyman et Luscombe 1987). L'absorbance a été lue par le lecteur de microplaque (Spectra Fluor Plus microplate, Tecan). La différence d'absorbance mesurée à 535 nm et 700 nm a été utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire. La longueur d'onde de 535 nm correspond au maximum d'absorption du MTT tandis que la longueur d'onde de 700 nm correspond au minimum. L'utilisation de ces deux longueurs d'onde aux extrémités du spectre d'absorption du MTT permet d'écartier le bruit de fond et le *quenching* dû au milieu (Supino 1995).

Les données de viabilité cellulaire obtenues dans cette expérience ont également été comparées avec celles obtenues à la fin de l'été 2006 (température de 10°C maximum) et en début d'hiver 2007 (température en dessous de 5°C) afin de comparer des valeurs obtenues à des températures suivant le milieu naturel avec des valeurs obtenues en aquarium à température contrôlée.

La respirométrie

La consommation d'oxygène a été mesurée pour chaque échantillon c'est-à-dire pour trois *L. polaris* ou cinq *S. dræbachiensis*. Cette analyse a permis d'obtenir la consommation d'oxygène par organisme. Ce test a été effectué la même journée pour les deux espèces. La consommation de trois étoiles ou cinq oursins a été mesurée dans des chambres métaboliques de 1L. Les individus éponnés ont été pesés avant leur entrée dans la chambre. La mesure du blanc a été effectuée dans une chambre sans organisme. La mesure du métabolisme a été effectuée dans deux chambres à la fois de façon aléatoire. La consommation d'oxygène a été mesurée grâce à une sonde polarographique YSI (5331) et des électrodes (Yellow Springs, OH, USA). L'eau de mer (filtrée sur 1 µm et passée aux UV) était agitée par un barreau magnétique et la concentration en O₂ a été enregistrée en continue jusqu'à une diminution d'au moins 20%. Une correction allométrique a été appliquée sur les résultats de consommation d'O₂ (Widdows et Johnson 1988) selon les facteurs retrouvés dans la littérature. Un facteur de 0.5 a été appliqué pour *S. dræbachiensis* (calculé chez *S. purpuratus* et *S. franciscanus* (Nebert et Dieter 2000) et de 0.87 pour *L. polaris* (correspond à la moyenne calculée chez les Astéridés par (Kettle et Lucas 1987).

L'extraction des lipides

L'analyse des AG et du cholestérol a été réalisée en chromatographie gazeuse (GC) dans les laboratoires de l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières de Shippagan (NB) pour les échantillons récoltés à t_i , t_0 , t_2 , t_5 et t_7 (t =temps d'échantillonnage). Une quantité de 2 millions de cellules a été réservée lors du prélèvement du LC pour ces analyses (environ 2 mL).

Les lipides ont été extraits dans les cœlomocytes selon la méthode de Folch et co-auteurs (Folch *et al.* 1957). Brièvement, les cellules ont subi une sonication de 30 secondes dans un tube d'extraction préalablement rincé au méthanol (MeOH) puis au dichlorométhane (CH_2Cl_2). Après ajout de 3 mL d'eau distillée et 4 mL de CH_2Cl_2 : MeOH (2 :1, v/v), les tubes ont été mélangés au vortex à vitesse maximale avant d'être centrifugés pendant 2 minutes à 2000 rpm à 4°C. La phase inférieure (contenant les lipides) a ensuite été transférée dans un tube de transfert préalablement rincé comme décrit précédemment tandis que 3 mL de CH_2Cl_2 ont été ajoutés à la phase restante dans les tubes d'extraction. Après ajout de 3 mL de CH_2Cl_2 , les tubes d'extraction ont été de nouveau mélangés au vortex puis centrifugés tel que décrit précédemment. La nouvelle phase inférieure a ensuite été ajoutée dans le tube de transfert. L'échantillon complet (dans le tube de transfert à ce stade-ci) a finalement été évaporé complètement sous azote. Les lipides ont ensuite été dissous dans 1 mL de CH_2Cl_2 (+ 2 μl de butylhydroxytoluène (BHT 0.1%) pour la conservation des lipides) et transférés dans un pilulier ambré avec un tube de téflon pour entreposage à -80°C jusqu'à l'analyse. Selon ce protocole, les tubes ont été mis sous azote dès qu'ils devaient être refermés. Un tube blanc, c'est-à-dire sans échantillon, a été préparé selon le même protocole à chaque série d'extractions.

Par la suite, les extraits lipidiques ont été séparés en deux fractions, soit la fraction neutre (comprenant les triglycérides, les acides gras libres et les stérols) et la fraction

polaire (comprenant essentiellement les phospholipides), sur une colonne de gel de silice (30 x 5 mm d.i., préparée avec le gel Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Allemagne) hydratée avec 6% d'eau et éluée avec 10 mL de chloroforme: méthanol (98:2 v / v) pour les lipides neutres suivis par 20 mL de méthanol pour les lipides polaires (Marty *et al.* 1992). Les profils en acides gras ont été déterminés sur la fraction polaire seulement.

Acides gras

Afin d'obtenir des esters d'acide gras, une transestérification a été effectuée avec les échantillons. Brièvement, l'échantillon (~100 µl) a été transféré dans un tube en verre et le pilulier a été rincé 2 fois avec du CH₂Cl₂. L'acide nonadecanoïc (C19:0; 0.025 mg/mL) a été ajouté à l'échantillon comme standard interne avant d'être évaporé sous azote. Les lipides ont été ensuite dissous dans 3 mL de méthanol/toluène (3 :2 v/v). Pour réaliser la transestérification, 2 mL d'acide sulfurique (2% méthanol) ont été ajoutés. Chaque échantillon a été fermé sous azote puis chauffé pendant 1 h à 100°C en agitant doucement par inversion toutes les 15 minutes. Les échantillons ont été refroidis à l'air ambiant avant d'y ajouter 4 mL d'eau distillée et 0.6 mL d'hexane afin d'obtenir les esters méthyliques d'acide gras (MEAG). Après un mélange vigoureux et une centrifugation à 2000 rpm pendant 2 minutes, la phase supérieure a été récupérée (hexane/toluène). Un deuxième standard interne (C23 :0 ME; 0.025 mg/mL) a été ajouté à l'échantillon à cette étape.

Les MEAG ont été analysés par GC-FID (CP-3900 de Varian) avec une colonne de capillaires ZB-WAX 20 m x 0.18 mm x 0.18µm (Phenomenex). Un (1) µl a été injecté en mode splitless. L'hydrogène était le gaz porteur. Afin de procéder à une meilleure séparation des MEAG, le four du GC opérait selon un gradient de température : départ à 140°C pour 0.2 min, puis augmentation à 170°C (40°C/min), puis 185°C (4°C/min) et enfin 230°C (2°C/min). L'identification individuelle des MEAG a été réalisée grâce à un mélange standard d'acides gras connus. La quantification a été réalisée grâce au standard interne.

Cholestérol

Afin de quantifier le cholestérol dans les échantillons, les lipides ont subi une saponification. Les échantillons et le matériel de référence ont été pesés et transférés quantitativement dans une éprouvette. Un volume de 5.5 mL de la solution de saponification a été ajouté avant de refermer les tubes sous azote. Les échantillons ont été mélangés vigoureusement grâce à l'agitateur vortex pendant 30 secondes avant d'être chauffés entre 80°C et 85°C pendant 15 minutes (agitation toutes les 5 minutes). Les échantillons ont été refroidis à l'air pendant 10 minutes. Pour l'extraction du cholestérol, des volumes de 1.5 mL d'eau distillée et de 3 mL d'hexane ont été ajoutés. Après une agitation vigoureuse, l'échantillon a été centrifugé pendant 2 minutes à 4°C (2000 RPM). La phase supérieure a ensuite été transférée dans une éprouvette graduée de 25 mL. L'extraction à l'hexane a été répétée deux autres fois, récupérant la phase finale dans la même éprouvette. Le volume final de l'échantillon a été ajusté à 10 mL et un aliquote de 2 mL a été transféré dans un pilulier pour l'analyse au GC-FID (CP-3900 de Varian) avec une colonne capillaire VF-5ms 30m x 0.25mm x 0.25µm. Un (1) µL de l'extrait a été injecté. La température de l'injecteur et du détecteur était de 280°C et celle du four était constante à 300°C. Les extraits contenaient de l' α -cholestane comme standard interne, ce qui a permis la quantification.

3.3.4. Analyses statistiques

Les graphiques ont été effectués grâce au logiciel SIGMAPLOT 10 (Systat Software Inc, CA, USA). Les traitements statistiques ont été réalisés lorsqu'une tendance était observée. Des analyses de variance ont été effectuées (un ou deux facteurs) ainsi que des régressions linéaires (moindres carrés) grâce au logiciel SYSTAT 12 (Systat Software Inc, CA, USA). Les données devaient respecter les conditions d'application des analyses de variance et de régression linéaire soit l'homogénéité (Test de Levene) et la normalité des

résidus (distribution de Lilliefors). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm l'erreur type (ET).

3.4. RÉSULTATS & DISCUSSION

3.4.1. Taille et concentration des cœlomocytes

Les données obtenues par le compteur de particules montrent que la taille moyenne des cœlomocytes de *L. polaris* était plus grande que celle de *S. dræbachiensis* alors que la concentration en cœlomocytes du LC était similaire (ti, Fig. 3.1 et 3.2).

3.4.2. Taille des cœlomocytes

Pendant l'expérience sur l'acclimatation, aucun effet de la température et du temps n'a été observé sur la taille des cœlomocytes de *L. polaris* (Fig. 3.1A). Que la température n'ait pas d'effet sur la taille des cœlomocytes chez *L. polaris* n'a rien de surprenant car, chez les astéries et particulièrement chez *L. polaris*, les cœlomocytes sont composés de plus de 90% d'amœbocytes (cellules phagocytes) (Kaneshiro et Karp 1980). Il y a donc très peu de diversité chez cette espèce. Par contre, un effet significatif du temps sur la taille des cœlomocytes de *S. dræbachiensis* (Fig. 3.1B) a été mesuré (ANOVA temps x Température; temps : F:47.9, P=0.000) sans effet de la température, ni interaction entre les deux facteurs. Une diminution linéaire de la taille des cœlomocytes a été observée dans le temps (régression des moindres carrés, P= 0.000 et $R^2=0.70$, encadré Fig. 3.1B).

La composition des cœlomocytes chez les échinidés est beaucoup plus diversifiée que celle des astéries puisqu'on y dénombre plusieurs types cellulaires (Chia et Xing 1996). Un

changement de la composition des cœlomocytes qui aurait favorisé les types cellulaires plus petits pourrait donc expliquer la diminution de la taille moyenne des cœlomocytes. Cependant, d'un point de vue statistique, c'est le temps et non la température qui a engendré ce changement. Il est donc également possible qu'un stress engendré par de la manipulation hebdomadaire des organismes ou un manque de nourriture soit responsable de ce résultat.

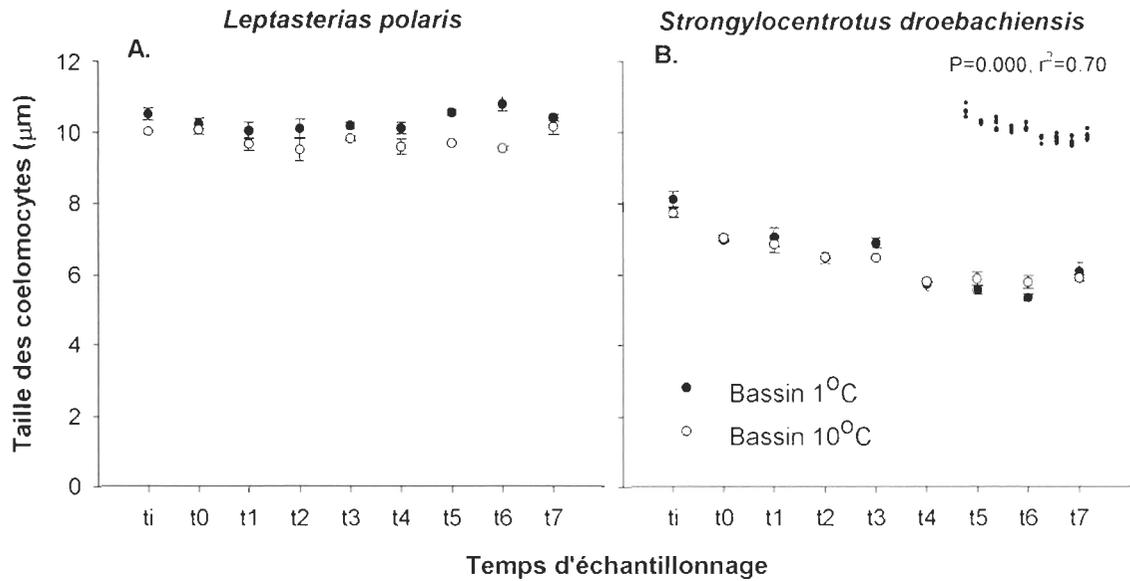


Figure 3.1 Taille moyenne des cœlomocytes pendant l'expérience (ti à t7) sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez *L. polaris* (A) et *S. droebachiensis* (B). Toutes les particules entre 5 et 16 µm pour *L. polaris* et 3 et 12 µm pour *S. droebachiensis* ont été mesurées à l'aide d'un compteur électronique à particules (Beckman Coulter Counter Z2). Les valeurs présentées sont les moyennes (\pm ET) et $n=3$. Chaque groupe est composé de 3 étoiles de mer ou de 5 oursins. A. Aucune différence statistique (ANOVA temps x température). B. Encadré : effet significatif du temps : $F:47.9, P=0.000$.

3.4.3. Concentration cellulaire

Aucun effet significatif de la température ou du temps n'a été observé sur la concentration des cœlomocytes de *S. dræbachiensis* (Fig. 3.2B). Beaucoup de variabilité a cependant été observée entre les semaines de prélèvement et les groupes de répliquas. La diminution de la taille des cœlomocytes dans le temps (3.1.1) indiquerait peut-être une perturbation dans l'aquarium, qui aurait engendré ces variations brusques des concentrations.

Un effet significatif de la température a, par ailleurs, été observé sur la concentration des cœlomocytes de *L. polaris* (Fig. 3.2A, ANOVA temps x Température; Température : F:36.3, P=0.000) alors qu'il n'y avait aucun effet du temps, ni d'interaction entre les facteurs. Les données moyennes par température ($\Sigma T0-7$) ont été regroupées (Fig. 3.2A encadré) et les données de ti ont été retirées puisqu'il n'y avait aucune différence entre les deux groupes initiaux (P=0.996). Excluant ainsi les données ti, une augmentation significative de la concentration de cœlomocytes à 10°C a été observée (Test de T; F:42.1; P=0.000, encadré Fig. 3.2A) chez *L. polaris*. Des travaux antérieurs ont montré que face à une perturbation dans l'aquarium, la concentration des cœlomocytes a tendance à augmenter (observation personnelle). Il s'agirait peut-être là d'un système de défense de l'organisme.

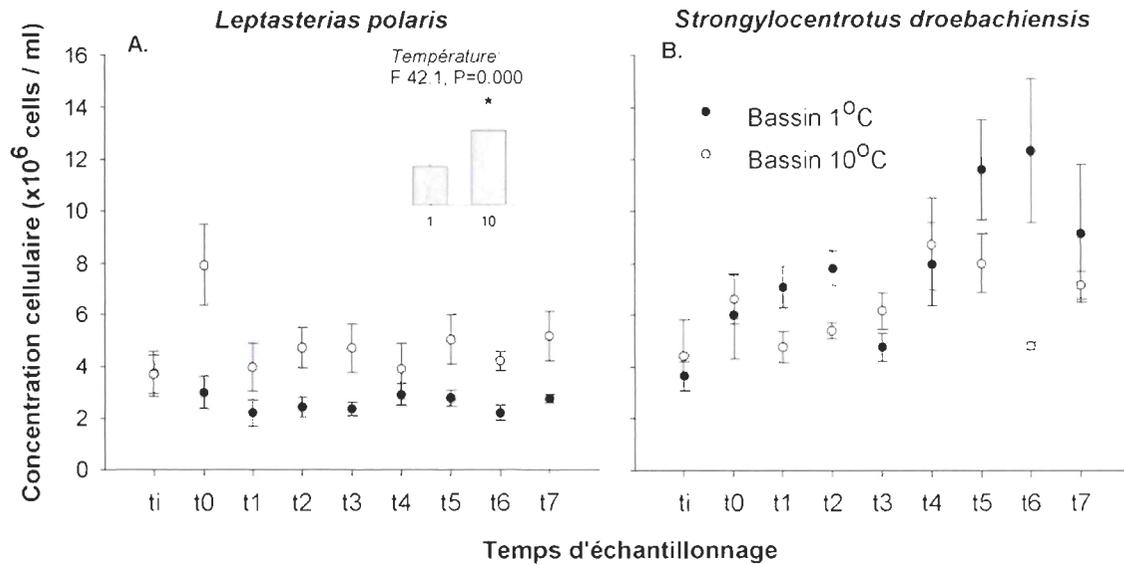


Figure 3.2 Concentration des cœlomocytes pendant l'expérience (ti à t7) sur l'acclimation entre 1°C et 10°C chez *L. polaris* (A) et *S. dræbachiensis* (B). Toutes les particules entre 5 et 16 µm pour *L. polaris* et 3 et 12 µm pour *S. dræbachiensis* ont été comptées à l'aide d'un compteur électronique à particules (Beckman Coulter Counter Z2). Les valeurs présentées sont les moyennes (±ET) et n=3. Chaque groupe est composé de 3 étoiles de mer ou de 5 oursins. **A.** Effet significatif de la température : F:36.0, P=0.000. (ANOVA temps x température). **B.** Aucune différence statistique (ANOVA temps x température).

3.4.4. Protéines

Alors que la quantité de protéines était égale dans le LC (contenant le liquide et les cellules) pour les deux espèces, elle était plus élevée dans les cœlomocytes de *L. polaris* (Tableau 3.1). Aucun effet significatif du temps ou de la température n'a été observé sur la quantité de protéines dans le liquide cœlomique et dans les cellules des échinodermes à l'étude sur les données soustraites des valeurs de t_i . Une différence significative entre t_i et la moyenne des temps (t_0 à t_7) a cependant été notée (ANOVA temps). La concentration moyenne en protéines mesurée dans le LC de *S. dræbachiensis* ($P=0.012$) et *L. polaris* ($P<0.000$) entre t_0 et t_7 (respectivement, 91.5 et 102.7 mg / mL) était supérieure à la valeur obtenue en t_i (respectivement, 46.7 et 22.9 mg / mL).

Le stress des manipulations est grand sur les cœlomocytes puisque chaque semaine, un volume de 2.5 mL est prélevé, forçant l'organisme à dépenser de l'énergie pour fabriquer de nouvelles cellules. Non seulement les organismes continuent de fabriquer les cœlomocytes mais la concentration en protéines est beaucoup plus élevée qu'avant l'expérience. Alors même s'il a été démontré que la synthèse de protéines était 194 fois supérieure chez les larves d'oursins nourris versus non-nourris (Pace et Manahan 2006), le stress engendré par notre expérience n'empêche pas les échinodermes de continuer à synthétiser des protéines, même à 1°C.

Tableau 3.1 Quantité de protéines (mg / mL) dans le liquide cœlomique ([LC], incluant les cellules) et les cœlomocytes ([cellules]) pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C chez *L. polaris* et *S. dræbachiensis*, mesurée par la méthode de Bradford (Kit Coomassie Plus). Les valeurs présentées sont les moyennes (\pm ET). Chaque groupe est composé de 3 étoiles de mer ou de 5 oursins. * indique une différence significative avec t_i (ANOVA temps, *S. dræbachiensis* P=0.012 et *L. polaris* P<0.000).

Espèce	[LC]	[LC]	[cellules]	[cellules]
	t _i	t ₀ à t ₇	t _i	t ₀ à t ₇
<i>S. dræbachiensis</i>	47 \pm 12	91* \pm 21.4	n.d.	27 \pm 8
<i>L. polaris</i>	23 \pm 8	103* \pm 24.4	n.d.	51 \pm 8

3.4.5. Viabilité cellulaire

Un effet significatif du temps a été observé sur la viabilité cellulaire, mesurée au MTT, chez *L. polaris* (Fig. 3.3A; ANOVA temps x température : temps F:2.90, P=0.017) sans effet significatif de la température, ni interaction entre les facteurs. La seule différence significative se retrouvait entre ti et les autres temps. Aucune différence significative (P=0.7456) sur les données initiales entre les deux groupes (ti) n'a été observée permettant ainsi de comparer les données de ti (groupes confondus) avec le reste des données (groupe et temps confondus). La viabilité cellulaire était ainsi plus élevée dès le début de l'expérience, peu importe la température ou le temps d'échantillonnage (Fig. 3.3A encadré); Test de T : F:15.3, P=0.000). Le simple changement d'aquarium et la manipulation hebdomadaire (prélèvement de LC et mesure de consommation d'oxygène) ont peut-être été suffisants pour perturber les organismes et augmenter légèrement la viabilité cellulaire, une mesure de l'activité cellulaire.

Quant à *S. dræbachiensis* (Fig. 3.3B), un effet significatif de la température a été observé sur la viabilité cellulaire (ANOVA temps x température : Température F:7.7, P=0.009) sans effet du temps, ni d'interaction entre les facteurs. Aucune différence significative n'a, de plus, été observée sur les données initiales entre les deux groupes (ti) (P=0.285) permettant de les retirer pour chaque groupe de température. À 10°C, une diminution significative (Test de T; F:7.6, P=0.009) de la viabilité cellulaire a été observée chez *S. dræbachiensis* (Fig. 3.3B encadré).

Par contre, pour les deux espèces, en comparant les données de l'expérience sur l'acclimatation à 1°C et 10°C avec des données de viabilité cellulaire récoltées de juillet à décembre précédents (prises sur d'autres individus dans un bassin mère, équivalent à ti), il est évident que la température n'a pas engendré une augmentation de la viabilité cellulaire à hauteur de celle mesurée en été ou en automne lorsque la température avoisine 10°C. En été, la viabilité cellulaire était deux fois supérieure chez *S. dræbachiensis* et plus de quatre fois supérieure chez *L. polaris* (Tableau 3.2). Plus précisément, lors de mesure obtenue en dehors de l'expérience sur l'acclimatation, chez *S. dræbachiensis*, la viabilité cellulaire

moyenne obtenue entre juillet et fin septembre 2006 (0.36) était significativement différente de la viabilité cellulaire moyenne entre novembre et décembre (0.17) lorsque la température était juste en dessous de 5°C. Elle était aussi significativement différente des données obtenues à 1°C (0.22) et 10°C (0.15) dans les bassins de l'expérience sur l'acclimatation (ANOVA Température, $P < 0.000$, post-hoc Tukey $P < 0.05$). Aucune différence significative n'a été notée entre les groupes à 4.7°C (température naturelle entre novembre et décembre), 1°C (température hivernale dans les bassins de l'expérience) et 10°C (température d'acclimatation). Chez *L. polaris*, la viabilité cellulaire moyenne obtenue entre juillet et fin septembre 2006 (0.13) était aussi significativement différente de la viabilité cellulaire moyenne entre novembre et décembre (0.01) et des autres données prises à 1°C (0.04) et 10°C (0.05) (ANOVA température, $P < 0.000$, post-hoc Tukey $P < 0.05$). La viabilité cellulaire des cœlomocytes de *L. polaris* dans les bassins de l'expérience (1°C et 10°C) est statistiquement légèrement supérieure à celle mesurée chez des individus du bassin mère prise entre novembre et décembre (4.7°C). Il y a donc bel et bien eu une légère augmentation de la viabilité des cellules pendant l'expérience. Nous pensons que cela est dû au stress causé par les manipulations hebdomadaires de l'expérience et que cela pourrait faire parti d'un système de défense global comme suggéré plus haut avec la concentration des cœlomocytes (3.1.2).

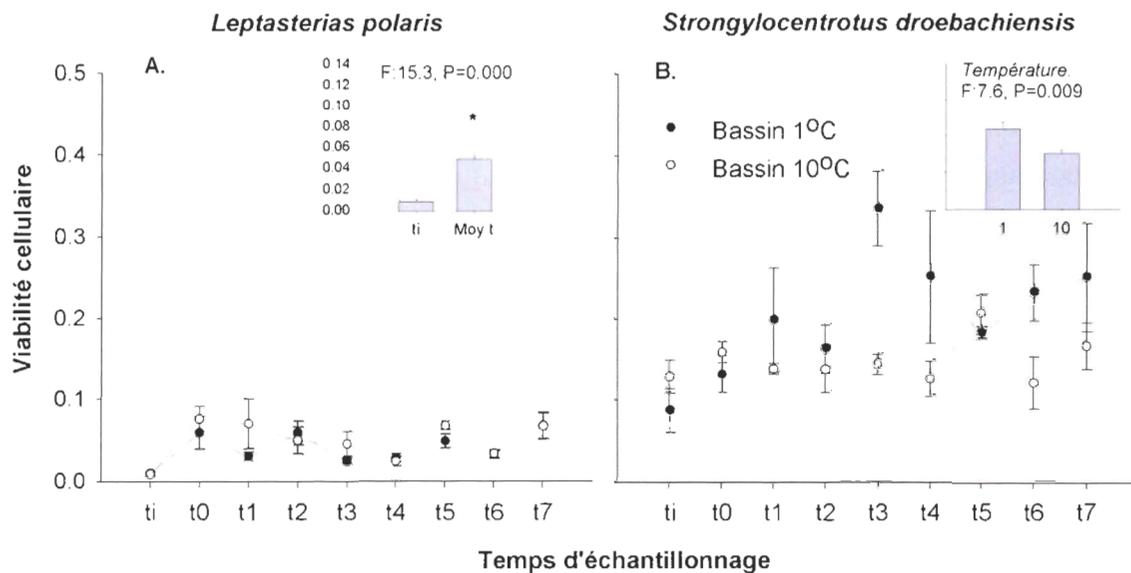


Figure 3.3 Viabilité cellulaire des cœlomocytes pendant l'expérience sur l'acclimation entre 1°C et 10°C chez *L. polaris* (A) et *S. droebachiensis* (B), mesurée par le test du tétrazolium en microculture. Les valeurs présentées sont les moyennes (\pm ET) et $n=3$. Chaque groupe est composé de 3 étoiles de mer ou de 5 oursins. **A.** Effet significatif du temps : F:2.90, P=0.017. (ANOVA temps x Température). **B.** Effet significatif de la Température : F:7.7, P=0.009. (ANOVA temps x Température).

L'hypothèse initiale de cette expérience était que l'augmentation de la température provoquerait la reprise de l'activité telle que mesurée par le MTT dans les cœlomocytes de l'ordre de grandeur des données obtenues en été. Il est bien évident que cela n'a pas été le cas et que l'augmentation de la température n'a pas suffi à casser le cycle des saisons. C'est le stress des manipulations qui a plusieurs fois semblé engendrer une réaction des échinodermes et non la température. Ainsi, il y a eu des différences significatives entre les données mesurées à t_i et la moyenne des données récoltées de t_0 à t_7 au sujet des protéines (pour les deux espèces) et du MTT (pour *L. polaris* seulement). La taille des cœlomocytes a également diminué dans le temps chez *S. dræbachiensis*. Les organismes n'ont fait que subir le stress (de l'augmentation de la température ou de la manipulation hebdomadaire) en activant peut être un possible mécanisme de protection mais sans vraiment ressentir un changement de saison. L'hiver est une période critique pour la viabilité des organismes vivants en milieu tempéré et arctique où les saisons sont marquées principalement par des variations de facteurs abiotiques comme la température de l'eau, l'intensité lumineuse, la photopériode et parfois un couvert de glace ainsi que par des facteurs biotiques comme la disponibilité alimentaire, la reproduction, la prédation et la compétition entre espèces (Berg et Bremset 1998). La température n'est donc pas le seul facteur signalant le changement des saisons et la reprise d'activité après une période de ralentissement métabolique. D'ailleurs, chez le mollusque *Cellena tramoserica*, une augmentation de l'abondance de nourriture en hiver induit une augmentation du métabolisme sans que la température ne soit impliquée (Parry 1978). Donc, même si la température de nos bassins a été augmentée, le manque de disponibilité de nourriture pourrait avoir maintenu le statu quo du métabolisme.

Tableau 3.2 Viabilité cellulaire moyenne chez *L. polaris* et *S. dræbachiensis* mesurée au MTT avant l'expérience sur l'acclimatation à une moyenne de 9.7°C entre juillet et septembre 2006 (n= 3) et à 4.7°C entre novembre et décembre 2006 (n=5) et pendant l'expérience sur l'acclimatation à l'hiver 2007 à 1°C (n=7, température hivernale) et 10°C (n=7, température d'acclimatation). Les valeurs présentées sont les moyennes (\pm ET) et n=3 (entre juillet et septembre) et n=5 (entre novembre et décembre). Différence significative (ANOVA température) chez *S. dræbachiensis* (P<0.000) et *L. polaris* (P<0.000). Les lettres différentes indiquent une différence significative selon le test post-hoc de Tukey (P<0.05).

Espèce	Entre juillet et septembre 2006	Entre novembre et décembre 2006	Expérience sur l'acclimatation de t0 à t7	Expérience sur l'acclimatation de t0 à t7
	T _{moy} = 9.7°C	T _{moy} = 4.7°C	T = 1°C	T = 10°C
<i>S. dræbachiensis</i>	0.36 ^a \pm 0.06	0.17 ^b \pm 0.06	0.22 ^b \pm 0.09	0.15 ^b \pm 0.04
<i>L. polaris</i>	0.13 ^a \pm 0.02	0.01 ^b \pm 0.004	0.04 ^c \pm 0.02	0.05 ^c \pm 0.03

3.4.6. Consommation d'oxygène

Une forte variabilité de la consommation d'oxygène entre les répliquas a été observée chez les deux espèces. *L. polaris* semblait cependant consommer généralement un peu plus que *S. dræbachiensis* (Tableau 3.3). Une tendance à la hausse de la consommation d'oxygène par *L. polaris* a été observée immédiatement (dès t_0) après l'augmentation de la température avant de retourner à une consommation semblable à T_i mais très variable. Il est difficile de tirer une tendance de la consommation d'oxygène chez *S. dræbachiensis*. Cependant, les valeurs obtenues sont semblables aux valeurs rapportées par Binyon (1972) dans son ouvrage de référence sur la physiologie des échinodermes. En effet, il est rapporté que le genre *Asterias* consomme de 0.024 à 0.074 mL d'O₂ / h / g et que le genre *Strongylocentrotus* consomme de 0.020 à 0.036 mL d'O₂ / h / g (sans mention de la correction allométrique) (Binyon 1972). Des données plus récentes sur *Acanthaster planci*, une espèce vivant sur la barrière de corail australienne, ont rapporté une consommation aussi élevée que 0.449 mL d'O₂ / h / g, sans spécification au sujet de la correction allométrique (Kettle et Lucas 1987). Il y a cependant beaucoup de variabilité entre les espèces même de masse semblable (Binyon 1972) et un suivi saisonnier de la consommation d'oxygène des espèces *L. polaris* et *S. dræbachiensis*, qui sont des espèces d'eau froide, permettrait d'avoir une vue d'ensemble sur la consommation afin de faire une véritable comparaison. Il serait alors intéressant que certains individus soient nourris à satiété et d'autres soient à jeun afin de documenter l'importance de l'alimentation dans le métabolisme en général chez ces espèces.

Le fait que les animaux aient été à jeun pendant toute la durée de l'expérience pourrait avoir eu un impact sur la consommation d'oxygène. En effet, la température n'a pas été identifiée comme un facteur important faisant varier la consommation d'oxygène chez l'espèce *Paracentrotus lividus* lorsque les animaux sont gardés à jeun (Basuyaux *et al.* 2001). Par contre, lorsque les animaux étaient nourris avec des algues (*Laminaria sp.*) ou avec du maïs (nourriture d'élevage), l'activité métabolique et la consommation

d'oxygène augmentaient en fonction de l'augmentation de la température (entre 12°C et 24°C). Par exemple, à 12°C, un oursin de 60g, à jeun ou nourri de laminaires consommait 1.8 mg d'O₂ / h tandis qu'à 24°C, il consommait 3 mg d'O₂ / h à jeun et 5 mg d'O₂ / h lorsqu'il était nourri de laminaires (Basuyaux *et al.* 2001). Il faut cependant ajouter que les oursins ne sont probablement jamais complètement à jeun car ils conservent dans leur intestin de la nourriture en attendant la prochaine période d'alimentation. Une période de 50 jours ne suffit pas à épurer l'animal (Mamelona 2004). Pendant l'expérience présentée ici, les animaux ont été nourris à satiété avant l'expérience puis gardés à jeun pendant toute la durée de l'expérience (10 jours d'acclimatation + 7 semaines de suivi).

Tableau 3.3 Consommation d'O₂ (mL d'O₂ / h / g) de *L. polaris* (3 individus) et *S. dræbachiensis* (5 individus) pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C, mesurée dans une chambre de 1 L à l'aide d'une sonde YSI (5331) et des électrodes (Yellow Springs). Les valeurs présentées sont les moyennes (±ET) et n=3. Aucun traitement statistique n'a été appliqué.

	<i>L. polaris</i>		<i>S. dræbachiensis</i>	
	1°C	10°C	1°C	10°C
ti	0.094 ± 0.031	0.096 ± 0.031	0.045 ± 0.007	0.093 ± 0.031
t0	0.063 ± 0.044	0.212 ± 0.017	0.011 ± 0.002	0.120 ± 0.024
t1	0.082 ± 0.033	0.121 ± 0.036	0.023 ± 0.009	0.076 ± 0.025
t2	0.095 ± 0.040	0.191 ± 0.017	0.028 ± 0.001	0.099 ± 0.017
t3	0.056 ± 0.024	0.104 ± 0.019	0.080 ± 0.020	0.062 ± 0.010
t4	0.106 ± 0.020	0.065 ± 0.018	0.037 ± 0.038	0.047 ± 0.035
t5	0.062 ± 0.015	0.120 ± 0.039	0.033 ± 0.032	0.090 ± 0.024
t6	0.121 ± 0.016	0.071 ± 0.005	0.086 ± 0.005	0.094 ± 0.018
t7	0.054 ± 0.020	0.138 ± 0.009	0.018 ± 0.016	0.084 ± 0.042
Moy t0-t7	0.080 ± 0.034	0.128 ± 0.053	0.039 ± 0.032	0.080 ± 0.031

3.4.7. Acide gras

Composition en acides gras (AG) des cœlomocytes et rôle fonctionnel

Les types d'AG représentant plus de 2% des AG totaux chez *L. polaris* et chez *S. dræbachiensis* sont présentés au tableau 3.4. Pour ti, la moyenne des deux groupes a été effectuée puisque les organismes ont tous été prélevés dans un bassin mère à 1°C et qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes. Les cœlomocytes étaient constitués à plus de 80% de phospholipides, seules classes de lipides mesurés avec les stérols au Iatroscan® (données non présentées). Les analyses au Iatroscan® ont été réalisées sur les extraits de lipides totaux avant la séparation en fractions neutre et polaire. Cette forte proportion en phospholipides était prévisible puisque ce sont des lipides caractéristiques des membranes cellulaires. Chez *L. polaris* à ti, les AG présents dans les cœlomocytes étaient, en ordre d'abondance, 20:5n-3 (~23%), 20:1n-11 (~21%), 20:4n-6 (~14.5%), 18:0 (~9.5%) soit ~70% des lipides totaux. Chez *S. dræbachiensis*, les AG majeurs présents à Ti dans les cœlomocytes étaient, en ordre d'abondance, 20:5n-3 (~17%), 20:4n-6 (~17%), 20:1n-11 (~11%), 16:0 (~13%), 18:0 (~8%), 14:0 (~7.5%) soit ~73% des lipides totaux. Il est également intéressant de mentionner la présence du 20:2 NMI à 4% chez les deux espèces.

Il est connu que les échinodermes ont une signature d'AG bien particulière. Une proportion plus élevée que les autres organismes marins en 20:4n-6, 20:1n-11 et 20:2 NMI a été observée chez les échinodermes, avec des différences entre les espèces et les tissus (Copeman et Parrish 2003, Sargent *et al.* 1983). Le 20:4n-6 et le 20:2 NMI dans les cœlomocytes de *L. polaris* (14.5% et 4%) et *S. dræbachiensis* (17% et 3%) étaient en proportion similaire ou supérieure à celle retrouvée dans les tissus de trois astéries (*Crossaster papposus*, *Pteraster sp.* et *Ctenodiscus crispatus*), une ophiure (*Ophiura sarsi*) et une holothurie (*Chiridota laevis*). Par contre, la proportion du 20:1n-11 était encore beaucoup plus grande dans les cœlomocytes que dans le tissu des espèces étudiées par

Copeman et Parrish (2003). Aucune mention du 20:1n-11 ni du 20:2 NMI n'apparaît dans la composition lipidique des ovaires de l'astérie *Ctenodiscus crispatus* (Sargent *et al.* 1983). Une forte présence d'AG d'origine bactérienne a été notée dans l'animal au complet (Copeman et Parrish 2003) ou dans les ovaires d'échinodermes (Sargent *et al.* 1983) alors que nous n'avons pas observé ce type d'AG dans les cœlomocytes des deux espèces. On ne peut toutefois pas écarter le doute d'une contamination bactérienne dans les échantillons d'animal au complet ou des ovaires. Les cœlomocytes montrent donc une signature en AG qui leur est propre avec une proportion élevée de 20:4n-6, 20:1n-11 et AG NMI.

La diète ne peut pas à elle seule expliquer la signature particulière des échinodermes et de leurs cœlomocytes comme le suggère Sargent *et al.* (1983). D'abord, de fortes proportions en 20:4n-6 ont été observées chez des échinodermes ayant des diètes différentes, en comparant la présente étude et celle de Copeman et Parrish (2003). Selon ces derniers, les échinodermes auraient une meilleure capacité de rétention et d'incorporation du 20:4n-6. Mais l'alimentation n'apparaît pas comme un facteur clé dans les profils d'AG des cœlomocytes à l'étude ici. L'oursin a pourtant un comportement alimentaire particulier car il semble conserver de la nourriture dans son intestin jusqu'à sa prochaine période d'alimentation (Mamelona 2004) mais cela ne semble pas être le cas de l'étoile de mer. Malgré cette différence de mode d'alimentation et de digestion, les deux organismes ont un profil d'AG atypique. Alors, même si certains types de cœlomocytes ont un rôle de stockage, les organismes étaient à jeun (ou en digestion lente dans le cas de l'oursin) et donc, en toute logique, les ressources lipidiques qu'ils mobilisaient dans cette condition devaient être fonctionnelles ou structurelles, c'est-à-dire nécessaires au maintien de leur activité biologique. En effet, les organismes marins sont capables de rétention sélective pour assurer le fonctionnement de leur cellule (Pernet et Tremblay 2004).

Tableau 3.4 Composition en acides gras des cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C mesurée par chromatographie gazeuse. Les valeurs présentées sont les moyennes (\pm ET) et n=3 exprimés en mol %. Une moyenne des deux groupes de Ti est présentée, car il n'y avait aucune différence significative (Test de T). Seuls les acides gras contribuant à >2% ont été rapportés. Σ insat. inclus des traces (<2%) de 22:6n-3, 16:4n-1+3, 18:3n-3, 20:2n-6, 18:2n-4+9, 16:2n-4+9, 18:1n-7+9, 16:1n-5+7, 15:1n-5, 14:1n-7.

	(%)	T (°C)	<i>Leptasterias polaris</i>					<i>Strongylocentrotus dræbachiensis</i>				
			ti	t0	t2	t5	t7	ti	t0	t2	t5	t7
14:00	1		1.6 \pm 0.9	1.1 \pm 1.1	2.2 \pm 0.6	1.9 \pm 0.7	2.9 \pm 0.2	7.3 \pm 0.8	6.6 \pm 0.2	6.8 \pm 1.6	6.3 \pm 1.0	7.0 \pm 0.3
	10			2.4 \pm 0.6	2.8 \pm 0.6	1.8 \pm 0.1	2.4 \pm 1.6		4.0 \pm 0.9	8.0 \pm 1.1	7.6 \pm 1.9	8.1 \pm 0.3
16:0	1		5.0 \pm 0.5	4.4 \pm 1.0	5.1 \pm 2.3	5.3 \pm 2.1	5.0 \pm 1.0	12.8 \pm 1.1	12.6 \pm 0.7	10.8 \pm 1.7	13.5 \pm 4.6	12.3 \pm 1.2
	10			5.5 \pm 0.2	4.8 \pm 1.3	4.5 \pm 0.9	5.4 \pm 0.6		7.4 \pm 0.6	12.8 \pm 0.7	15.3 \pm 2.9	14.2 \pm 0.7
18:0	1		9.4 \pm 0.9	9.3 \pm 0.4	7.4 \pm 1.4	7.6 \pm 1.9	9.3 \pm 1.2	7.6 \pm 2.6	8.4 \pm 1.2	6.3 \pm 0.5	7.5 \pm 1.1	7.7 \pm 0.6
	10			10.4 \pm 0.6	8.8 \pm 1.0	9.5 \pm 0.9	8.1 \pm 5.2		5.2 \pm 0.5	8.5 \pm 1.4	7.6 \pm 1.3	9.9 \pm 3.2
20:0	1		3.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.4	2.6 \pm 0.4	2.4 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.4
	10			3.0 \pm 0.2	2.6 \pm 0.5	2.6 \pm 0.3	1.8 \pm 1.1		0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
20:1n-11	1		21.6 \pm 2.1	17.3 \pm 0.9	19.1 \pm 1.6	22.4 \pm 1.9	21.6 \pm 2.9	11.7 \pm 1.3	10.7 \pm 1.0	8.4 \pm 2.1	13.3 \pm 1.7	13.1 \pm 2.7
	10			20.1 \pm 2.0	21.5 \pm 1.1	22.0 \pm 1.2	13.3 \pm 9.0		6.0 \pm 0.9	9.7 \pm 0.9	14.2 \pm 2.9	9.7 \pm 3.5
22:1n-9	1		1.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	2.6 \pm 1.5	1.5 \pm 1.5	1.5 \pm 0.8	3.4 \pm 1.1	3.4 \pm 1.8	10.0 \pm 9.7	2.4 \pm 0.4	2.6 \pm 0.6
	10			1.0 \pm 0.1	1.2 \pm 0.4	0.8 \pm 0.1	2.1 \pm 2.3		1.5 \pm 0.2	4.9 \pm 2.6	2.7 \pm 0.4	8.6 \pm 9.1
20:2 NMI	1		4.0 \pm 0.5	4.3 \pm 1.0	4.0 \pm 0.8	4.2 \pm 0.3	4.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.4	3.8 \pm 0.8	4.4 \pm 1.0	4.7 \pm 1.0	4.7 \pm 0.3
	10			3.4 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	4.3 \pm 0.1	2.7 \pm 1.8		0.4 \pm 0.6	4.4 \pm 0.2	3.9 \pm 0.8	2.8 \pm 0.4
18:4n-1	1		0.8 \pm 0.2	3.5 \pm 0.6	2.3 \pm 0.3	2.8 \pm 0.9	2.9 \pm 0.6	1.7 \pm 1.3	1.8 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6	2.8 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5
	10			2.6 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	2.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.9	\pm	1.1 \pm 0.6	2.2 \pm 0.1	2.0 \pm 0.6	2.3 \pm 0.3
18:4n-3	1		2.4 \pm 1.1	0.7 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.6	1.6 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2	1.7 \pm 0.4	1.2 \pm 0.6
	10			1.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	1.8 \pm 1.5		0.9 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	2.2 \pm 1.3
20:4n-6	1		14.6 \pm 2.3	14.0 \pm 2.6	14.8 \pm 0.6	16.1 \pm 2.3	15.8 \pm 2.8	17.1 \pm 2.3	16.5 \pm 1.2	15.9 \pm 1.2	15.0 \pm 3.4	16.0 \pm 1.9
	10			15.6 \pm 2.9	15.4 \pm 2.8	16.2 \pm 3.8	11.7 \pm 8.1		9.7 \pm 1.0	17.7 \pm 1.3	16.1 \pm 4.4	13.0 \pm 1.0
20:5n-3	1		22.8 \pm 2.3	26.5 \pm 0.6	24.0 \pm 2.2	22.6 \pm 2.4	22.3 \pm 1.6	16.8 \pm 3.0	16.9 \pm 4.4	17.0 \pm 3.9	15.9 \pm 3.1	15.5 \pm 1.4
	10			23.3 \pm 2.6	22.7 \pm 3.6	22.6 \pm 4.0	13.0 \pm 7.5		9.7 \pm 1.7	16.5 \pm 1.6	14.0 \pm 1.5	12.6 \pm 1.0
Σ insat.	1		244 \pm 9.4	264 \pm 12	251 \pm 10	251 \pm 15	250 \pm 6	215 \pm 12.3	216 \pm 18	220 \pm 18	211 \pm 24	216 \pm 3
	10			245 \pm 5	245 \pm 6	248 \pm 8	237 \pm 22		162 \pm 19	215 \pm 9	196 \pm 24	190 \pm 9

Le fait que l'on retrouve une répartition sélective des AG dans certains types de cellules et pas d'autres, comme le DHA dans les cellules de la vue, les neurones ou encore le sperme, a suggéré l'importance fonctionnelle de ces AG (Glencross 2009). Ceci pourrait donc expliquer la présence des AG propres aux échinodermes dans les cœlomocytes. Par exemple, la présence de 20:4n-6 dans les cœlomocytes pourraient être reliée à la fonction même de ces cellules. En effet, une diète riche en 20:4n-6 stimule l'activité des hémocytes (phagocytose et production des espèces réactives de l'oxygène) chez les bivalves (Delaporte *et al.* 2006) en stimulant la synthèse des prostaglandines (Seguineau *et al.* 2011). Chez les vertébrés supérieurs, il y a une forte proportion d'AG (n-6) par rapport aux AG (n-3) dans les cellules immunitaires et le 20:4n-6 semble à lui tout seul très important pour la phagocytose en général (Borda *et al.* 1998, Davidson *et al.* 1998). Par contre, chez les vertébrés inférieurs comme les poissons, les AG (n-3) semblent avoir une importance plus grande sur la phagocytose. Davantage d'études sur l'effet de l'AG 20:4n-6 dans les cœlomocytes (ou les hémocytes) sont nécessaires pour connaître le rôle de cet AG sur la capacité immunitaire des invertébrés marins.

La présence du 20:1n-11 et du 20:2 NMI dans les cœlomocytes reste plus intrigante, car ces AG ne sont généralement pas présents dans ces proportions chez les organismes marins. À notre connaissance, deux études sont disponibles sur la composition lipidique des cellules immunitaires d'invertébrés marins et ces deux AG n'ont été retrouvés ni dans les hémocytes des bivalves *Crassostrea gigas* et *Ruditapes philiparum* (Le Grand *et al.* 2011), ni dans les amœbocytes de la limule *Limulus polyphemus* (MacPherson *et al.* 1998). Ils n'ont pas non plus été mesurés dans les cellules sanguines des vertébrés comme l'humain (Risè *et al.* 2007). Tout comme le 20:4n-6, le 20:1n-11 et le 20:2 NMI pourraient avoir un rôle à jouer dans une fonction physiologique du cœlomocyte ou tout simplement dans sa structure. Le rôle des NMI n'est toujours pas bien compris. Une incorporation compétitive entre les NMI et les AGPI a été suggérée chez les organismes marins et une corrélation partielle entre le 20:0 NMI et le 22:0 NMI et une déficience en AG essentiels a été établie

(Klingensmith 1982, Pirini *et al.* 2007). La distribution sélective favorisant les organes et les tissus exposés à l'environnement externe suggère un rôle fonctionnel et structurel certain dans les membranes biologiques. Cela pourrait représenter une adaptation biochimique importante du benthos à son habitat spécifique (Barnathan 2009). En effet, les organismes marins, comme les oursins et les moules, ont la capacité de synthèse des NMI (Barnathan 2009), ce qui est un avantage pour des organismes soumis à des variations fréquentes de température et incapable de synthétiser *de novo* des AGPI pour répondre aux besoins structurels des membranes cellulaires lorsqu'un changement de température survient dans le milieu (Pirini *et al.* 2007). Le fait de maintenir des organismes à jeun durant sept semaines pourrait avoir entraîné un épuisement des réserves d'AG essentiels, tels le 20:4n6 et le 20:5n3 et l'obligation de synthétiser des NMI comme AG de remplacement.

Le fait que le 20:1n-11 soit habituellement absent ou en faible quantité dans la composition lipidique des organismes vivants doit expliquer la faible documentation à son sujet dans la littérature scientifique. La nature des AG présents dans les membranes cellulaires a une influence majeure sur les propriétés de membranes (Hulbert *et al.* 2005). Chaque AG a ses propriétés et celles du cis-9-eicosenoic (20:1n-11) pourraient faire de lui un AG incorporé de préférence par les échinodermes pour structurer les membranes cellulaires. Le nom trivial du 20:1n-11, acide gadoleic, fait référence à l'espèce marine chez qui il a été identifiée la 1^{ière} fois : *Gadus morhua* (Tocher 2003). Les voies de synthèse n'étant pas ou peu connues chez les échinodermes, le 20:1n-11 pourrait être un précurseur d'un AG biologiquement actif. La famille des eicosanoïdes (C20) est importante pour la production des leukotriènes et des prostaglandines par les cellules immunitaires (Glencross 2009).

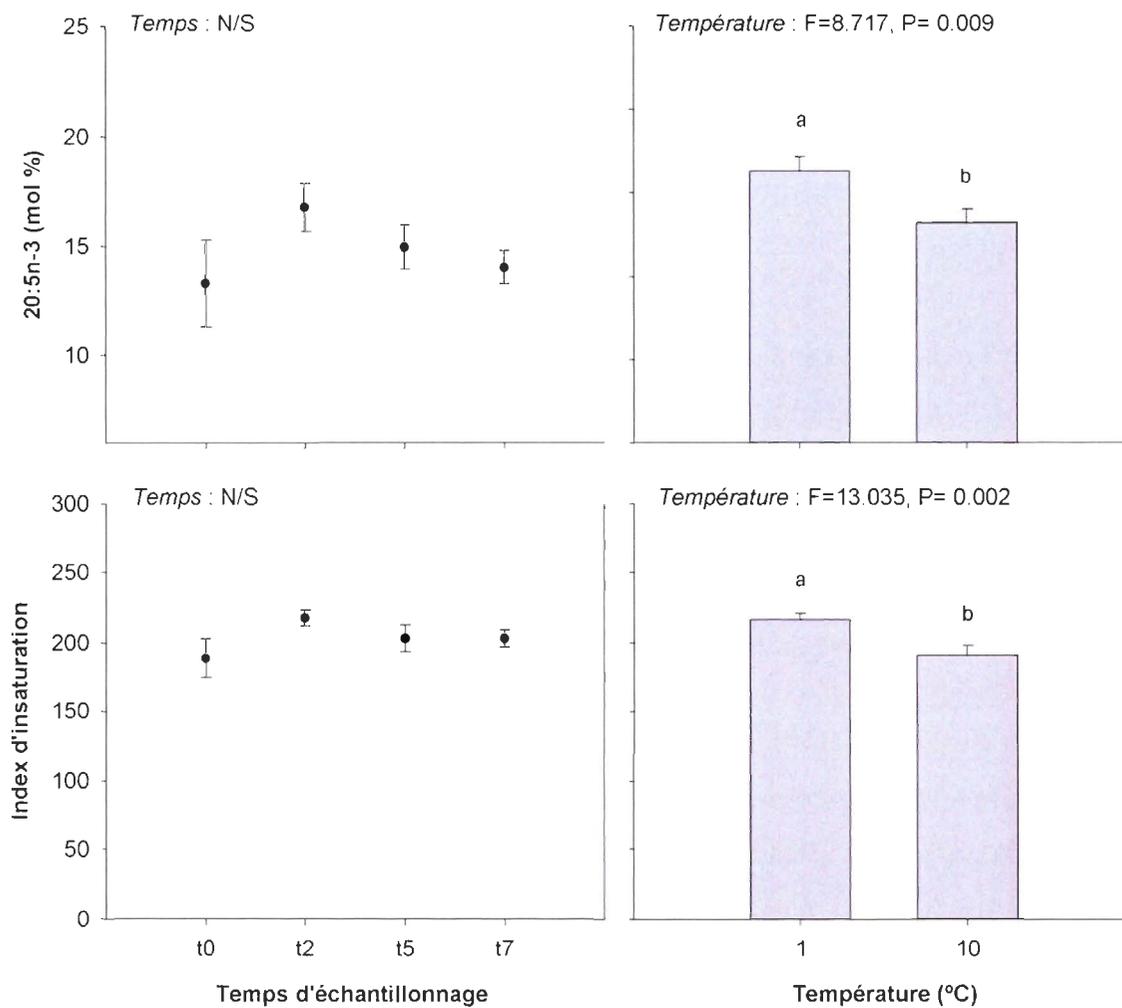


Figure 3.4 Index de saturation et quantité en mol % de l'acide gras 20:5n-3 dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* (moyenne \pm ET). L'index d'insaturation est la somme des mol % de chaque acide gras insaturé multiplié par le nombre de doubles liens de l'acide gras. * représente une différence significative par rapport au t0. Les lettres différentes représentent également une différence significative entre les 2 mesures. N/S signifie que le facteur identifié n'a pas d'effet significatif sur la mesure effectuée. Aucune interaction statistique entre les facteurs (ANOVA : temps x Température).

Réponse des lipides à l'acclimatation

Chez *S. dræbachiensis*, une diminution significative de l'index d'insaturation (la somme des mol % de chaque acide gras insaturé multipliée par le nombre de doubles liens de l'acide gras) a été mesurée à 10°C (Fig. 3.4) sans effet du temps (ANOVA temps x Température, F: 4.368, P=0.050). Chez *L. polaris*, une diminution significative de l'index d'insaturation a également été mesurée à 10°C (Fig. 3.5) sans effet du temps (ANOVA temps x Température, F: 13.035, P=0.002). Aucune interaction entre les facteurs n'a été démontrée chez les deux espèces. Aucune différence statistique n'a été observée entre les valeurs de ti chez les deux espèces (ti *S. dræbachiensis* P=0.491 et ti *L. polaris* P=0.885), permettant ainsi de les retirer de l'analyse de variance (Fig. 3.4 et 3.5).

Cette diminution de l'index d'insaturation (donc des AG insaturés) lors de l'augmentation de la température indique un changement des phospholipides insaturés membranaires puisque la majorité des lipides analysés étaient des phospholipides issus des membranes des cœlomocytes (les échantillons ont de plus, été passés sur une colonne de silice afin de ne conserver que les lipides polaires). Ceci concorde avec l'adaptation homéovisqueuse (HVA) observée généralement pour contrer les variations de température. Selon l'HVA, la membrane plasmique conserve un environnement physique optimal pour le fonctionnement des protéines malgré les variations de température. En effet, afin de conserver une certaine fluidité membranaire permettant l'activité biologique, les ectothermes contrecarrent l'effet d'ordination induite par une diminution de la température en réarrangeant la composition lipidique de leur membrane cellulaire (Hazel 1995). Une augmentation des AG insaturés est souvent observée en réponse à la diminution de température (Hazel 1995, Pernet *et al.* 2006). Chez *S. dræbachiensis* et *L. polaris*, une diminution de 3% de la proportion du 20:5n-3 a été mesurée avec l'augmentation de la température à 10°C (Fig. 3.4 et 3.5, ANOVA temps x Température, Température respectivement F=8.717; P=0.009 et F=4.723; P=0.046) sans effet du temps sauf pour *L.*

polaris à t5 (ANOVA temps x température, Temps F=3.969; P=0.029, post hoc Tukey, respectivement P=0.029).

L'augmentation de la température a donc engendré un remodelage des lipides membranaires dans les cœlomocytes chez *S. dræbachiensis* et *L. polaris* comme le prédit l'adaptation homéovisqueuse. Une relation très forte entre la fluidité membranaire et le 20:5n-3 a été démontrée dans les branchies du bivalve *Plactopecten magellanicus* où une diminution de la température induisait une augmentation de 20:5n-3 (Hall *et al.* 2002). Mentionnons cependant que le modelage des lipides est survenu qu'à la toute fin des expériences.

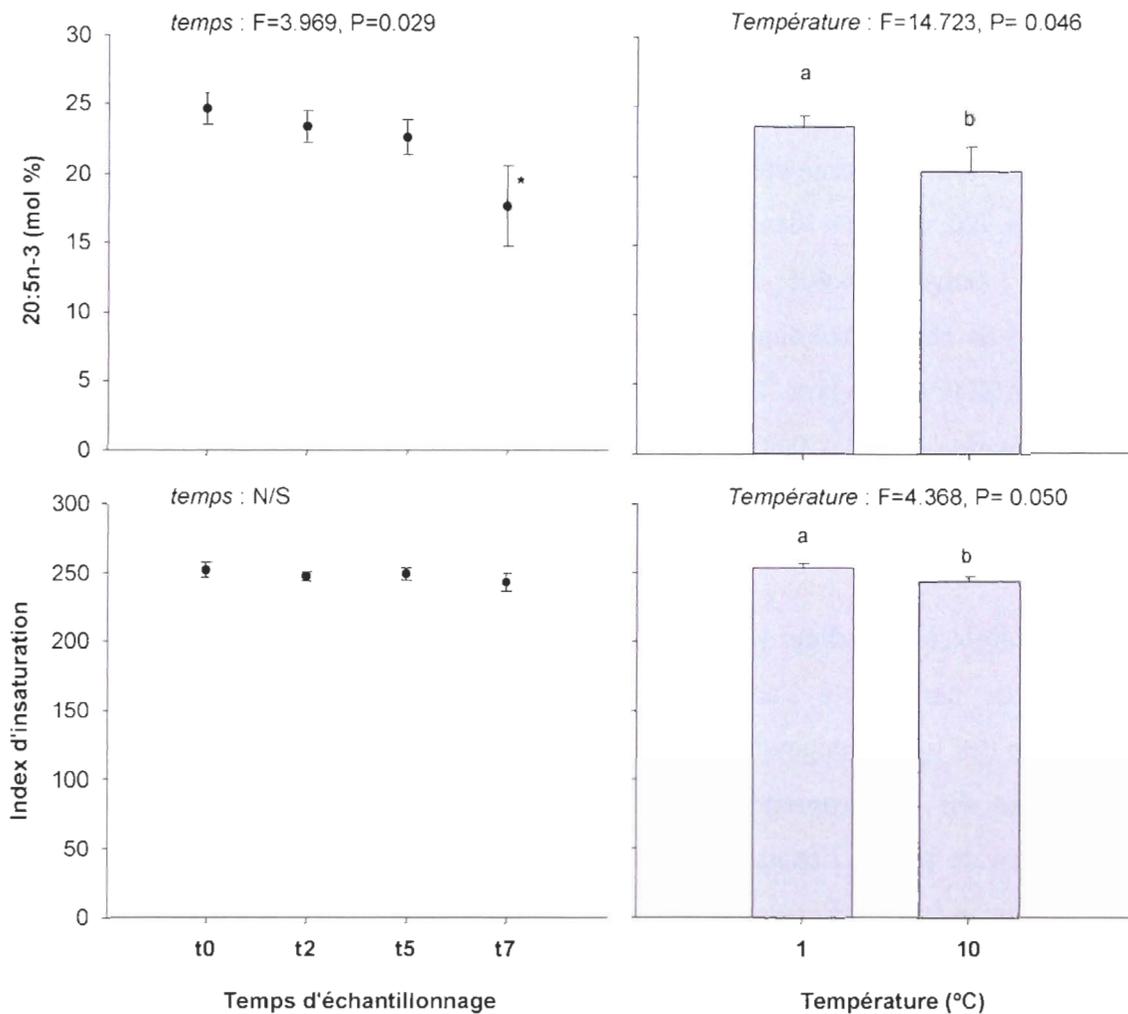


Figure 3.5 Index de saturation et quantité en mol % de l'acide gras 20:5n-3 dans les cœlomocytes de *L. polaris* (moyenne \pm ET). L'index d'insaturation est la somme des mol % de chaque acide gras insaturé multipliée par le nombre de doubles liens de l'acide gras. * représente une différence significative par rapport au t0. Les lettres différentes représentent également une différence significative entre les 2 mesures. N/S signifie que le facteur identifié n'a pas d'effet significatif sur la mesure effectuée. Aucune interaction statistique entre les facteurs (ANOVA : temps x Température).

3.4.8. Cholestérol

Les quantités de cholestérol dans les cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* sont présentées au tableau 3.5. Les valeurs étaient assez variables, mais des différences statistiques ont tout de même été notées (Fig. 3.6). Une diminution de la concentration de cholestérol a été mesurée dans le temps chez *S. dræbachiensis* (ANOVA temps x Température : temps F=4.605; P=0.017) à T5 (post hoc Tukey, P=0.010). À 10°C, la concentration de cholestérol dans les cœlomocytes était significativement plus faible chez *L. polaris* (ANOVA temps x Température : Température F=6.715; P=0.020) (Fig. 3.6). Aucune interaction entre les facteurs n'a été démontrée pour les deux espèces et les valeurs de ti n'étant statistiquement pas différentes pour les deux espèces (ti *S. dræbachiensis* P=0.188 et ti *L. polaris* P=0.055), elles ont été retirées de l'analyse de variance (Fig. 3.6).

Le cholestérol n'a donc probablement pas (chez *L. polaris*) ou très peu (chez *S. dræbachiensis*) participé à l'adaptation homéovisqueuse, c'est-à-dire la réorganisation membranaire des lipides engendrée par une variation de température. Le cholestérol a un rôle physique sur les propriétés membranaires telles que la fluidité membranaire, le comportement de phase, l'épaisseur et la perméabilité des membranes. Plusieurs de ces propriétés sont influencées par une variation de température et on s'attend à ce qu'une augmentation de température engendre une augmentation de cholestérol membranaire afin de maintenir un certain ordre dans les membranes cellulaires permettant ainsi le maintien des activités biologiques (Crockett 1998). Cependant, le rôle du cholestérol dans les membranes cellulaires n'est pas aussi simple. La modulation du cholestérol dans la membrane plasmique en réponse à l'acclimatation à la température est très variable. Selon la littérature, la quantité de cholestérol peut augmenter avec la température, rester la même, ou même diminuer dépendamment de l'organisme, du tissu ou encore du domaine précis de la membrane plasmique (Crockett 1998). En plus d'avoir un effet physique sur les propriétés des membranes cellulaires, il a également un effet direct sur le fonctionnement des protéines membranaires. La réponse du cholestérol face à un changement de température dépend donc également de l'activité directe qu'il exerce sur l'activité des

protéines membranaires. Si dans un type précis de cellule, l'activité des protéines requiert une action directe du cholestérol, tout changement dans la quantité de celui-ci pourrait perturber l'activité fonctionnelle de la cellule. La présence du cholestérol n'est donc pas uniquement requise pour assurer les propriétés physiques des membranes (Crockett 1998).

L'influence du cholestérol sur la rigidité membranaire est plus prononcée dans une membrane riche en phospholipides saturés en comparaison avec une membrane contenant des phospholipides insaturés (Crockett 1998, Kusumi *et al.* 1986). Au début de cette expérience, les organismes étaient acclimatés au froid (1°C) donc leurs membranes cellulaires étaient normalement très riches en phospholipides insaturés. Ainsi, une variation de quantité de cholestérol dans les membranes des cœlomocytes devrait donc avoir moins d'impact avec des organismes acclimatés à 1°C comme ceux de cette expérience.

Tableau 3.5 Quantité de cholestérol des cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* pendant l'expérience sur l'acclimatation entre 1°C et 10°C mesurée par chromatographie gazeuse. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm ET) et n=3 exprimés μg / million de cellules. Une moyenne des deux groupes de ti est présentée, car il n'y avait aucune différence significative (Test de T).

(μg / million de cells)	T (°C)	<i>Leptasterias polaris</i>	<i>Strongylocentrotus dræbachiensis</i>
ti	1	7.21 \pm 3.39	6.43 \pm 2.58
t0	1	4.65 \pm 1.13	1.91 \pm 0.18
	10	1.58 \pm 0.15	3.15 \pm 1.32
t2	1	2.25 \pm 1.03	1.75 \pm 0.26
	10	1.12 \pm 0.22	1.41 \pm 0.14
t5	1	1.49 \pm 0.31	1.28 \pm 0.29
	10	0.91 \pm 0.21	1.09 \pm 0.93
t7	1	1.2 \pm 0.21	1.7 \pm 0.29
	10	0.95 \pm 0.04	1.38 \pm 0.24

Pour finir, rappelons que l'acclimatation s'est fait dans l'intervalle de 1° à 10°C dans la présente étude. D'autres études, où le remodelage des lipides était plus marqué, passaient d'une température de 24°C à 0°C (Pernet *et al.* 2006), ce qui est un changement de température beaucoup plus important. Davantage de données sur les variations du cholestérol seraient cependant nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension des changements dans les membranes des cœlomocytes selon la température ainsi que son rôle fonctionnel sur la cellule. La durée de seulement sept semaines a peut-être limité l'apparition de ce mécanisme de régulation. Nous avons observé du remodelage des acides gras membranaires à la toute fin de l'expérience seulement.

3.4.9. Conclusion

En conclusion, *L. polaris* et *S. dræbachiensis* ont un profil de lipides très particulier dans les cœlomocytes, caractérisé par une forte présence du 20:5n-3, du 20:2 NMI et du 20:1n-11. Grâce à l'expérience sur l'acclimatation, nous démontrons la capacité de réorganiser leurs phospholipides membranaires chez ces deux espèces en diminuant le degré d'insaturation des membranes, particulièrement le 20:5n-3 lors d'une augmentation de la température. Ainsi, *L. polaris* et *S. dræbachiensis* sont capables d'adaptation homéovisqueuse sans grande différence entre elles. Également, chez ces deux espèces, le cholestérol ne semble pas ou peu participer au remaniement des lipides. Le rôle fonctionnel de celui-ci n'est cependant pas connu pour les cœlomocytes de ces espèces et cela pourrait expliquer son manque de participation au phénomène.

Cette expérience d'acclimatation d'un milieu hivernal (1°C) vers un milieu estival (10°C) n'a pas permis de constater une reprise de la viabilité cellulaire des cœlomocytes telle que normalement observée en été. Le fait que les organismes aient été à jeun pourrait également avoir participé au maintien d'un métabolisme très bas. La température n'est assurément pas le seul facteur faisant sortir les échinodermes à l'étude de leur

ralentissement métabolique hivernal, d'autant plus que la disponibilité de la nourriture était déficiente.

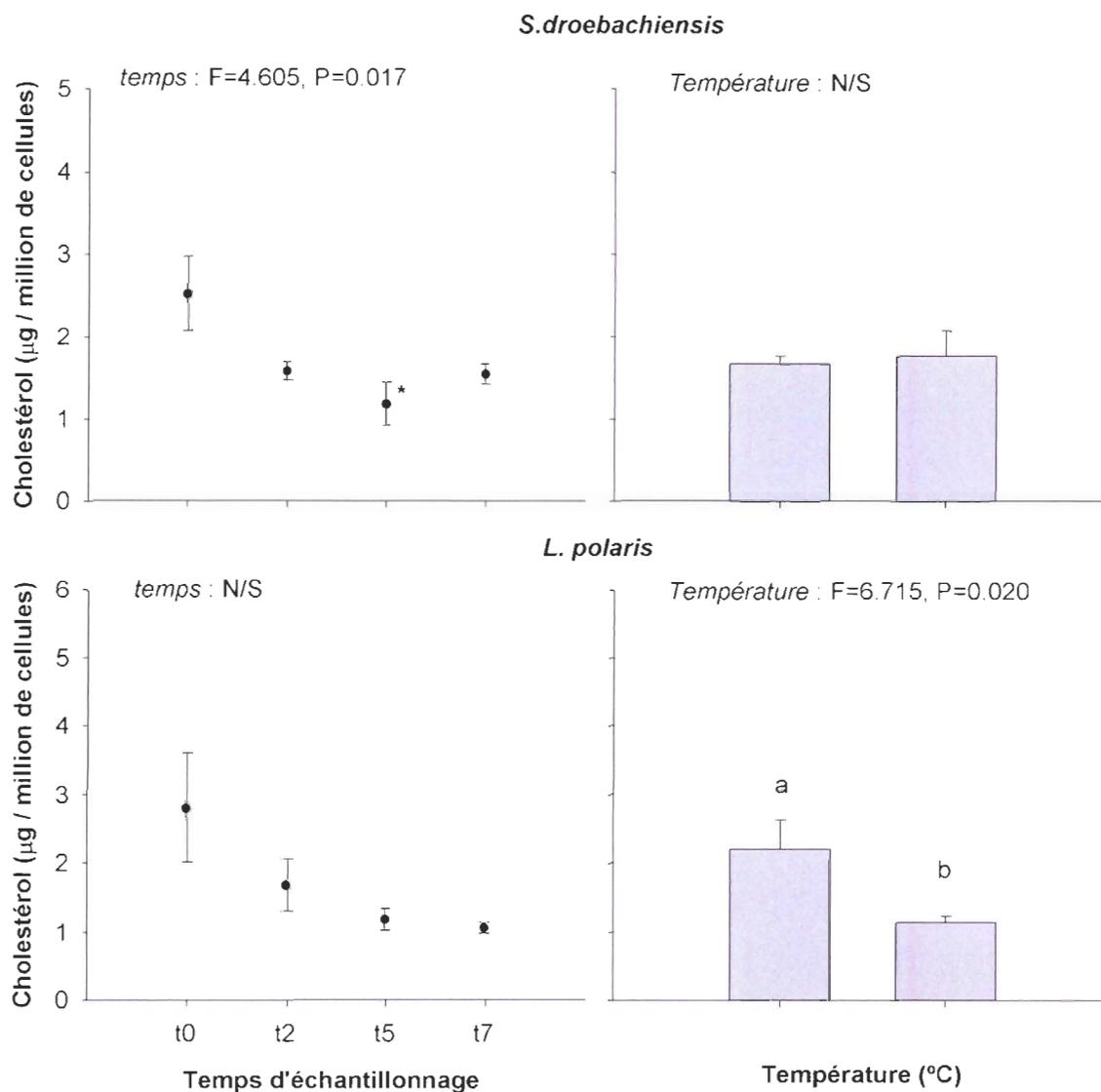


Figure 3.6 Quantité de cholestérol dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* et ceux de *L. polaris* (moyenne \pm ET). ANOVA temps x Température : temps *S. dræbachiensis* $F: 4.605$, $P=0.017$ Température *L. polaris* $F: 6.715$, $P=0.020$). * représente une différence significative par rapport au t0. Les lettres différentes représentent une différence significative.

CHAPITRE 4

**EFFET COMBINÉ DU PHÉNANTHRÈNE ET DES BUTYLÉTAINS ET
RÔLE DE LA RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES DANS LA TOXICITÉ
OBSERVÉE SUR LES CŒLOMOCYTES DE *LEPTASTERIAS POLARIS***

**COMBINED EFFECTS OF PHENANTHRENE AND BUTYLTINS AND THE
ROLE OF MULTIXENOBOTIC RESISTANCE ON THEIR TOXICITY IN
LEPTASTERIAS POLARIS CŒLOMOCYTES**

Émilie Doussantousse, Émilien Pelletier et Lucie Beaulieu

**Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology and
Pharmacology
(soumis août 2011)**

Une version abrégée de cet article a été présentée au congrès annuel de la *Society of Environmental Toxicology and Chemistry* à la Nouvelle-Orléans (Louisiane, É.-U.) en automne 2009.

4.1 RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude était d'évaluer la toxicité du phénanthrène (Phe), seul et en combinaison avec un composé butylétain et d'évaluer le rôle de la résistance aux xénobiotiques (MXR) sur la toxicité observée dans les cœlomocytes de l'étoile de mer *Leptasterias polaris*. La toxicité sur la viabilité cellulaire a été séparément mesurée pour le Phe, le tributylétain (TBT) et le dibutylétain (DBT). Aussi, le potentiel d'interaction de chaque contaminant avec les transporteurs MXR a été évalué. Le Phe n'est pas toxique pour les cœlomocytes de *L. polaris*. Au contraire, le TBT est fortement toxique sur ces cellules alors que le DBT l'est un peu moins. De plus, le Phe a clairement interagit avec les transporteurs MXR en bloquant le transport de la calcéine-AM mais pas celui de la Rhodamine B. L'effet combiné d'un mélange de Phe et de TBT (ou DBT) a ensuite été évalué sur la viabilité des cœlomocytes ainsi que le rôle possible des transporteurs MXR dans la toxicité observée. Une interaction entre le Phe et le TBT dans la toxicité observée a été soulevée. Nous proposons une action indirecte du TBT sur le transport des molécules par les transporteurs MXR. En effet, le TBT n'a eu aucun effet sur le transport de substrat fluorescent. Il ne semble donc n'être ni substrat ni inhibiteur de transporteur MXR.

Mots clés: cœlomocytes, dibutylétain, écotoxicologie, *Leptasterias polaris*, mélanges, Résistance aux Xénobiotiques (MXR), phénanthrène, tributylétain

4.2 ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the toxicity of phenanthrene (Phe), alone and in combination with two butyltin compounds, and investigate the role of multixenobiotic resistance (MXR) in their interaction and toxicity, using the cœlomocytes of sea star *Leptasterias polaris*. Toxicity of Phe, tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) was first assessed separately on cell viability and the potential of these toxicants to react with MXR-like proteins was investigated. Phe exposure alone had no effect on *L. polaris* cœlomocytes viability. In contrast, TBT exerted a strong toxicity whereas DBT cytotoxicity was lower. Nonetheless, Phe had a clear involvement on MXR-like protein activities as known by blocking the calcein-AM transport. The combined effects of Phe and TBT or DBT on cell viability were determined and the possible role of MXR proteins using MXR inhibitors was evaluated. An interaction between Phe and TBT occurred in *L. polaris* cœlomocytes, and an indirect action of TBT on the MXR transport is proposed.

Key words: cœlomocytes, dibutyltin, ecotoxicology, *Leptasterias polaris*, mixtures, Multixenobiotics Resistance (MXR), phenanthrene, tributyltin

4.3 INTRODUCTION

Echinoderms are members of a unique animal phylum of marine invertebrates widespread in most marine environments where their representatives are potentially exposed to toxicants from human sources especially for predators, such as sea stars, living in coastal areas (Bellas *et al.* 2008). Among these toxicants, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Butyltins (Bts) are two important different classes of contaminants widely distributed in coastal waters and sediments. Organotin compounds come mainly from industrial chemical synthesis and only some methyltins are known to be from natural sources (Guard *et al.* 1981). In natural environments, dibutyltin (DBT) comes from the TBT degradation, but is also prepared by synthesis and used as a light and heat stabilizer for PVC materials (Maguire 1997). In spite of restrictions on use of TBT in the 2000s and its ban in 2008 in the signatories' countries, Bts are still a widespread family of contaminants in the aquatic environment, from sediment (Rodriguez *et al.* 2010) to benthic organisms (Frouin *et al.* 2010, Titley-O'Neal *et al.* 2011).

With natural or anthropogenic origins, PAHs are widespread in all types of environment (Canadian Council of Ministers of the Environment 2010). Among these, phenanthrene (Phe) is a relatively water soluble aromatic compound (Nagpal 1993) and was found at elevated concentrations in water near petroleum exploration sites (Anyakora *et al.* 2005).

Once in the environment, contaminants can interact with natural factors that could significantly modify the responses of organisms to toxicants (Laskowski *et al.* 2010). The physical and biochemical fates of compounds are also known to change in the presence of other chemicals, which can result in a significantly different observed toxicity than predicted by a simple addition of individual effects (Savard *et al.* 2007). As an example, an antagonistic interaction of TBT on benzo-[a]-pyrene toxicity was demonstrated on the

development of oxidative stress in spleen of marbled rockfish (Wu *et al.* 2007) and on liver, kidney and pseudobranch lesions in arctic char (Oliveira Ribeiro *et al.* 2007) under controlled laboratory conditions.

Once in the organism, toxicants can interact with multixenobiotic resistance (MXR) proteins as they are the first line of self-defence mechanism (Ambudkar *et al.* 1999). The proteins responsible for the MXR activity extrude a wide spectrum of modified and unmodified toxicants out of the cells resulting in a lower intracellular concentration of xenobiotics and thus a lower toxic potential (Smital *et al.* 2004). Several proteins are involved in xenobiotic resistance, but the most studied ones in an environmental context are the P-glycoprotein (Pgp) and proteins from the Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs) family. Quite often, the modulation of cellular efflux activity may also lead to a higher concentration of compounds within cells and therefore to more sensitive responses of these cells (Caminada *et al.* 2008). Such compounds, which can interfere with the protection by the MXR mechanism, may have high ecotoxicological impacts because their toxic effects on the organism could be unexpected and unexplained considering that the involved xenobiotic is below its toxic level (Smital *et al.* 2004). PAHs have been suspected to be substrates of MXR proteins (Waldmann *et al.* 1995) but little is known about a possible action mechanism. As for Bts, a possible role of MXR proteins in the cellular export of TBT has been reported (Kingtong *et al.* 2007).

MXR activity was recently reported in coelomocytes of *Leptasterias polaris* and two other echinoderms (Doussantousse *et al.* 2011). Coelomocytes are the immune cells of echinoderms and represent the unique immune system of the organism. They are easily accessible from living organisms and can give a quick identification of the effect of a contamination. *L. polaris* is a particular species because of its apparent high tolerance to toxicants. *L. polaris* showed indeed the ability to bioaccumulate TBT either from water and food (Mercier *et al.* 1994, Rouleau *et al.* 1995), but this species possesses adequate mechanisms to deplete ingested TBT without inferring major disturbances of its immune

and reproduction systems (Békri et Pelletier 2004). When exposition occurred *in vitro*, the viability and phagocytic activity of cœlomocytes were not affected by TBT (Doussantousse, 2005, Master's thesis, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Qc, Canada) or by Phe and retene exposure (Le Breton, 2002, Master thesis, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Qc, Canada). Echinoderms play a key role in the maintenance of the integrity of ecosystems where they live (Hereu *et al.* 2005) and *L. polaris* and other sea stars with the same preying mode could play a role of “recycling organisms” in coastal environments (Békri et Pelletier 2004).

The objectives of this study were to evaluate the toxicity of phenanthrene alone and in combination with butyltin compounds, and investigate the role of MXR on individual and joint toxicity using cœlomocytes of the sea star *L. polaris*. Toxicity of Phe and Bts (TBT, DBT) was first assessed separately on cell viability, and the potential of these toxicants to react with MXR-like proteins was then investigated. We hypothesized that Phe and TBT together would modify the MXR cell transport. The combined effects of Phe and Bts were determined on cell viability and we evaluated the possible role of MXR proteins using MXR inhibitors (Cyclosporine A and MK571).

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1. Animals and sampling of cœlomocytes

Specimens (central disk: 4 cm) of *L. polaris* were sampled in the St. Lawrence Estuary by SCUBA diving and held in flow-through tanks from June to mid-October 2008 and 2009 at the ISMER marine laboratory (Rimouski, Qc, Canada). Water temperature varied from 0°C to 12°C following seasonal conditions, and salinity was nearly constant at 31. Animals were fed *ad libitum* twice a week with blue mussels, *Mytilus sp.*

Cœlomic fluid containing cœlomocytes was withdrawn (2.5 mL) into a 5-mL syringe (caliber 23) half pre-loaded with ice-cold calcium- and magnesium-free artificial sea water containing 50 mM EDTA as an anticoagulant mixture (Békri et Pelletier 2004). The cœlomic fluid samples from six to nine sea stars (without sex distinction) were pooled to average inter-individual variability and obtain enough cells for each experiment. All experiments were repeated three or four times with three different pools. Samples were always obtained in the morning to minimize daily physiological variation and cœlomic fluid was filtered through a 40 µm cell nylon strainer (VWR Canlab, Qc, Canada) to remove debris or agglomerated cells. Cœlomocytes counts were carried out using a Neubauer haemocytometer (Bright-Line) with light microscopy under 20X magnification.

4.4.2. Chemicals

Cyclosporine (CsA), MK 571, Rhodamine B (RB), tetrazolium 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide salt (MTT) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (ON, Canada). Calcein-AM (CAM) was obtained from VWR Canlab (QC, Canada) and Mk came from Cayman Chemicals (MI, USA). Mk, CAM and CsA stock solutions were prepared in DMSO. Final DMSO concentrations never exceeded 0.01% to avoid any side effect from the solvent. Sea water from the marine laboratory was filtered (0.2 µm) to obtain filtered sea water (FSW) and cooled at 4°C for a maximum of five days. RB and MTT solutions were prepared in FSW. TBT, DBT and Phe were purchased from Sigma-Aldrich (USA). High concentration stock solutions were first prepared in 100% ethanol and then diluted in seawater to reach exposure concentrations. Final ethanol concentrations never exceeded 0.1%.

4.4.3. Cytotoxicity test

Cytotoxicity of reagents was tested with the microculture tetrazolium (MTT) assay which is a first choice for assessing the viability of adherent cells (Lindl *et al.* 2005) like cœlomocytes. The yellow tetrazolium MTT is reduced by metabolically active cells, in part by the action of dehydrogenase enzymes, to generate the reducing equivalents of purple formazan. The method was adapted for cœlomocytes according to the protocol developed for blue mussel hemocytes (Marin *et al.* 2004).

Cells (600 000) were deposited in a 96-well microplate (12 wells per treatment) for one hour at 10°C in the dark. Free cells were washed out and only adhered cells were exposed for 3 h to contaminants in FSW. Dose-dependent TBT, DBT and Phe concentrations were applied. Wells were then washed out with FSW and filled with MTT solution prepared in FSW (final concentration 0.5 mg/mL) for 2 h at 10°C. MTT solution was then washed out with FSW and DMSO was added to the wells to dissolve formazan crystals (Twentyman et Luscombe 1987). Absorbance was recorded with Tecan® Spectrafluor Plus microplate spectrometer. The subtraction of absorbance measure at 700 nm to that measured at 535 nm was used as a measure of cell viability to avoid errors due to medium quenching (Supino 1995). Each experiment was repeated between three and six times.

4.4.4. Interaction with MXR-like proteins activities

MXR assay with flow cytometry

The determination of MXR activity is based on the use of well-documented MXR inhibitors and substrates and their choice was made according to the literature (Essodaïgui *et al.* 1998, Haimeur *et al.* 2004). RB and CAM were used as model substrates in individual combination with inhibitors. Mk and CsA were used as model inhibitors with *L. polaris* cœlomocytes (Doussantousse *et al.* 2011). Non observable effect levels of TBT, DBT and

Phe were used to test contaminant MXR activity potential. These concentrations were determined before by the cytotoxicity test (MTT assay). Cells were exposed for 2 h to substrates with or without inhibitors (total 3 mL) in the darkness and in FSW before individual cell fluorescence measurement by flow cytometry (FCM). Treatments were done in triplicate and each experiment was repeated three times (n=3). A volume of 1.9 μ m Fluoresbrite beads (Polysciences, Pennsylvania, USA) was added to each tube as an internal standard. Cells were analyzed with an Epics Altra® flow cytometer (Beckman Coulter, Ont, Canada) fitted with a 488 nm laser operated at 15 mW. The fluorescence of MXR substrates was measured at 525 ± 20 nm for CAM and 575 ± 20 nm for RB. The data were analyzed using Expo32 v1.2b software (Beckman Coulter, Ont, Canada). Forward scatter (FS) versus side scatter (SS) plots was used to identify typical healthy cells. The average fluorescence of these cells was measured and expressed relative to the fluorescence of the Fluoresbrite beads. The measured cell fluorescence was corrected by subtracting the natural auto-fluorescence of cells measured without CAM or RB addition; this auto-fluorescence represented between 0.05% (CAM experiment) and 10% (RB experiment) of the stained cells fluorescence.

Phe, TBT and DBT cytotoxicity combined with MXR inhibitors, CsA and Mk

Cœlomocytes were exposed to TBT, DBT and Phe concentrations with or without the presence of MXR inhibitors, CsA (5 μ M) and Mk (5 μ M). In order to compare the toxicity with and without inhibitors, microplates were divided in two sections. Cells in the first half were exposed to the toxic compound alone, and cells in the second half were exposed to the toxic combined with the MXR inhibitor following the protocol described above.

Phenanthrene cytotoxicity combined with TBT or DBT

Cœlomocytes were exposed to a mixture of two toxicants. In the first half of the microplate, cells were exposed to one contaminant in dose-dependent concentration whereas cells in the second half were exposed to the mixture, one with the dose-dependent concentration and the other one with a single concentration. The single concentrations used were 0.05 μM for TBT, 0.1 μM for DBT and 5 μM for Phe following the protocol described above.

4.4.5. Statistical analysis

Data analysis and graphs were performed using SYSTAT 12 and SIGMAPLOT 10 (Systat Software Inc, CA, USA). For the evaluation of the cytotoxicity assay, the data were normalised to the zero toxic concentration. Wherever applicable, a regression curve among the probit model was applied to describe data. The curve was fitted by the log-normal distribution of concentrations. For the dual exposure, the statistical difference between the zero concentration, and the zero concentration with the fixed toxic concentration was achieved by a T-test. For the MXR assay, data were analyzed by one-way ANOVA. The homogeneity of variances was tested using one-way ANOVA on the absolute value of residuals. Normality of residuals was tested using the Lilliefors test. If the conditions were not met, the analysis of variance was performed according to the Conover non-parametrical approach (Conover 1980) where analysis of variance was done on ranked data (NP). To indicate a significant difference, the probability (P) must be less than 0.05. The post-hoc test was the test of HSD-Tukey.

4.5 RESULTS & DISCUSSION

4.5.1. Individual toxicants and their involvement with MXR-like proteins

Cytotoxicity

TBT and DBT toxicity results were both obtained at the end of the summers 2008 and 2009. Data on Phe were only available in 2009 (Fig. 4.1). Cœlomocytes sampled in 2008 appeared slightly more tolerant to TBT than those obtained a year later from the same group of sea stars. Indeed, calculated EC50 values for TBT exposition for both years (Fig. 4.1a and 4.1b) indicated a higher value in 2008 ($EC_{50_{2008}} = 0.272 \mu\text{M}$; $R^2=0.6375$, $P<0.001$) than 2009 ($EC_{50_{2009}} = 0.178 \mu\text{M}$; $R^2=0.7333$, $P<0.001$). The cytotoxic concentrations of TBT on *L. polaris* cœlomocytes observed here (EC_{50} obtained in 2008 and in 2009) are comparable with other studies although cœlomocytes seemed to be slightly more tolerant. As an example, a 3h-exposure at $0.1 \mu\text{M}$ TBT on rat thymocytes induced twice more apoptotic cells than control as determined by the presence of phosphatidylserine in cells with flow cytometer (Nakata *et al.* 1999). Although the toxicity is known to be species and cell type dependant, and also to vary with the exposure time and detection method (Fent 2001), comparing TBT cytotoxicity among species can provide some pertinent information. For instance, Carfi and co-autors (Carfi *et al.* 2007) collected TBT cell toxicity data from many studies where different methods were applied for a constant exposure time of 24 h. The IC50s measured with MTT method were $0.046 \mu\text{M}$ on mice lymphocytes, $0.02 \mu\text{M}$ on rat lymphocytes and $>0.1 \mu\text{M}$ on human blood cells. These differences among IC50s illustrate how the toxicity could be different among species and cell types. The *L. polaris* cœlomocytes were considerably more tolerant than the mammal blood cells.

TBT was clearly more toxic than DBT, even if too scattered values prevented a calculation of EC50 for DBT (statistical conditions not met) (Fig. 4.1c and 4.1d). In first approximation, EC50 values of DBT appear to be slightly over $2 \mu\text{M}$ in 2008 and slightly

below 1 μ M in 2009. DBT cytotoxicity was five to ten times lower than TBT on *L. polaris* cœlomocytes, as often observed with other species and cell types (Brüschweiler *et al.* 1995, Hoth *et al.* 2005). DBT was only twice less toxic than TBT with a hepatic fish cell line measured by neutral red incorporation within a 24h- exposure time (Brüschweiler *et al.* 1995) and on human hepatic and kidney cell lines measured by neutral red incorporation and MTT methods with a 48h- exposure time. DBT was meanwhile as toxic as TBT on the eye cell line (Hoth *et al.* 2005). The difference in toxicity between TBT and DBT seems to be higher in the case of cœlomocytes than in other cells, but this difference may be linked to the detection method. As an example, it was observed that DBT had a greater impact than TBT on phagocytic activity, but TBT had a greater impact on hemocytes count in mussels exposed to a very low level of TBT or DBT (St-Jean *et al.* 2002). DBT does not seem to have strong toxic effects on cell viability but may have a greater impact on other cell activities.

In comparison with the results obtained with TBT or DBT, cell viability in the presence of Phe was variable but no dose-dependent toxic effect was observed (Fig. 4.1e). This is in general agreement with literature as *L. polaris* cœlomocytes were not affected by a high exposure to Phe from zero to 6 μ M, its maximum solubility in seawater. As a matter of fact, short term Phe cytotoxicity is generally low and was detected only near its maximum solubility on cells of trout gills after 2h- and 24h- exposure times (Schirmer *et al.* 1998). No Phe toxicity was also observed on the human JEG-3 cell line measured by the CFDA-AM cellular activity and Blue Alamar coloration using concentrations up to 50 μ M, which greatly exceed its solubility in water (Peters *et al.* 2007). In a sublethal *in vivo* experiment conducted over an exposure period of seven days and using the marine bivalve *Pecten maximus* immune cells, (Hannam *et al.* 2010) observed Phe toxicity on phagocytosis, total cells count and cell stability measured by neutral red incorporation at Phe concentrations 10 times lower than those used in acute toxicity tests. Similarly, the inhibition of the luminescence of *Vibrio fischeri* by Phe was slightly increased by a long term exposure (18 h) to compare a short term (15 min) (El-Alawi *et al.* 2002). As only a

short time *in vitro* exposure (3h) was used in our experiment, the possible long term effect of Phe on cœlomocytes cannot be estimated.

Variability in response to toxic compounds was usually high in *L. polaris* cœlomocytes, as already observed by Coteur *et al.* (2005) in a study on cadmium toxicity on *Asterias rubens* cœlomocytes. Many individual factors have been identified as important in response to toxic compounds such as physiological status, sex, nutrition status, genotype, ontogenic stage, *etc.* (Depledge et Fossi 1994). In the present work, cœlomic fluid from six to nine sea stars was pooled to compose one replicate and average individual difference. A factor of variability could have been associated to the fact that the sea stars were kept in flow-through tanks submitted to daily conditions of pumped seawater, such as small changes in salinity, temperature and turbidity. Due to this type of water circulation, variability observed could be representative of what happened in the field.

There were significant differences between years, which could be due to sampled animals: the sea stars kept in flow-through aquarium were not the same between the 2008 and 2009 experiments. Intra-group variability was also large between sampling days for toxic molecules as illustrated by the 0.05 μM TBT concentration, apparently not toxic one day (Fig. 4.4a), and then toxic a few days later (Fig. 4.4b, TBT alone exposure curve). To take in account this daily shift in cell response and as a quality control, we repeated the cellular response of the toxic compound alone for each experiment where two toxic compounds were conducted. Another way to control quality of results was to discard experiments where the MTT basal activity was too low.

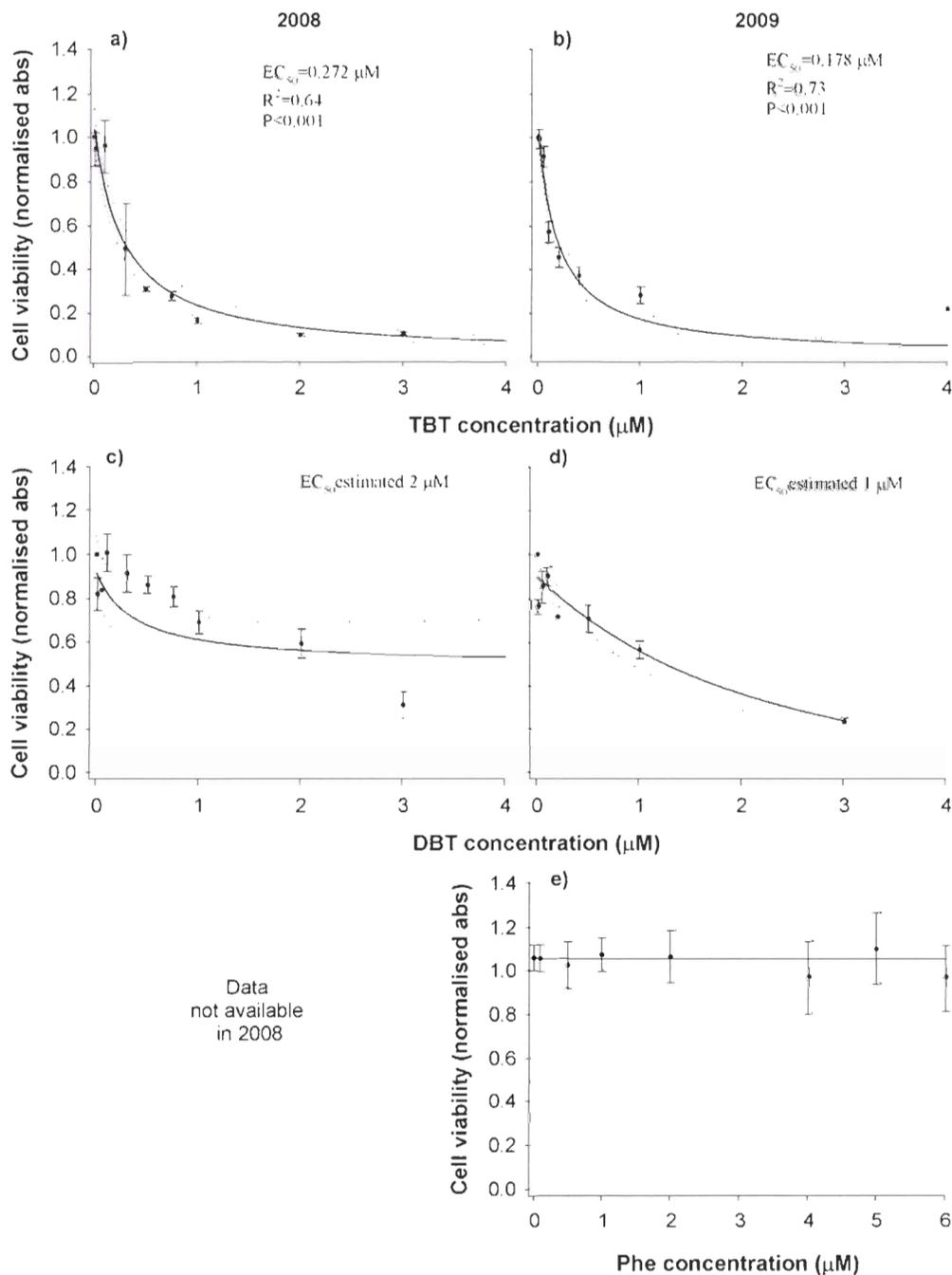


Figure 4.1 Toxicity of TBT (a and b), DBT (c and d) and Phe (e) on *L. polaris* cœlomocytes. The MTT assay was performed after a 3h- exposure at 10°C in the dark. Data are pooled from two different groups of sea stars over two successive years. Black dots represented all the data, regression curves and the 95% confidence interval (n=3) are shown.

Interaction of a toxicant on substrate incorporation

The potential effects of TBT, DBT and Phe on RB and CAM incorporation were presented in Fig. 4.2. We report here the first observation of the involvement of Phe in MXR-like protein activity in echinoderm coelomocytes as a potential inhibitor or substrate. Phe induced an increase of CAM fluorescence (ANOVA $P=0.012$, $R^2=0.694$) at successive concentrations of 2 μM (post-hoc $P=0.057$), 5 μM (post-hoc $P=0.023$) and 10 μM (post-hoc $P=0.026$) (Fig. 4.2f), but no discrimination could be done on the type of MXR-like proteins that could be involved. Indeed, Phe had no effect on RB fluorescence although it has an effect on CAM fluorescence. The only effect observed on CAM incorporation (CsA, Mk or verapamil) was a diminution (Doussantousse et al. 2011). Other MXR-like proteins could meanwhile be involved such as the breast cancer resistant proteins, which have not yet been identified in coelomocytes. Phe could also be itself transported by these MXR-like proteins in coelomocytes since MXR inhibitors are mostly substrates themselves because their inhibition mechanism is more often competitive, such as CsA (Saeki *et al.* 1993), verapamil (Romsicki et Sharom 1999) and Mk (Haimeur *et al.* 2004) inhibitors are. More work is needed to identify the type of MXR-like proteins involved.

About butyltins (TBT or DBT), they did not increase or decrease significantly the fluorescence of RB or CAM (Fig. 4.2), which means that the incorporation of these two substrates into the cells has not been changed in a significant way. A high variability between replicated experiments for each toxicant ($n=3$) may explain this lack of observable effects. These results suggest the absence of a direct involvement of MXR transport of TBT (or DBT) in coelomocytes (Fig. 4.2a and 4.2b). TBT was found to induce a fluorescence increase of Rhodamine 6G in oyster cells but this could have been induced by the TBT cytotoxicity and not by an effect of TBT on MXR transport (Kingtong *et al.* 2007). The lack of an effect of TBT on RB or CAM fluorescence in *L. polaris* coelomocytes supports this interpretation.

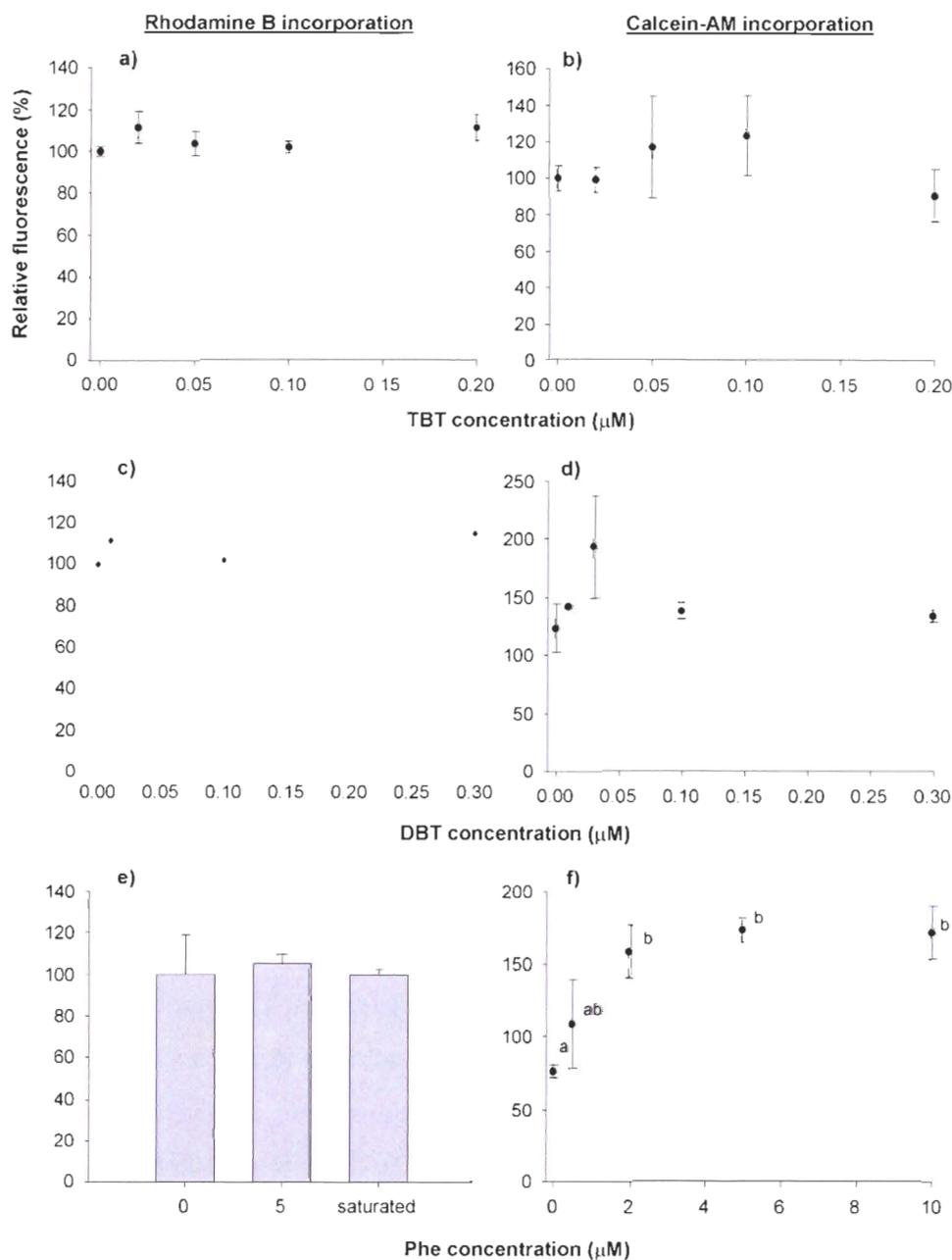


Figure 4.2 Flow cytometry measurements of fluorescent Rhodamine B (RB, left side) and Calcein-AM (CAM, right side) in *L. polaris* cœlomocytes. Cells were incubated with 1 μM RB or 0.5 μM CAM with and without TBT (a and b), DBT (c and d) or Phe (e and f) two hours in the dark at 10°C. Values are means \pm SE (n=3, one-way ANOVA, P<0.001). Different letters mean statistical differences (Tukey post-hoc, P<0.001).

4.5.2. Mixture of toxicants and the potential of the MXR inhibitors to act on Phe/TBT toxicity

The co-exposure of toxicants in combination with MXR inhibitors

Phe, DBT and TBT cytotoxicity was investigated in combination with MXR inhibitors (Mk or CsA) (Fig. 4.3). There were no statistical differences between the starting conditions (toxicant at a zero concentration with or without the 5 μ M inhibitor concentration) for each combination. In most cases, the toxicity of Phe (Fig. 4.3a and 4.3b), DBT (Fig. 4.3c and 4.3d) and TBT (Fig. 4.3e) was not significantly modified by the presence of MXR inhibitors. Only one co-exposure experiment demonstrated a statistical difference (Fig. 4.3f) where TBT combined with CsA induced a decrease of cell viability (ANOVA $P < 0.001$, $R^2 = 0.863$) at TBT concentrations of 0.01 μ M (post-hoc $P = 0.022$), 0.05 μ M (post-hoc $P = 0.038$), 0.4 μ M (post-hoc $P = 0.001$) and 1 μ M (post-hoc $P < 0.001$). That could reveal the presence of an interaction of TBT on MXR transport. An interaction between CsA and TBT was already noticed on mice skin irritation (Corsini *et al.* 2001) and could be an indication of the involvement of TBT in MXR transport as CsA is known as a classic inhibitor used in MXR studies (Haimeur *et al.* 2004). Otherwise, Schröder *et al.* (1998) demonstrated that a natural MXR inhibitor (an extract of *Caulerpa taxifolia*) increased TBT cytotoxicity on the sponge, *Geodia cydonium*. The authors also described an effect of this extract of *C. taxifolia* on the RB accumulation in *Dreissena polymorpha* gills. Thus, an interaction between TBT and MXR-like transporter is plausible but an effect on the substrate incorporation was not observed (3.2.2). TBT is well-known as a membrane toxicant (Sodergren *et al.* 2006), undermining membrane integrity and disrupting calcium homeostasis (Cima *et al.* 1998). TBT is also known to induce a membrane depolarization in the Pgp environment, which in turn leads to the accumulation of Rhodamine 123 in intestinal cells and may have an indirect effect on MXR-like transport (Tsukazaki *et al.* 2004). When inducing this membrane perturbation, TBT could induce CsA accumulation and more toxicity as an indirect effect on a MXR-like transporter. In a previous work, we

observed a toxic effect of CsA on *L. polaris* cœlomocytes at a concentration higher than 5 μ M (Doussantousse *et al.* 2011).

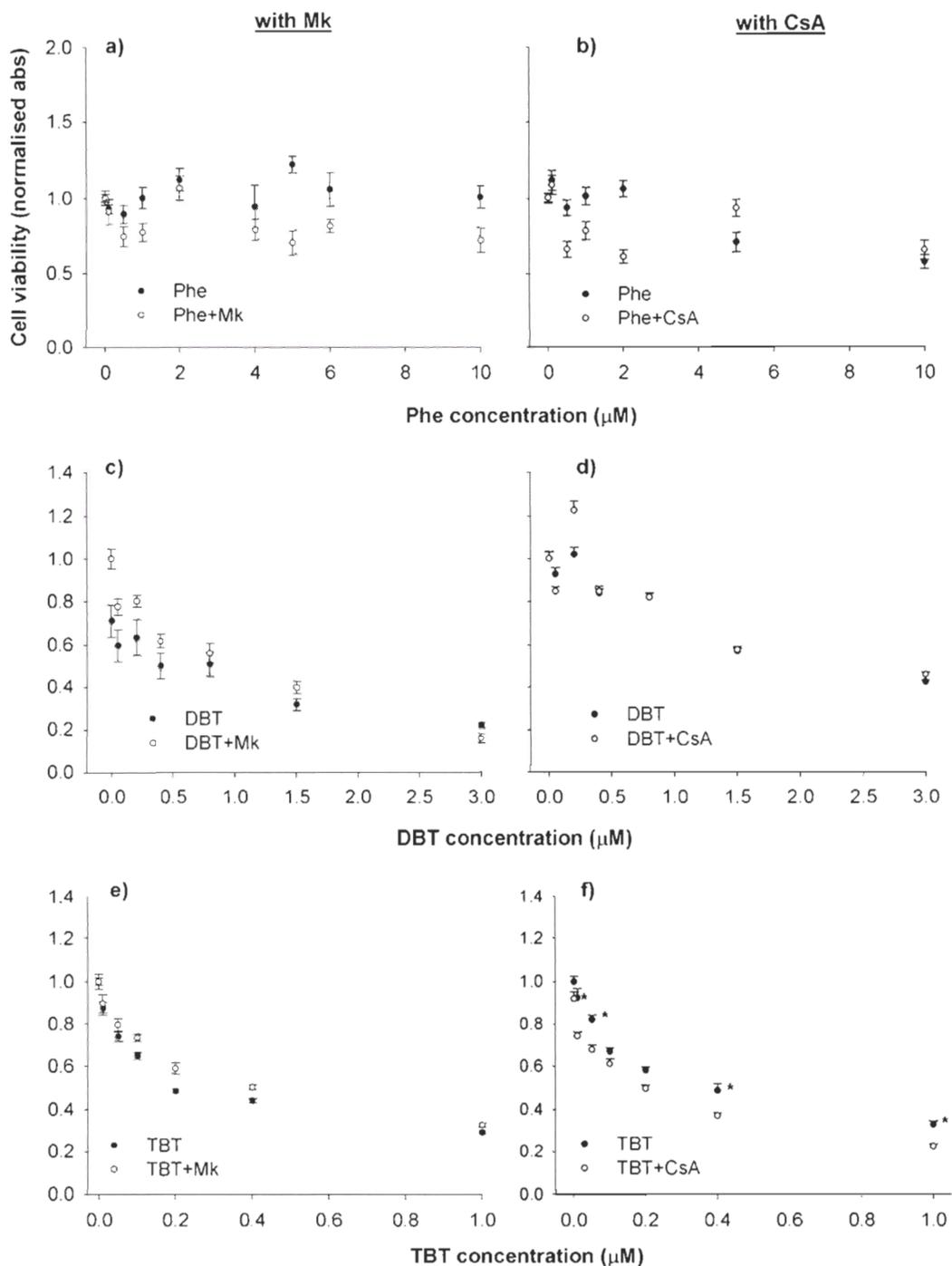


Figure 4.3 Co-exposure experiments using *L. polaris* cœlomocytes with Phe (a and b), DBT (c and d) and TBT (e and f) and MXR inhibitors, 5 µM Mk (left side) and 5 µM CsA (right side). The MTT-assay was performed as previously indicated. All values are means ± SE (n=3, * P < 0.05 when compared to the control; one-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments).

The co-exposure of Phe with TBT or DBT

As Phe was found not to be toxic and an impact of Phe on MXR-like proteins was observed, the idea of adding a toxicant such as TBT and DBT in variable or static concentrations to observe resulting cytotoxicity and effects on MXR inhibitors was explored. Phe toxicity was tested in a dose-dependent manner and at a fixed concentration (5 μM) combined with a fixed or a dose-dependent concentration of toxicants, TBT (0.05 μM) or DBT (0.1 μM) (Fig. 4.4). There were no statistical differences between the starting conditions for the two curves (curve 1: toxicant 1 at a zero concentration; curve 2: toxicant 1 at zero and toxicant 2 at a fixed concentration).

We observed a significant interaction between Phe and TBT on the cell viability of cœlomocytes. The Phe dose-dependent exposure with the fixed TBT concentration was more toxic than the Phe dose-dependent exposure alone on cœlomocytes (Fig. 4.4a). (NP ANOVA $P=0.001$, $R^2=0.606$, for all concentrations post-hoc $P<0.001$). This effect was less evident in the case of a TBT dose-dependent exposure added to the fixed Phe compared to the TBT dose-dependent exposure alone (Fig. 4.4b). Only three TBT concentrations induced a significant decrease of cell viability (NP ANOVA $P<0.001$, $R^2=0.837$): 0.01 μM TBT (post-hoc $P=0.035$), 0.05 μM TBT (post-hoc $P=0.006$) and 0.5 μM TBT (post-hoc $P=0.002$). In a dose-dependent concentration, TBT was probably so toxic by itself in comparison to Phe that adding Phe did not add any detectable effect. Although Phe showed a clear role in the MXR transport, Phe should not interfere with the TBT export leading to an accumulation of toxic compound and a higher observable cellular effect. If TBT were transported by a MXR-like mechanism, an interaction of TBT on RB and CAM fluorescence accumulation should have been observed, which was not the case.

Such a clear difference was not observed with DBT (Fig. 4.4c) where the toxicity of the dose-dependent Phe seems to have been significantly enhanced by DBT only for one concentration (2 μM). And the increasing cytotoxicity of DBT in presence of Phe (5 μM) was not significantly different (Fig. 4.4d).

The lack of detectable toxicity in the interaction study between Phe and DBT does not allow a comparison with previous studies. DBT is often considered as being less cytotoxic than TBT. However, it seemed to have a higher impact on a bivalve immune system than TBT (St-Jean *et al.* 2002). The hypothesis was that DBT had a greater potential to disrupt calcium homeostasis, which is very important for immune activities. DBT transport was once shown to be MRPs-like dependent across intestinal cells (Azenha *et al.* 2004), but no MXR interaction is confirmed in the present work with echinoderm cells.

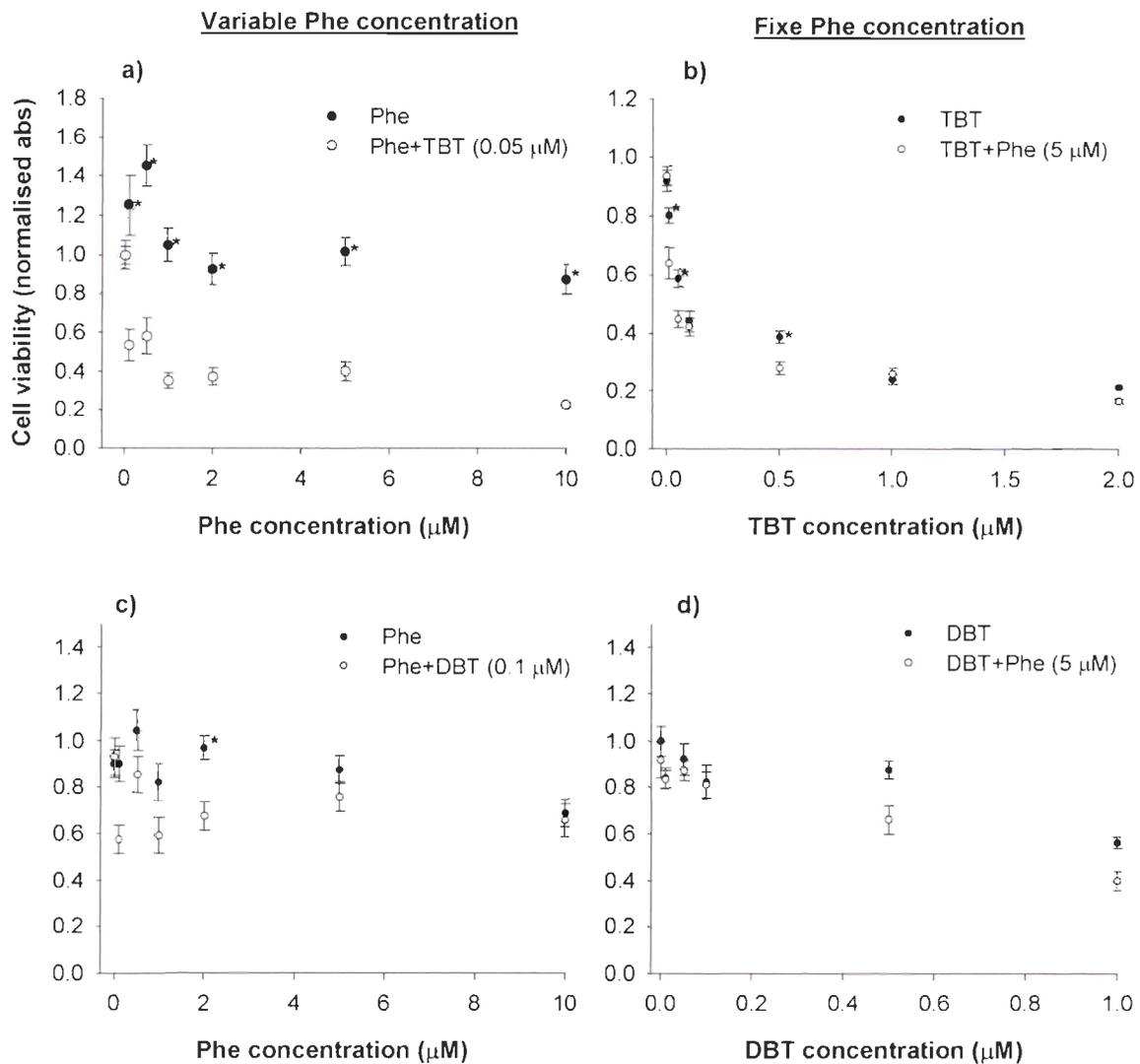


Figure 4.4 Co-exposure experiments performed in *L. polaris* cœlomocytes with a variable Phe concentration added to 0.05 μM TBT (a) and 0.1 μM DBT (c), and to a fixed Phe concentration (5 μM) added to a variable TBT concentration (b) and a variable DBT concentration (d). The MTT-assay was performed as previous indicated. All values are means \pm SE (n=3, * P < 0.05 when compared to the control; one-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments).

4.6 CONCLUSION

Phe *in vitro* exposure had no effect on *L. polaris* cœlomocytes viability. In contrast, TBT exerted a strong acute toxicity on these cells, but cœlomocytes appeared slightly more tolerant than some other cells reported in the literature. An interaction between Phe and TBT in *L. polaris* cœlomocytes is described, and that could involve a MXR transport mechanism. Phe was clearly involved in MXR-like protein activities in echinoderm cœlomocytes by blocking the CAM transport, a feature reported for the first time. The effect of TBT on MXR-proteins is believed to be indirect, by acting on the integrity of the transporters as suggested by the literature, and as no effect of TBT on substrates incorporation was observed in cœlomocytes.

Cœlomocytes cells are complex multifunctional cells with a low evolutionary status, but with a high potential as model free-circulating cells to study basic mechanisms of MXR-like protein activity in aquatic toxicology. The numerous roles of cœlomocytes do probably induce changes in physiological status and change at molecular and cellular levels, contributing to the high observed variability. Studying mixtures of contaminants is among the main challenges in ecotoxicology and case-by-case investigations to identify possible effects are needed (Eggen *et al.* 2004). Toxicant interactions on cœlomocytes physiology are complex and require more attention for a better understanding mechanisms involved.

Acknowledgments

This research was support by an operating grant (É.P.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, a student grant (É.D.) from the Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER-UQAR) and Quebec-Ocean and by grants from both the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (Qc, Canada) and La

Fondation Communautaire Gaspésie-Les-Iles (Qc, Canada). The authors thank Ms. Maude Lecourtois, Ms. Dominique Lavallée, Dr Richard Saint-Louis and Dr Claude Belzile from ISMER-UQAR for their assistance in the course of this project.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Ce projet de doctorat a permis de progresser dans la compréhension de la physiologie des cœlomocytes d'échinodermes. Ainsi, nous avons pu établir la présence d'un mécanisme de protection cellulaire (MXR) dans les cœlomocytes de *L. polaris*, de *S. dræbachiensis* et de *C. frondosa* (Chapitre 2). Nous n'avons toutefois pas pu identifier les protéines responsables de ce mécanisme comme prévu initialement. Les résultats nous indiquent qu'il y a très probablement un transporteur de la famille des protéines associées à la résistance multiple (MRPs) et qu'au moins une deuxième protéine MXR est présente, peut être une P-glycoprotéine (Pgp). Nous avons utilisé deux méthodes de mesure. La première méthode en cytométrie en flux a donné d'excellents résultats et nous a amené à poser l'hypothèse qu'une protéine de type MRPs était probablement présente dans la membrane d'un organe cellulaire. La deuxième méthode d'identification était une mesure directe et devait nous indiquer plus précisément la nature de la ou des protéines MXR impliquées. Les résultats ont été moins significatifs probablement par manque de spécificité des anticorps (pour l'analyse de transfert de type Western) et le manque de purification des échantillons (pour l'analyse en spectrométrie de masse). Cela nous a cependant permis de confirmer la présence d'activité MXR et de trouver une protéine MVP (*Major Vault Protein*) dans les cœlomocytes de l'oursin vert, *S. dræbachiensis*. Un résumé détaillé du chapitre 2 se trouve en 5.1.

Une fois réalisée la démonstration de la présence d'activité MXR, nous avons abordé les stress environnementaux : soit la température (chapitre 3) et le stress toxique (chapitre 4). Le rôle et le fonctionnement des transporteurs MXR ont été abordés dans le chapitre 4 mais pas dans le chapitre 3.

Dans le chapitre 3, nous avons pu particulièrement établir que les cœlomocytes de *Strongylocentrotus dræbachiensis* et *Leptasterias polaris* répondaient au stress de la

température en remodelant leurs lipides membranaires tel que décrit par le modèle de l'adaptation homéovisqueuse (HVA). Précisément, nous démontrons que ces deux espèces ont la capacité de réorganiser leurs phospholipides membranaires en diminuant le degré d'insaturation des membranes, particulièrement l'acide gras 20:5n-3 lors d'une augmentation de la température. Parallèlement, nous confirmons un profil d'acides gras (AG) bien particulier, typique des échinodermes avec la présence des AG 20:4n-6, 20:1n-11 et 20:2 NMI. La présence de l'AG 20:4n-6 peut s'expliquer par son effet sur le système immunitaire (Borda *et al.* 1998, Davidson *et al.* 1998, Delaporte *et al.* 2006). Par contre, la présence des deux autres AG est plus difficile à expliquer. Le 20:2 NMI est-il là en remplacement des AG polyinsaturés qui font défauts (Klingensmith 1982, Pirini *et al.* 2007) ou a-t-il un rôle structural ou fonctionnel bien précis ? L'AG 20:1n-11 est également une vraie énigme car il n'est décrit chez aucune autre espèce dans les quantités que les cœlomocytes exhibent. Existe-t-il un précurseur d'un AG essentiel pour les échinodermes ? Il est vrai que les voies de synthèse sont peu connues chez les échinodermes. Par contre, l'augmentation de la température ne semble pas avoir d'incidence sur la sortie de la période de ralenti métabolique observée l'hiver et mesurée sur les cœlomocytes par la méthode du sel de tétrazolium (MTT). L'absence de nourriture pendant toute l'expérience pourrait avoir joué un rôle plus important que prévu. Il est en effet souvent mentionné que la disponibilité de nourriture est très importante dans les cycles saisonniers des invertébrés (Berg et Bremset 1998, Mercier et Hamel 2009). Un résumé détaillé du chapitre 3 se trouve en 5.2.

Au cours du troisième volet (chapitre 4), en travaillant avec un stress toxique induit par un ou une combinaison de deux contaminants, nous avons pu établir que les cœlomocytes de *L. polaris* étaient moins sensibles au tributylétain (TBT) que des cellules analogues d'autres espèces d'invertébrés ou de vertébrés et n'étaient pas sensibles, ni au phénanthrène (Phe) ni au dibutylétain (DBT). De plus, le TBT, en concentration non-toxique, semble avoir pour effet d'augmenter la toxicité du Phe sur les cœlomocytes de *L. polaris*. D'une part, le Phe serait probablement directement impliqué dans le mécanisme de transport MXR car il a engendré une augmentation de l'incorporation de la CAM dans les cœlomocytes. D'autre part, le TBT aurait plutôt un effet indirect sur le mécanisme MXR

puisque'il n a pas d'effet détectable sur l'incorporation d'aucun substrat mais plutôt un effet toxique supplémentaire lorsqu'il est combiné à la CsA. Un résumé détaillé du chapitre 4 se trouve en 5.3.

5.1 RÉSUMÉ DU CHAPITRE 2

LA RÉSISTANCE CELLULAIRE AUX XÉNOBIOTIQUES DANS LES CŒLOMOCYTES DE TROIS ESPÈCES D'ÉCHINODERMES

L'objectif de ce deuxième chapitre était de mettre en évidence l'activité de protéines de résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR) dans les cœlomocytes de l'oursin vert *Strongylocentrotus dræbachiensis*, de l'étoile de mer polaire *Leptasterias polaris* et du concombre de mer commun *Cucumaria frondosa*. Un prélèvement de liquide cœlomique a été effectué chez chacun des échinodermes à l'étude et les cœlomocytes ont été exposés aux substrats connus des protéines MXR (Rhodamine B (RB) et Calcéine-AM (CAM)) en présence et en absence d'inhibiteurs connus (Vérapamil, Cyclosporine-A et Mk571). La fluorescence cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux pour chaque combinaison de substrat ± inhibiteur. Une activité MXR existe bel et bien dans les cœlomocytes des trois espèces et cette étude est la première à comparer cœlomocytes des trois espèces d'échinodermes.

Activité de type MXR

La présence de transporteurs de type MXR a été confirmée dans les cœlomocytes des trois échinodermes grâce aux mesures de l'incorporation de la RB et de la CAM. D'une part, la RB est un substrat connu pour être transporté sans distinction par les protéines de type P-glycoprotéine (Pgp) ainsi que par celles appartenant à la famille des protéines associées à la résistance multiple (MRPs). Une activité MXR a déjà été confirmée chez plusieurs autres espèces grâce à cette méthode d'incorporation de la RB ± inhibiteur.

D'autre part, en utilisant la CAM comme substrat, la présence d'une activité MXR a pu également être confirmée dans les cœlomocytes de *L. polaris* et les cellules vibratiles de *S. dræbachiensis*. La même tendance, mais non-significative, a été soulevée dans les cœlomocytes de *S. dræbachiensis* et *C. frondosa*. Considérant la spécificité de l'inhibiteur Mk, l'activité MXR observée dans ces cellules devait être due à la présence d'une protéine de type MRPs.

Nos résultats fournissent une forte indication de la présence de deux types différents de transporteurs MXR. En effet, une diminution d'une réponse dose-réponse de la fluorescence de la combinaison CAM \pm Mk a été observée dans les cœlomocytes alors qu'une augmentation de même type a été observée avec la combinaison RB \pm CsA. L'observation est la même lorsque les concentrations étaient fixes. D'une part, Mk est l'un des seuls inhibiteurs fréquemment utilisés vraiment spécifiques aux protéines de la famille des MRPs. Le fait d'avoir observé un signal complètement inverse avec l'autre combinaison (RB \pm CsA) nous indique qu'une autre protéine MXR doit être présente. Étant donné que la CsA est connue pour être un puissant inhibiteur (compétitif) de la Pgp, il se pourrait fort bien que la deuxième protéine MXR présente dans les échinodermes soit de ce type. Même si la CsA peut aussi interagir avec la protéine humaine MRP1, elle est toujours utilisée en référence pour détecter la présence de protéines de type Pgp (Zaja et al. 2006). Les échinodermes auraient donc une protéine de type MRPs ainsi qu'une deuxième protéine probablement de type Pgp présentes dans leurs cœlomocytes.

Nos résultats ont cependant révélés que l'activité MXR dans les cœlomocytes était complexe en regard des réponses obtenues face aux expositions : substrat \pm inhibiteur. L'observation d'une diminution de la fluorescence en présence d'un inhibiteur, telle qu'observée avec la combinaison CAM \pm Mk dans les cœlomocytes, n'est pas commune même si cela a été rapportée précédemment. Le renouvellement fréquent des membranes cellulaires dans ces cellules capables d'endocytose, comme les cœlomocytes à l'étude, pourrait expliquer partiellement ces observations. Nous proposons également une distribution des protéines des cœlomocytes à l'étude à la fois dans la membrane plasmique

et dans une membrane interne. Ainsi la calcéine serait moins accumulée à l'intérieur d'un organite ou vésicule en présence de l'inhibiteur de protéines de type MRPs (Mk) mais continuerait d'être pompée à l'extérieur de la cellule par un transporteur de type Pgp, résultant en une diminution de la fluorescence cellulaire totale. L'hypothèse d'une protéine de type MXR intracellulaire a été confirmée en microscopie sur les cœlomocytes d'échinodermes où des granules accumulant la fluorescence ont été observées lors de l'exposition à la combinaison CAM \pm Mk.

Une confirmation de l'activité MXR est venue également des analyses de transfert de type Western (Western blot) puisque les anticorps ont réagi avec des protéines correspondant à des poids moléculaires de Pgp et de MRPs déjà décrits dans la littérature chez des invertébrés sans toutefois que ces protéines ne soient les protéines les plus abondantes déterminées par la coloration au nitrate d'argent du gel d'électrophorèse (SDS-PAGE). Par contre, la discrimination entre les deux protéines n'a pas pu être possible puisque les anticorps utilisés (C9 et C219) ont réagi avec des protéines de poids moléculaires similaires.

5.2 RÉSUMÉ DU CHAPITRE 3

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LE REMANIEMENT LIPIDIQUE DES CŒLOMOCYTES DE *LEPTASTERIAS POLARIS* ET *STRONGYLOCENTROTUS DRÆBACHIENSIS*

L'objectif de ce chapitre était d'étudier le comportement physiologique des cœlomocytes de l'étoile de mer, *L. polaris* et de l'oursin, *S. dræbachiensis*, lors d'un changement de température. Les organismes acclimatés à l'hiver (1°C) ont été soumis à une température estivale (10°C) telle qu'observée dans l'estuaire du Saint-Laurent d'où ils proviennent. La consommation d'oxygène de l'organisme a été mesurée ainsi que plusieurs paramètres cellulaires tels que la concentration et la taille des cœlomocytes, la quantité de protéines et la viabilité des cœlomocytes. Les lipides membranaires ont également été mesurés dans les cœlomocytes afin de vérifier si *L. polaris* et *S. dræbachiensis* avaient la capacité d'adaptation homéovisqueuse (HVA). L'hypothèse générale était que les organismes répondaient, dans une certaine mesure, à la variation de température en modifiant les lipides membranaires des cœlomocytes. L'originalité de cette étude réside dans l'approche comparative entre deux espèces d'échinodermes acclimatées à l'hiver et soumises à des températures d'été.

Profil lipidique particulier des échinodermes

Dosés pour la première fois à notre connaissance pour connaître le profil des lipides présents, les cœlomocytes de *L. polaris* et *S. dræbachiensis* n'ont pas fait exception à la particularité attribuée aux échinodermes, c'est-à-dire une proportion plus élevée que les autres animaux marins en 20:4n-6, 20:1n-11 et 20:2 NMI. Ces acides gras (AG) dans les cœlomocytes propres aux échinodermes pourraient refléter leur importance fonctionnelle, hypothèse avancée pour expliquer la répartition sélective retrouvée en fonction des espèces et des tissus (Glencross 2009). Ainsi, en raison du rôle important des cœlomocytes pour le

système immunitaire des échinodermes, le 20:4n-6 pourrait avoir un effet biologique sur ce système de défense de première ligne. Concernant le 20:1n-11 et le 20:2 NMI dans les cœlomocytes, leur présence est plus énigmatique car ces AG ne sont généralement pas présents en proportion significative chez les invertébrés marins. Le jeûne des organismes qui a duré toute l'expérience pourrait avoir entraîné un épuisement des réserves d'AG essentiels, tel le 20:4n6 et le 20:5n3 et l'obligation de synthétiser des NMI comme AG de remplacement. Une corrélation partielle entre le 20:0 NMI et le 22:0 NMI et une déficience en AG essentiels a déjà été établie. De plus, les organismes marins ont la capacité de synthétiser des NMI (Barnathan 2009) alors qu'ils sont incapables de synthétiser *de novo* des AGPI.

Les propriétés membranaires étant grandement influencées par la nature des AG présents (Hulbert *et al.* 2005), l'énigmatique 20:1n-11 ne devrait pas faire abstraction à la règle et pourrait être un AG incorporé de préférence par les échinodermes pour structurer leurs membranes. Les voies de synthèse n'étant que peu ou pas connues chez les échinodermes, le 20:1n-11 pourrait également être un précurseur d'un AG biologiquement actif. La famille des eicosanoïdes (C20) est importante pour la production des leukotriènes et des prostaglandines par les cellules immunitaires (Glencross 2009).

Remaniement des lipides suite à l'augmentation de la température

Les deux échinodermes ont répondu positivement au modèle HVA en ajustant les lipides membranaires des cœlomocytes en réponse à une variation de température. Une diminution de l'index d'insaturation a été observée lors de l'augmentation de la température, provenant principalement d'une diminution de la proportion du 20:5n-3. Une relation très forte entre la fluidité membranaire et le 20:5n-3 a été démontrée dans les branchies du bivalve *Plactopecten magellanicus* où une diminution de la température induisait une augmentation de 20:5n-3 (Hall *et al.* 2002).

Par contre, le cholestérol ne participe pas ou très peu au réarrangement des membranes puisque sa quantité reste inchangée chez *L. polaris* et varie très peu chez *S. dræbachiensis* à 10°C. La durée de l'expérience de seulement sept semaines a peut-être aussi limitée l'apparition d'un mécanisme de régulation. Nous avons observé un remaniement des acides gras membranaires qu'à la toute fin de l'expérience seulement.

L'augmentation de la température n'est pas le seul facteur influençant la reprise d'activité à la sortie de l'hiver

Le maintien des organismes à jeun pendant sept semaines peut avoir camouflé certains effets attendus comme une augmentation du métabolisme lors de l'augmentation de la température. D'une part, l'augmentation de la température n'a pas clairement engendré une augmentation de la viabilité cellulaire à hauteur de celle mesurée en été ou en automne lorsque la température avoisine 10°C. Les mesures de viabilité cellulaire dans les cœlomocytes sont restées près de deux fois inférieures. En faisant le choix de garder les animaux à jeun, nous avons tenté de soustraire l'effet de l'alimentation sur les processus observés en forçant l'organisme à puiser dans ses réserves. Nous l'avons cependant probablement forcé à rester dans un *statu quo* métabolique attendant un signal plus fort que l'augmentation de la température.

5.3 RÉSUMÉ DU CHAPITRE 4

EFFET COMBINÉ DU PHÉNANTHRÈNE ET D'UN BUTYLÉTAIN SUR LES CŒLOMOCYTES DE *LEPTASTERIAS POLARIS* ET RÔLE DE LA RÉSISTANCE CELLULAIRE AUX XÉNOBIOTIQUES

L'objectif de ce quatrième chapitre était d'évaluer la toxicité du phénanthrène (Phe) seul et en combinaison avec un composé butylétain (Bt) et d'évaluer le rôle potentiel de la résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR) en utilisant les cœlomocytes de l'étoile de mer polaire, *Leptasterias polaris*. Nous avons tout d'abord évalué la toxicité seule du Phe et de deux Bts soit le tributylétain (TBT) et le dibutylétain (DBT) sur la viabilité cellulaire. Parallèlement, nous avons aussi évalué la possibilité de la réaction de ces contaminants avec les protéines responsables de l'activité MXR dans la cellule. Ensuite, la toxicité combinée de Phe avec le TBT ou le DBT a été évaluée. Pour finir, le rôle potentiel exercé par les protéines MXR a été évalué en testant la combinaison d'un inhibiteur de protéines MXR (Cyclosporine A (CsA) et Mk571 (Mk)) et d'un contaminant (Phe, TBT ou DBT). La mesure de la viabilité cellulaire a été effectuée grâce au test du sel de tétrazolium (MTT) et l'activité MXR a été mesurée en cytométrie en flux.

Toxicité individuelle des contaminants et interaction avec les protéines MXR

La CE_{50} a été évaluée dans les cœlomocytes de *L. polaris* en 2008 (0.27 μ M) et en 2009 (0.64 μ M) sur deux séries d'individus. Malgré la différence de tolérance entre ces deux groupes d'étoiles, *L. polaris* apparaît légèrement plus tolérante aux contaminants que d'autres espèces. En comparaison avec les données obtenues dans d'autres études, les cœlomocytes de *L. polaris* apparaissent beaucoup plus tolérants que les cellules immunitaires de mammifères.

Le DBT est beaucoup moins toxique que le TBT sur la viabilité cellulaire des cœlomocytes mesurée au MTT. Bien que les données n'aient pas permis le calcul

statistique des CE_{50} , une approximation graphique de la CE_{50} du DBT a fourni une valeur au dessus de 2 μM en 2008 et juste en dessous de 1 μM en 2009. Une toxicité nettement inférieure du DBT (5 à 10 fois pour les cœlomocytes) a plusieurs fois été observée avec d'autres espèces et d'autres types cellulaires (Brüschweiler *et al.* 1995, Hoth *et al.* 2005). Le choix de la méthode de mesure de la toxicité pourrait avoir influencé la différence si grande de toxicité entre le TBT et le DBT sur les cœlomocytes de *L. polaris*. En effet, le DBT semble avoir un effet plus grand sur la phagocytose des hémocytes de moules mais un effet moindre sur le compte cellulaire (St-Jean *et al.* 2002). Le DBT est donc beaucoup moins toxique sur la viabilité cellulaire des cœlomocytes mesurée au MTT après une exposition de 3 h mais il pourrait avoir un impact plus grand sur la phagocytose, par exemple. Contrairement aux Bts, le Phe n'a montré aucune toxicité sur la viabilité des cœlomocytes.

Afin d'évaluer si les contaminants à l'étude pouvaient avoir une interaction avec les protéines MXR, nous avons mesuré l'effet du TBT, DBT et Phe sur l'incorporation des substrats RB et CAM. Nous rapportons ici la première observation d'un effet du Phe sur l'incorporation de la CAM, ce qui nous indique de façon indirecte l'interaction du Phe avec l'activité MXR dans les cœlomocytes de *L. polaris*.

Toxicité combinée et rôle des inhibiteurs de MXR dans la toxicité du Phe et du TBT

La toxicité de différentes combinaisons de contaminants (Phe, TBT ou DBT) et d'inhibiteurs de MXR (CsA ou Mk) a été mesurée sur la viabilité des cœlomocytes. Une seule combinaison a démontré une toxicité supérieure par rapport à l'exposition au contaminant seul. Le TBT combiné à la CsA est plus toxique que seul pour quatre concentrations sur six. L'augmentation de la toxicité du TBT en présence de la CsA pourrait donc effectivement sous-entendre une interaction avec une protéine MXR dans les cœlomocytes mais le TBT n'induit pas d'effet sur l'incorporation des deux substrats, RB et CAM qui sont pourtant des substrats très utilisés dans l'identification indirecte de l'activité

des protéines MXR. Nous pensons plutôt à un effet toxique du TBT sur l'environnement membranaire adjacent aux protéines MXR induisant une augmentation de la CsA dans la cellule. Il s'agirait donc d'un effet indirect sur les transporteurs MXR. Le TBT est, en effet, connu pour sa toxicité sur les membranes cellulaires (Sodergren *et al.* 2006) en perturbant l'intégrité membranaire et l'homéostasie du calcium (Cima *et al.* 1998).

L'absence de toxicité du Phe et son interaction avec les transporteurs MXR dans les cœlomocytes, nous a incités à évaluer la combinaison Phe avec un autre contaminant (TBT ou DBT) en concentration croissante ou fixe. Combinée à une concentration fixe et non-toxique de TBT (0.05 μM), la combinaison était plus toxique que le Phe seul. Cet effet fut moins évident dans le cas inverse, lorsqu'une exposition au TBT de type dose-réponse combinée à une concentration fixe de Phe (5 μM) a été testée. Dans ce dernier cas, seules trois des concentrations les plus faibles en TBT présentaient une augmentation de la toxicité en présence de Phe. Aux fortes concentrations de la courbe dose-réponse, le TBT est probablement si toxique que l'addition de Phe n'ajoute aucun effet supplémentaire (réel ou observable selon notre méthode). D'une part, selon une hypothèse établie plus haut, le TBT exercerait plutôt un effet indirect en perturbant les membranes cellulaires et ainsi le transport via les protéines MXR. D'autre part, le Phe interagit probablement directement avec les transporteurs MXR, car il a induit une augmentation de l'incorporation de la CAM dans les cœlomocytes. Il se pourrait donc que l'effet toxique indirect du TBT provoque l'augmentation intracellulaire du Phe provoquant ainsi l'apparition de la toxicité. De plus amples études devraient être cependant effectuées afin de vérifier ces hypothèses. Par exemple, nous pourrions mesurer l'accumulation intracellulaire du TBT ou du Phe en isolant la fraction cytosolique des cellules.

5.4 PERSPECTIVES

PERSPECTIVE 1 : AMÉLIORATION DES CONNAISSANCES DES TRANSPORTEURS MXR CHEZ LES ÉCHINODERMES

Plusieurs outils empruntés à la recherche sur les mammifères pourraient être utilisés afin d'améliorer nos connaissances sur les transporteurs MXR chez les échinodermes. La Pgp est la protéine la plus connue mais d'autres protéines comme celles appartenant à la famille des MRPs ou des BCRP (*Breast Cancer Related Proteins*) pourraient être ciblées par la même occasion. Tout d'abord, l'identification directe des protéines grâce à la spectrométrie de masse est pertinente et pourrait être largement améliorée en réalisant une étape de purification des échantillons. Des anticorps plus spécifiques et plus diversifiés pourraient également être utilisés permettant de mettre en évidence une ou des protéines de type Pgp, MRPs ou BCRP. Ensuite, l'identification et la quantification de l'expression des gènes pourraient être réalisées dans les coelomocytes ou dans d'autres tissus d'échinodermes. En utilisant des amorces d'ADN (« primers ») connues chez les mammifères, l'équipe de Zaja et co-auteurs (Zaja *et al.* 2007) a démontré la présence des gènes *abcc3* (MRP3) et *abcb1* (Pgp1) dans une lignée cellulaire de poisson, PLHC-1. Il y a chez l'oursin deux fois plus de gènes des transporteurs ABCC (MRPs) que dans les autres deutérostomiens examinés sans que l'on sache vraiment leur niveau d'expression (Epel *et al.* 2008). Pour finir, il convient de continuer à travailler avec des méthodes de mesures indirectes moins coûteuses, plus rapides et plus simples et de les valider avec les méthodes de mesures directes mentionnées précédemment. La méthode de mesure de l'incorporation de substrats fluorescents, nommée test MXR, reste un outil de première importance. Plusieurs travaux récents continuent d'ailleurs de l'utiliser (Faria *et al.* 2011, Smital *et al.* 2011). Afin d'améliorer la rapidité de la méthode, il conviendrait de se tourner vers l'utilisation de microplaques et d'utiliser des substrats et inhibiteurs plus spécifiques développés récemment pour le domaine médical. Nous avons essayé de travailler en microplaque mais sans succès car nous pensons que la fluorescence de la rhodamine B

s'adsorbe aux parois des puits ainsi qu'aux parois extérieures des cellules biaisant les résultats obtenus. Pour accompagner la méthode du test MXR, il serait très pertinent de développer le test d'ATPase chez les échinodermes. Ce test a été réalisé très récemment et avec succès sur la lignée cellulaire PLHC-1 par l'équipe de Zaja et co-auteurs (Zaja *et al.* 2011). Il s'agit d'une méthode réalisée jusque là seulement chez les mammifères pour la recherche médicale. Brièvement, il s'agit de déterminer l'activité ATPase dans des vésicules plasmiques issues de cellules à l'étude en mesurant le relargage du phosphate inorganique (Pi). Les transporteurs MXR utilisent de l'ATP pour réinitialiser la protéine vers l'intérieur et ainsi lui permettre de transporter un autre substrat (Aller *et al.* 2009, Zaja *et al.* 2011). L'activité de l'ATPase est hautement corrélée avec l'interaction de tout composé réagissant avec une Pgp. Ce test permet également de distinguer les substrats des inhibiteurs puisqu'une activation de l'ATPase indique la présence d'un substrat transporté et une diminution suggère que le composé testé inhibe directement la fonction de transport (Sarkadi *et al.* 1992, Zaja *et al.* 2011). Par contre, pour avoir une meilleure définition de ce test, il faut connaître les transporteurs MXR présents ou encore sélectionner une lignée cellulaire hautement riche en une protéine MXR bien définie (Zaja *et al.* 2011). L'idée pourrait être explorée chez les échinodermes car cela permettrait rapidement de savoir le potentiel chimiosensibilisateur d'un contaminant en travaillant avec les cœlomocytes d'échinodermes, si facile à utiliser.

PERSPECTIVE 2 : PHYSIOLOGIE DES ÉCHINODERMES DU SAINT-LAURENT, ESPÈCES D'EAU FROIDE

Les organismes à l'étude dans nos travaux sont des échinodermes vivant en eau froide et très peu d'études sur le métabolisme (cellulaire ou général) ont été effectuées en rapport avec un cycle des saisons marqué par un long hiver et la présence de glace. Pourtant, qu'en est-il du métabolisme l'hiver ? *L. polaris* et *S. dræbachiensis* ont tous les deux des particularités qui leur sont propres. Par exemple, *L. polaris* pond ses œufs en hiver et les couvent pendant une longue période jusqu'au retour du printemps. Elle doit avoir une

régulation du métabolisme ajustée à son jeûne de plusieurs mois dans les conditions hivernales rudes présentes à nos latitudes. Quant à *S. dræbachiensis*, il conserve sa nourriture dans son intestin jusqu'à, semble t'il, une nouvelle période d'alimentation. Est-ce une adaptation à l'hiver, période où la nourriture est manquante ? Il est indéniable que de plus amples études sur la physiologie saisonnière de ces espèces contribueraient à l'amélioration des connaissances sur les stratégies utilisées par les invertébrés vivants en eaux froides. Par contre, grâce à ce second volet de la thèse, nous savons qu'en adhérant au modèle de l'HVA, les échinodermes, du moins *L. polaris* et *S. dræbachiensis*, ajustent les propriétés physiques des membranes des cœlomocytes ce qui influence directement les processus s'y déroulant, comme l'activité des protéines (Hochachka et Somero 2002). Ainsi, cela indiquerait que les membranes cellulaires conservent un environnement favorable à l'activité des protéines MXR. Mais qu'en est-il réellement ? Ces protéines continuent-elles de protéger les cellules contre les agressions toxiques même en hiver ? Des mesures plus précises du métabolisme pourraient être développées telle que la mesure de l'activité mitochondriale dans les cœlomocytes.

PERSPECTIVE 3 : AMÉLIORER L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES MÉLANGES

Les organismes aquatiques sont immanquablement exposés à un mélange de contaminants dont la composition individuelle a une histoire de contamination pour chacun des organismes et/ou peut réagir avec d'autres composés pour produire un effet toxique additif, synergique ou antagoniste (Barata *et al.* 2006). La toxicité des mélanges de contaminants est un défi très important en écotoxicologie et des études où des interactions au cas par cas sont évaluées sont importantes (Eggen *et al.* 2004). Les transporteurs MXR ont une fonction de protection essentielle à la cellule et sont le lieu de transit pour les contaminants. La progression de la maîtrise des méthodes d'évaluation des interactions sur ces transporteurs est, selon nous, importante afin de pouvoir rapidement cibler les contaminants susceptibles d'interagir avec les autres et ainsi moduler leur concentration. Dans le milieu marin, les échinodermes sont des organismes largement répandus. Leurs

cœlomocytes sont des cellules multifonctionnelles complexes mais ayant un fort potentiel comme modèle cellulaire libre pour étudier le mécanisme de transport MXR en toxicologie aquatique en laboratoire comme sur le terrain et ainsi appuyer les besoins de connaissances sur les interactions entre contaminants. L'idée du chapitre 4 était d'évaluer l'implication des protéines MXR dans la toxicité observée. Afin de mieux décrire la toxicité d'un mélange binaire, l'approche de l'addition des concentrations (AC) et de l'action indépendante (AI) pourrait être utilisée avec les tests de toxicité réalisés sur les cœlomocytes. Grâce à cette méthode mathématique, une estimation de la relation entre les composés du mélange pourrait être faite à savoir s'ils ont le même mode d'action (Altenburger *et al.* 2003, Barata *et al.* 2006). Récemment, Faria et co-auteurs (Faria *et al.* 2011) ont utilisé cette méthode statistique pour évaluer le rôle des transporteurs MXR dans le mécanisme de toxicité des mélanges simples et binaires sur la viabilité des larves et des embryons de la moule zébrée. Ils n'ont utilisé, pour l'instant, que des composés toxiques qui étaient des inhibiteurs ou des substrats des transporteurs MXR.

PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Le rôle des transporteurs MDR est très bien décrit en pharmacologie ou en biologie cellulaire. La recherche en médecine travaille beaucoup sur l'identité des inhibiteurs de transporteurs dans le but de traiter plus efficacement certains cancers. Par contre, dans le domaine de l'environnement où les transporteurs MDR deviennent les transporteurs MXR, les connaissances sont beaucoup moins avancées. Il est très intéressant de constater qu'en environnement, nous cherchons à comprendre comment les composés toxiques sont expulsés par les transporteurs MXR hors de la cellule et comment les transporteurs exercent de façon optimale une protection cellulaire environnementale. Dans le domaine médical, la tendance est plutôt à chercher le moyen d'augmenter l'accès d'un médicament à la cellule en synthétisant, par exemple, des inhibiteurs de transporteurs MDR qui rendraient plus efficace le traitement du cancer, quand les cellules cancéreuses ont une forte expression de ces protéines de transport (Epel *et al.* 2008). Les outils développés en biomédical peuvent être utilisés en environnement afin d'obtenir une meilleure connaissance des processus MXR. Les données sont encore éparées en environnement et beaucoup de chemin reste à parcourir ne serait-ce que pour identifier et caractériser les protéines. L'objectif ambitieux de ce doctorat était d'évaluer le rôle des MXR dans la protection environnementale contre les contaminants chez les échinodermes. Nous y avons travaillé et beaucoup restent à faire.

Les transporteurs MXR sont la première ligne de défense contre les agressions en maintenant les composés toxiques à l'extérieur de la cellule. On peut alors imaginer l'importance des interactions causées par la présence de multiples contaminants environnementaux. Plusieurs produits toxiques ont la capacité d'inhiber l'activité des transporteurs. On les nomme les chimiosensibilisateurs et leur simple présence peut moduler les concentrations cellulaires d'autres contaminants qui seraient normalement transportés. La conséquence de la chimiosensibilisation est donc une augmentation de la toxicité (Epel *et al.* 2008). L'étude de la contamination multiple est difficile et l'interprétation est toujours ardue. Nous pensons que l'étude des transporteurs MXR et du

potentiel de chimiosensibilisation des contaminants est très importante dans le suivi (de la description à la prise de décisions politiques) de la qualité de l'environnement. La chimiosensibilisation pourrait très certainement participer à l'explication du paradoxe en toxicologie de l'environnement selon lequel, parfois, les effets toxiques observés sont inexplicables et non-prévisibles parce que les contaminants sont sous les limites de toxicité établies (Epel *et al.* 2008, Smital *et al.* 2004). Pourtant, la recherche sur l'aspect environnemental des produits chimiques agissant comme des chimiosensibilisateurs n'en est encore qu'à ses balbutiements (Faria *et al.* 2011). Il convient selon nous de continuer deux types d'approches : en laboratoire, pour le contrôle des facteurs extérieurs et la compréhension des mécanismes, et sur le terrain, pour la validation de notre compréhension et de son application dans le milieu.

Développement de connaissances mécanistiques en laboratoire

Grâce au développement de tests comme le test d'ATPase et celui de l'évaluation de la toxicité d'un mélange binaire, des essais avec les contaminants de l'environnement pourraient être conduits afin de mieux comprendre le rôle des transporteurs MXR dans la toxicité des contaminants et de leurs mélanges binaires. L'identité des chimiosensibilisateurs n'est pas vraiment précise et certains ne sont même pas toxiques eux-mêmes. Par exemple, les fragrances sont considérées non-toxiques mais pourtant ont la capacité d'inhiber le transport via les protéines MXR chez les moules marines (Epel *et al.* 2008). Plusieurs contaminants considérés toxiques ont, quant à eux, la capacité d'inhiber ou d'être transportés par une protéine Pgp (lignée cellulaire de poisson PLHC-1/dox) : des pesticides comme l'endosulfan et le diazinon, des métaux lourds et métalloïdes comme l'arsenic (Zaja *et al.* 2011). D'autres contaminants connus, comme le benzo-(a)-pyrene auraient la capacité d'être transportés par une protéine de type BCRP chez la truite (Zaja *et al.* 2011) alors que des protéines de la famille des MRPs seraient impliquées dans le transport d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques dans une lignée cellulaire canine (Srivastava *et al.* 2002). Nous avons initialement prévu une exposition d'individus

en aquarium à plusieurs contaminants. Cette expérience n'a pas été faite mais cela pourrait apporter des données sur l'induction des protéines MXR dans un environnement pollué et aussi permettrait de valider les essais et les interprétations avant d'aller chercher des données de terrain.

Développement de connaissances pratiques sur le terrain

D'une part, ajouter un biotest MXR dans l'évaluation écotoxicologique d'échantillons provenant de l'environnement serait selon nous une étape importante. Ainsi, à partir d'un seul test, nous pourrions savoir si des contaminants présents dans l'échantillon ont la capacité d'interférer avec le transport par les protéines MXR et ainsi moduler la concentration de certains contaminants. Un tel ajout à la batterie de tests de routine (test algal, test MTT, induction des P450 entre autres) a d'ailleurs été réalisé dans l'évaluation de la toxicité des eaux usées de la ville de Zagreb (Croatie) avec beaucoup de succès (Smital *et al.* 2011). En séparant l'échantillon en fractions polaire, neutre et non-polaire, ces auteurs ont été capables de relier, par exemple, la forte concentration en fragrance et l'inhibition des transporteurs MXR.

D'autre part, le caractère inductible des transporteurs MXR pourrait également permettre de faire un suivi entre les sites contaminés et les sites moins-contaminés (Bard *et al.* 2002, Minier *et al.* 1999). Une forte présence en transporteurs MXR indiquerait la présence de chimiosensibilisateurs et ainsi ciblerait les sites plus sensibles à la contamination. Pain et Parant (2007) ont démontré une induction des protéines MXR sept fois supérieure chez des moules zébrées provenant d'un site contaminé en comparaison avec des individus ayant subi une dépuration en laboratoire. En milieu marin, les cœlomocytes d'échinodermes pourraient devenir un outil très intéressant car la récupération des cellules par une ponction de liquide cœlomique est sans danger pour l'animal et ne nécessite pas de matériel coûteux. La facilité de l'exécution de la méthode, son coût et sa durée sont des critères importants dans l'établissement d'un biotest routinier de surveillance

environnementale. La difficulté d'interprétation des résultats demeure une contrainte pour le moment.

La présente étude, principalement liée à la physiologie des cœlomocytes, appuie la progression de la compréhension sur ce sujet encore méconnu. L'avancement des connaissances sera donc grandement favorisé par les diverses contributions de ce projet. Ainsi, nous avons démontré la présence d'activité MXR dans les cœlomocytes de *L. polaris*, *S. dræbachiensis* et *C. frondoda*. Au moins deux protéines différentes seraient responsables de cette activité dont une protéine de type MRPs. Parallèlement, nous avons progressé dans les connaissances du fonctionnement des cœlomocytes puisque nous avons démontré que *L. polaris* et *S. dræbachiensis* répondaient à une variation de température en suivant partiellement le modèle de l'adaptation homéovisqueuse. Ainsi, en remodelant les lipides, l'environnement physique des membranaires des transporteurs MXR serait maintenu leur permettant d'assurer leur fonction protectrice. Ce dernier point pourra être abordé dans de futurs travaux. Pour terminer, nous avons également contribué au développement des connaissances sur le rôle des transporteurs MXR dans la protection cellulaire face aux mélanges de contaminants.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A. et Bourdineaud, J.-P. (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67, 347-347-357.
- Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L. et Chang, G. (2009). Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 323, 1718-1722.
- Altenburger, R., Nendza, M. et Schüürmann, G. (2003). Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1900-1915.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 361-398.
- Amiard, J.-C., Caquet, T. et Lagadic, L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In "Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement" (L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade, Eds.). Lavoisier TEC & DOC, Paris.
- Anyakora, C., Ogbechea, A., Palmerb, P. et Cokera, H. (2005). Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A* 1073, 323-330.
- Aravindakshan, J., Paquet, V., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D. et Cyr, D. G. (2004). Consequences of Xenoestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicological Sciences* 78, 156-165.
- Ashpole, S. L., Bishop, C. A. et Brooks, R. J. (2004). Contaminant Residues in Snapping Turtle (*Chelydra s. serpentina*) Eggs from the Great Lakes–St. Lawrence River Basin (1999 to 2000). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 240-252.
- Azenha, M. A., Evangelista, R., Martel, F. et Vasconcelos, M. T. (2004). Estimation of the human intestinal permeability of butyltin species using the Caco-2 cell line model. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1431-1442.

Bae, D.-S., Gennings, C., Carter, W. H. J., Yang, R. S. H. et Campaign, J. (2001). Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicological Sciences* 63, 132-142.

Bakos, É. et Homolya, L. (2007). Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *European Journal of Applied Physiology* 453, 621-641.

Barata, C., Baird, D. J., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. et Riva, M. C. (2006). Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology* 78, 1-14.

Bard, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357-389.

Bard, S. M., Bello, S. M., Hahn, M. et Stegeman, J. (2002). Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquatic Toxicology* 59, 237-251.

Barnathan, G. (2009). Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91, 671-678.

Basuyaux, O., Mathieu, M. et Richard, O. (2001). Influence de la taille, de la température et du régime alimentaire sur la consommation d'oxygène de l'oursin *Paracentrotus lividus* et de l'ormeau *Haliotis tuberculata* en élevage. *Marine Life* 11, 57-67.

Békri, K. et Pelletier, E. (2004). Trophic transfer and in vivo immunotoxicological effects of tributyltin (TBT) in polar seastar *Leptasterias polaris*. *Aquatic Toxicology* 66, 39-53.

Bellas, J., Saco-Alvarez, L., Nieto, O. et Beiras, R. (2008). Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. *Marine Pollution Bulletin* 57, 493-502.

Berg, O. K. et Bremset, G. (1998). Seasonal changes in the body composition of young riverine Atlantic salmon and brown trout. *Journal of Fish Biology* 52, 1272-1288.

Biedler, J. L., Riehm, H., Peterson, R. H. et Spengler, B. A. (1975). Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinese hamster cells. *Journal of the National Cancer Institute* 55, 671-680.

- Binyon, J. (1972). "Physiology of Echinoderms." Pergamon Press,
- Borda, E. S., Tenenbaum, A., Sales, M. E., Rumi, L. et Sterin-Borda, L. (1998). Role of arachidonic acid metabolites in the action of a [beta] adrenergic agonist on human monocyte phagocytosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58, 85-90.
- Borm, P. J. A. et Henderson, P. T. (1996). Occupational toxicology. In "Toxicology. Principles and Applications." (R. J. M. Niesink, J. de Vries et M. A. Hollinger, Eds.), pp. 1165. CRC press and Open University of the Netherlands.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. et Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 347-357.
- Bour-Dill, C., Gramain, M.-P., Merlin, J.-L., Marchal, S. et Guillemin, F. (2000). Determination of intracellular organelles implicated in daunorubicin cytoplasmic sequestration in multi-drug resistance MCF-7 cells using fluorescence microscopy image analysis. *Cytometry* 39, 16-25.
- Bourget, E., Archambault, D. et Bergeron, P. (1985). Effet des propriétés hivernales sur les peuplements épibenthiques intertidaux dans un milieu subarctique, l'estuaire du Saint-Laurent. *Naturaliste Canadien* 112, 131-142.
- Brüschweiler, B. J., Würigler, F. E. et Fent, K. (1995). Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (*Poeciliopsis Zucida*). *Aquatic Toxicology* 32, 143-160.
- Caminada, D., Zaja, R., Smital, T. et Fent, K. (2008). Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquatic Toxicology* 90, 214-233.
- Canada, E. (2011). Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). (M. D. a. A. U.-S. a. T. Branch, Ed.), pp. 140 p. Environment Canada, Ottawa (Ontario).
- Canadian council of ministers of the environment, C. (2010). Canadian soil quality guidelines for carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons (environmental and human health). pp. 216 pp. Scientific Criteria Document (revised).

Carfi, M., Gennari, A., Malerba, I., Corsini, E., Pallardy, M., Pieters, R., Van Loveren, H., Vohr, H. W., Hartung, T. et Gribaldo, L. (2007). In vitro tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology* 229, 11-22.

Cavey, M. J. et Arkel, K. (1994). "Echinodermata." Wiley-Liss,

Chabot, R. et Rossignol, A. (2003). "Algues et faune du littoral du Saint-Laurent maritime : Guide d'identification." Institut des Sciences de la Mer de Rimouski et Pêches et Océan Canada, Rimouski et Mont-Joli.

Cheek, A. O., Vonier, P. M., Oberdörster, E., Collins Burow, B. et McLachlan, J. A. (1998). Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. *Environmental Health Perspectives* 106, 5-10.

Chia, F.-S. et Xing, J. (1996). Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies* 35, 231-254.

Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G. et Burighel, P. (1998). Cytoskeleton alterations by Tributyltin (TBT) in Tunicate phagocytes. *Ecotoxicology and environmental safety* 40, 160-165.

Clarke, A. et Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893-905.

Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V. et Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.

Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M. et Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer research* 54, 5902-5910.

Conover, W. J. (1980). "Practical nonparametric statistics." Wiley & Sons, New York.

Copeman, L. A. et Parrish, C. C. (2003). Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Marine Biology* 143, 1213-1227.

Cornwall, R., Holland Toomey, B., Bard, S. M., Bacon, C., Jarman, W. M. et Epel, D. (1995). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel

Mytilus californianus and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology* 31, 277-296.

Corsini, E., Viviani, B., Marinovich, M. et Galli, C. L. (2001). Cyclosporin A exacerbates skin irritation induced by tributyltin by increasing nuclear factor kB activation. *The Journal of Investigative Dermatology* 117, 1627-1634.

Coteur, G., Gillan, D., Pernet, P. et Ph., D. (2005). Alteration of cellular immune responses in the seastar *Asterias rubens* following dietary exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology* 73, 418-421.

Coteur, G., Gosselin, P., Wantier, P., Chambost-Manciet, Y., Danis, B., Pernet, P., Warnau, M. et Dubois, P. (2003). Echinoderms as bioindicators, bioassays and impact assessment tools of sediment-associated metals and PCBs in the North Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 190-202.

Crockett, E. (1998). Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist* 38, 291-304.

Daoud, R., Kast, C., Gros, P. et Georges, E. (2000). Rhodamine 123 binds to multiple sites in the Multidrug Resistance Protein (MRP1). *Biochemistry* 39, 15344-15352.

Davidson, J., Kerr, A., Guy, K. et Rotondo, D. (1998). Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. *Immunology* 94, 228-234.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C. et Samain, J.-F. (2006). Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567-576.

Depledge, M. H. et Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 161-172.

Doussantousse, É. (2005). Système de défense de l'étoile de mer boréale, *Leptasterias polaris*, en présence du tributylétain. In "Institut des sciences de la mer de Rimouski", Vol. M. Sc.Thesis, pp. 105. Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Qc, Canada.

Doussantousse, É., Pelletier, É., Beaulieu, L., Rainville, L.-C. et Belzile, C. (2011). Multixenobiotic resistance in cœlomocytes from three echinoderm species. *Aquatic Biology* 12, 81-96.

Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. et Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15665-15670.

Dressen, T. D., Johnson, D. H. et Henikoff, S. (1988). The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. *Molecular and Cellular Biology* 8, 5206-5215.

Dudler, R. et Hertig, C. (1992). Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary implications. Journal of Biological Chemistry* 267, 5882-5888.

Dufour, R. et Ouellet, P. (2007). Rapport d'aperçu et d'évaluation de l'écosystème marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent.. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.*, 2744F : vii + 123 p.

Edds, K. T. (1993). Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. *Journal of Invertebrate Pathology* 61, 173-178.

Eggen, R. I. L., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B. I. et Schweigert, N. (2004). Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 38, 58A-64A.

El-Alawi, Y. S., McConkey, B. J., Dixon, D. G. et Greenberg, B. M. (2002). Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 12-21.

El-Sabh, M. et Silverberg, N. (1990). The St. Lawrence Estuary: Introduction. *In* "Oceanography of a Large-Scale Estuarin System. The St. Lawrence." (M. El-Sabh et N. Silverberg, Eds.), Vol. 39. Springer-Verlag, Berlin.

Endicott, J. A. et Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual review of biochemistry* 58, 137-171.

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Hamdoun, A. et Smital, T. (2008). Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science & Technology* 42, 3914-3920.

Essodaïgui, M., Broxterman, H. J. et Garnier-Suillerot, A. (1998). Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* 37, 2243-2250.

Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S. et Epel, D. (2002). Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*. *Marine Biology* 140, 343-353.

Eytan, G. D., Regev, R., Oren, G. et Assaraf, Y. G. (1996). The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 12897-12902.

Falahatpisheh, M. H., Donnelly, K. C. et Ramos, K. S. (2001). Antagonist interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 62, 543-560.

Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Pina, B. et Barata, C. (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. *Aquatic Toxicology* 101, 78-87.

Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro* 15, 477-488.

Folch, J., Lees, M. et Sloane-Stanlez, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.

Foxwell, B. M., Mackie, A., Ling, V. et Ryffel, B. (1989). Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Molecular Pharmacology* 36, 543-546.

Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, R. P. et Petocz, P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Cancer Cell International* 21, 2412-2422.

Frouin, H., Pelletier, E., Lebeuf, M., Saint-Louis, R. et Fournier, M. (2010). Toxicology of organotins in marine organisms: a review. In "Organometallic Compounds: Preparation, Structure and Properties." (H. F. Chin, Ed.), pp. 1-47. Nova Science Pub Inc.

Gagnon, P., Himmelman, J. H. et Johnson, L. E. (2004). Temporal variation in community interfaces: kelp-bed boundary dynamics adjacent to persistent urchin barrens. *Marine Biology* 144, 1191-1203.

Galgani, F., Cornwall, R., Holland Toomey, B. et Epel, D. D. (1996). Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotics defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 325-331.

Gaymer, C. F., Dutil, C. et Himmelman, J. H. (2004). Prey selection and predatory impact of four major sea stars on a soft bottom subtidal community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313, 353-374.

Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K. H., Ulrich, W.-R. et Beck, J. (1995). The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 208, 345-352.

Gerlach, J. H., Kartner, M., Bell, D. R. et Ling, V. (1986). Multidrug resistance. *Cancer Surveys* 1, 25-46.

Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* 1, 71-124.

Gobeil, C., Rondeau, B. et Beaudin, L. (2005). Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence river. *Environmental Science and Technology* 39, 456-464.

Gros, P., Croop, J. et Housman, D. (1986). Mammalian multidrug resistance gene : complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47, 371-380.

Guard, H. E., Cobet, A. B. et Coleman, W. M. (1981). Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *American Association for the Advancement of Science* 213, 770-771.

Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C. (2004). The MRP-Related and BCRP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current Drug Metabolism* 5, 21-53.

Hall, J. M., Parrish, C. et Thompson, R. J. (2002). Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *The biological bulletin* 202, 201-203.

Hamdoun, A. M., Cherr, G. N., Roepke, T. A. et Epel, D. (2004). Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrus purpuratus*). *Developmental Biology* 276, 452-462.

Hamel, J. F. et Mercier, A. (1995). Prespawning behavior, spawning, and development of the brooding starfish *Leptasterias polaris*. *The Biological Bulletin* 188, 32-45.

Hamel, J. F. et Mercier, A. (1996). Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 253-253-271.

Hamel, J. F. et Mercier, A. (1998). Diet and feeding behaviour of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* in the St. Lawrence estuary, eastern Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76, 1194-1194-1198.

Hamill, D. R. et Suprenant, K. A. (1997). Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Developmental Biology* 190, 117-128.

Hannam, M. L., Bamber, S. D., Galloway, T. S., Moody, J. A. et Jones, M. B. (2010). Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78, 779-784.

Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M. et Shevchenko, A. (2003). Fast-Response Proteomics by Accelerated In-Gel Digestion of Proteins. *Analytical Chemistry* 75, 1300-1306.

Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology* 57, 19-42.

Hemmer, M. J., Courtney, L. A. et Ortego, L. S. (1995). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Zoology* 272, 69-77.

Hereu, B., Zabala, M., Linares, C. et Sala, E. (2005). The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Marine Biology* 146, 293-299.

Herlevsen, M., Oxford, G., Owens, C. R., Conaway, M. et Theodorescu, D. (2007). Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear

accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1804-1813.

Hernroth, B., Baden, S., Thorndyke, M. et Dupont, S. (2011). Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. *Aquatic Toxicology* 103, 222-224.

Hickman, C. P., Roberts, L. S. et Larson, A. (1996). "Integrated principles of Zoology." WCB/McGraw-Hill,

Higgins, C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446, 749-757.

Hillier, B. J. et Vacquier, V. D. (2003). Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. *Journal of Cell Biology* 160, 597-604.

Himmelman, J. H. et Dutil, C. (1991). Distribution, population structure and feeding of subtidal seastars in the northern Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progress Series* 76, 71-71-72.

Himmelman, J. H., Lavergne, Y., Cardinal, A., Martel, G. et Jalbert, P. (1982). Brooding behaviour of the northern sea star *Leptasterias polaris*. *Marine Biology* 68, 235-240.

Hochachka, P. W. et Somero, G. N. (2002). "Biochemical Adaptation : mechanism and processs in physiological evolution." Oxford University Press, New York.

Holland Toomey, B. et Epel, D. (1993). Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins. *The Biological Bulletin* 185, 355-364.

Hollo, Z., Homolya, L., Hegedfis, T. et Sarkadi, B. (1996). Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 383, 99-104.

Hoth, A., Johannisson, R., Syed Ali, S., Schulze, J. et Siegers, C.-P. (2005). Cytotoxicity of organotin compounds in different cultured cell lines. *Toxicology and Industrial Health* 21, 131-136.

Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H. et Else, P. L. (2005). Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological Reviews* 80, 155-169.

Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y. et Johnson, R. (1979). Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer research* 39, 2200-2203.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. et Smyth, M. J. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends in Biochemical Sciences* 5, 1-6.

Kagan, L., Dreifinger, T., Mager, D. E. et Hoffman, A. (2010). Role of P-Glycoprotein in region-specific gastrointestinal absorption of talinolol in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 38, 1560-1566.

Kaneshiro, K. et Karp, R. D. (1980). The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias Imbricata*. *Biological Bulletin* 159, 295-310.

Kannan, K., Villeneuve, D. L., Blankenship, A. L. et Giesy, J. P. (1998). Interaction of tributyltin with 3,4,3',4',5 -pentachlorobiphenyl-induced ethoxyresorufin *o*-deethylase activity in rat hepatoma cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 55, 373-384.

Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G. et Ling, V. (1985). Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316, 820-823.

Kerboeuf, D., Chambrier, P., Le Vern, Y. et Aycardi, J. (1999). Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics. *Parasitology Research* 85, 118-123.

Kerboeuf, D., Guégnard, F. et Le Vern, Y. (2003). Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human *mdr1* monoclonal antibodies. *Parasitology Research* 91, 79-85.

Kerr, I. D., Jones, P. M. et George, A. M. (2010). Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *The FEBS Journal* 277, 550-563.

Kessel, D., Botteril, V. et Wodinsky, I. (1968). Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer research* 28, 938-941.

Kettle, B. T. et Lucas, J. S. (1987). Biometric relationships between organ indices, fecundity, oxygen consumption and body size in *Acanthaster planci* (L.) (Echinodermata; asteroidea). *Bulletin of Marine Science* 41, 541-551.

Kickhoefer, V. A., Vasu, S. K. et Rome, L. H. (1996). Vaults are the answer, what is the question ? *Trends in Cell Biology* 6, 174-178.

Kingtong, S., Chitramvong, Y. et Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. . *Aquatic Toxicology* 85, 124-132.

Klingensmith, J. S. (1982). Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17, 976-981.

Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Battcher, P., Teguliwa, L., Kriiner, G. et Broeg, K. (1998). Detection of p-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling. *Marine Environmental Research* Vol. 46, 411-418.

Kusumi, A., Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Hyde, J. S. et Merkle, H. (1986). Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase. *Biochimica and Biophysica Acta. Biomembranes*. 854, 307-317.

Laochariyakul, P., Ponglikitmongkol, M. et Mankhetkorn, S. (2003). Functional study of intracellular P-gp and MRP1-mediated pumping of free cytosolic pirarubicin into acidic organelles in intrinsic resistant SiHa cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81, 790-799.

Laskowski, R., Bednarska, A. J., Kramarz, P. E., Loureiro, S., Scheil, V., Kudlek, J. et Holmstrup, M. (2010). Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors - A meta-analysis and case studies. *Science of The Total Environment* 408, 3763-3774.

Lauzon-Guay, J.-S. et Scheibling, R. E. (2007). Seasonal variation in movement, aggregation and destructive grazing of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in relation to wave action and sea temperature. *Marine Biology* 151, 2109-2118.

Lawrence, J. M. (1975). On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 13, 213-286.

Le Breton, S. (2002). Transfert trophique du rétène et du phénanthrène chez l'étoile de mer boréale, *Leptasterias polaris* (Echinodermata, asteroidea) et réponse immunotoxique. In "Institut des sciences de la mer de Rimouski", Vol. M. Sc. Thesis, pp. 168. Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Qc, Canada.

Le Grand, F., Kraffe, E., Marty, Y., Donaghy, L. et Soudant, P. (2011). Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 159.

Leier, I., Buchholz, U., Cole, S. P. C., Deeley, R. G. et Keppler, D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Journal of Biological Chemistry* 269, 27807-27810.

Leslie, E. M., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C. (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 197, 3-23.

Leslie, E. M., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of p-glycoprotein, mrp1, mrp2, and bcrp (abcg2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 216-237

Lindl, T., Lewandowski, B., Schreyögg, S. et Stäudte, A. (2005). An evaluation of the *in vitro* cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Alternatives to Laboratory Animals* 33, 591-601.

Ling, V., Gerlach, J. H. et Kartner, M. (1984). Multidrug resistance. *Breast Cancer Research and Treatment* 4, 89-94.

Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. et Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 931-959.

Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1994). Prolonged association of temperature-sensitive mutants of Human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 269, 28683-28689.

Lüders, A.-K., Saborowski, R. et Bickmeyer, U. (2009). Inhibition of multidrug/xenobiotic resistance transporter by MK571 improves dye (Flura2) accumulation in crustacean tissues from lobster, shrimp and isopod *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 150, 368-371.

MacPherson, J. C., Pavlovich, J. G. et Jacobs, R. S. (1998). Phospholipid composition of the granular amebocyte from the horseshoe crab, *Limulus polyphenus*. *Lipids* 33.

Maguire, J. R. (1997). Aquatic environmental aspects of non-pesticidal organotin compounds. *Water Pollution Research Journal of Canada* 26, 243-360.

Maki, N., Hafkemeyer, P. et Dey, S. (2003). Allosteric modulation of human P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18132-18139.

Mamelona, J. (2004). Le rôle de l'oursin vert *Strongylocentrotus droebachiensis* dans le recyclage du tributylétain en milieu côtier. . In "Institut des Sciences de la Mer de Rimouski", Vol. PhD pp. 140. Université du Québec à Rimouski, Rimouski.

Marin, M., Legros, H., Poret, A., Leboulenger, F. et Le Foll, F. (2004). Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms. *Marine Environmental Research* 58, 209-213.

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. et Samain, J.-F. (1992). Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 163 221-234.

McGrath, T. et Center, M. S. (1987). Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 145, 1171-1176.

Mercier, A. et Hamel, J. F. (2009). Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. *Advances In Marine Biology* 55, 1-319.

Mercier, A., Pelletier, E. et Hamel, J. F. (1994). Metabolism and subtle toxic effects of butyltin compounds in starfish. *Aquatic Toxicology* 28, 259-273.

Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., Monti, E., Gariboldi, M., Dolfini, E. et Arancia, G. (2002). Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicology in Vitro* 16, 389-398.

Metcalf-Smith, J. L., Maguire, R. J. et Batchelor, S. P. (1995). Polychlorinated biphenyl congeners and chlorinated pesticides in fish from the Yamaska River basin, Quebec. *Water Quality Research Journal of Canada* Vol. 30, 179-204.

Minier, C., Eufemia, N. et Epel, D. (1999). The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitoring the environnement. *Biomarkers* 4, 442-454.

Minier, C. et Moore, M. N. (1996). Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Marine Ecology Progress Series* 142, 165-173.

Mirski, S. E. L., Gerlach, J. H. et Cole, S. P. C. (1987). Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer research* 47, 2594-2598.

Mossink, M. H., van Zon, A., Fränzel-Luiten, E., Schoester, M., Kickhoefer, V. A., Scheper, R. J., Sonneveld, P. et Wiemer, E. A. C. (2002). Disruption of the murine Major Vault Protein (MVP/LRP) gene does not induce hypersensitivity to cytostatics. *Cancer research* 62, 7298-7304.

Müller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germanni, U. A., Gottesmani, M. M., Morse, B. S., Roninson, I. B. et Sarkadi, B. (1996). Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1877-1883.

Müller, W. E. G., Steffen, R., Rinkevich, B., Matranga, V. et Kurelec, B. (1996). The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds. *Marine Biology* 125, 165-170.

Nagpal, K. K. (1993). Ambient water quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons. Water Quality Branch, Water Management Division, Ministry of Environment, Lands and Parks, Victoria, BC.

Nakata, M., Oyama, Y., Okada, Y., Yamazaki, Y., Chikahisa, L. et Satoh, M. (1999). Flow cytometric analysis on tri-n-butyltin-induced increase in annexin V binding to membranes of rat thymocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7, 267-273.

Nebert, D. W. et Dieter, M. Z. (2000). The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* 61, 124-135.

- Neyfakh, A. A. (1988). Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Experimental Cell Research* 174, 168-176.
- Noble, P. B. (1970). Coelomocyte aggregation in *Cucumaria frondosa*: effect of ethylenediaminetetraacetate, adenosine, and adenosine nucleotides. *Biological Bulletin* 139, 549-556.
- Oliveira Ribeiro, C. A., Padros, J., Valdez Domingos, F. X., Akaishi, F. M. et Pelletier, É. (2007). Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin on benzo[a]pyrene toxicity in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Science of The Total Environment* 372, 549-553.
- Pace, D. A. et Manahan, D. T. (2006). Fixed metabolic costs for highly variable rates of protein synthesis in sea urchin embryos and larvae. *Journal of Experimental Biology* 209, 158-170.
- Padros, J., Pelletier, É. et Oliveira Ribeiro, C. (2003). Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long term in vivo study. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 45-55.
- Pain, S. et 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, 1258-1263.
- Parent, G. J., Pernet, F., Tremblay, R., Sevigny, J.-M. et Ouellette, M. (2008). Remodeling of membrane lipids in gills of adult hard clam *Mercenaria mercenaria* during declining temperature. *Aquatic Biology* 3, 101-101-109.
- Parrish, C. C., Yang, Z., Lau, A. et Thompson, R. J. (1996). Lipid composition of *Yoldia hyperborea* (Protobranchia), *Nephtys ciliata* (Nephtyidae) and *Artacama proboscidea* (Terebellidae) living at sub-zero temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 114, 59-67.
- Peck, L. S. (2002). Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life *Polar Biology* 25, 31-40.
- Pelletier, É., Campbell, P. G. C. et Denizeau, F. (2004). "Écotoxicologie Moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement." Presses de l'Université du Québec. ,

Pérez-Tomas, R. (2006). Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current Medicinal Chemistry* 13, 1859-1876.

Pernet, F. et Tremblay, R. (2004). Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Plactopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310, 73-86.

Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L. et Guderley, H. (2007). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* 210, 2999-3014.

Pernet, F., Tremblay, R., Gionet, C. et Landry, T. (2006). Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *The Journal of Experimental Biology* 209, 4663-4675.

Peters, Z. J., Nykamp, J. A., Passaperuma, K., Carlson, J. C., DeWitt-Orr, S. J., Greenberg, B. M. et Bols, N. C. (2007). Effect of copper on the cytotoxicity of phenanthrene and 9,10-phenanthrenequinone to the human placental cell line, JEG-3. . *Reproductive Toxicology* 23, 513-520.

Pinsino, A., Sammarini, V., Bonaventura, R., Amato, E. et Matranga, V. (2008). Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell Biology and Toxicology* 24, 541-552.

Pirini, M., Manuzzi, M. P., Pagliarani, A., Trombetti, F., Borgatti, A. R. et Ventrella, V. (2007). Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 616-626.

Rasmussen, T. H., Nielsen, F., Andersen, H. R., Nielsen, J. B., Weihe, P. et Grandjean, P. (2003). Assessment of xenoestrogenic exposure by a biomarker approach : application of the E-screen bioassay to determine estrogenic response of serum extracts. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 2, 1-14.

Reungpatthanaphong, P., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Loetchutinat, C. et Mankhetkorn, S. (2003). Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and mitochondrial membrane potential in drug-sentistive and -resistant cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 57, 1-16.

Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J. et Ling, V. (1985). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316, 817-819.

Risé, P., Eligini, S., Ghezzi, S., Colli, S. et Galli, C. L. (2007). Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of fatty acid status in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 76, 363-369.

Rodriguez, G. J., Solaun, O., Larreta, J., Belzunce Segarra, M. J., Franco, J., García Alonso, J. I., Sariego, C., Valencia, V. et Borja, Á. (2010). Baseline of butyltin pollution in coastal sediments within the Basque Country (northern Spain), in 2007–2008. *Marine Pollution Bulletin* 60, 139-151.

Roepke, T. A., Hamdoun, A. M. et Cherr, G. N. (2006). Increase in multidrug transport activity is associated with oocyte maturation in sea stars. *Development, Growth and Differentiation* 48, 559-573.

Romsicki, Y. et Sharom, F. J. (1999). The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* 38, 6887-6896.

Rouleau, C., Pelletier, E. et Tjalve, H. (1995). Distribution kinetics of trophic single doses of methylmercury, tributyltin, and corresponding inorganic-ions in the starfish *Leptasterias polaris*. *Marine Ecology-Progress Series* 124, 143-158.

Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. et Komano, T. (1993). Human P-glycoprotein transport cyclosporin A and FK506. *Journal of Biological Chemistry* 268, 6077-6080.

Sargent, J. R., Falk-Petersen, I. B. et Calder, A. G. (1983). Fatty acid composition of neutral glycerides from the ovaries of asteroids *Ctenodiscus crispatus*, *Asterias lincki* and *Pteraster militaris* from Balsfjorden, northern Norway. *Marine Biology* 72, 357-364.

Sargian, P., Pelletier, É., Mostajir, B., Ferreyra, G. et Demers, S. (2005). TBT toxicity on a natural planktonic assemblage exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Aquatic Toxicology* 73, 299-314.

Sarkadi, B., Price, E. M., Boucher, R. C., Germann, U. A. et Scarborough, G. A. (1992). Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 4854-8.

Sauerborn Klobucar, R., Zaja, R., Franjevic, D., Brozovic, A. et Smital, T. (2010). Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and MRP transcripts and proteins in cyprinid fish. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 61, 175-182.

Sauerborn, R., Stupin Polancec, D., Zaja, R. et Smital, T. (2004). Identification of the multidrug resistance-associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Environmental Research* 58, 199-204.

Savard, K., Berthelot, Y., Auroy, A., Spear, P. A., Trottier, B. et Robidoux, P. Y. (2007). Effects of HMX - Lead mixtures on reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 351-358.

Schafer, S. et Kohler, A. (2009). Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine Environmental Research* 68, 128-136.

Scherer, C., Wiltshire, K. et Bickmeyer, U. (2008). Inhibition of multidrug resistance transporters in the diatom *Thalassiosira rotula* facilitates dye staining. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 100-103.

Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M. et Bols, N. C. (1998). Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127, 129-141.

Schröder, H. C., Badria, F., A., Ayyad, S. N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H. M. A., Kurelec, B. et Müller, W. E. G. (1998). Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5, 119-126.

Seguineau, C., Racotta, I. S., Palacios, E., Delaporte, M., Moal, J. et Soudant, P. (2011). The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular & Integrative Physiology* 160, 87-93.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. et Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68, 850-858.

Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L. et Epel, D. (2004). Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and

natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research* 552, 101-117.

Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K. E., Thomas, K. V. et Ahel, M. (2011). Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 844-851.

Smith, A. B. (2008). Deuterostomes in a twist: the origins of a radical new body plan. *Evolution & Development* 10, 493-503.

So, J. J., Hamel, J. F. et Mercier, A. (2010). Habitat utilisation, growth and predation of *Cucumaria frondosa*: implications for an emerging sea cucumber fishery. *Fisheries Management and Ecology* 17, 473-473-484.

Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., et al. (2006). The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.

Srivastava, S. K., Watkins, S. C., Schuetz, E. et Singh, S. V. (2002). Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Molecular Carcinogenesis* 33, 156-162.

St-Jean, S., Pelletier, É. et Courtenay, S. C. (2002). Very low levels of waterborne butyltins modulate hemocyte function in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 236, 155-161.

Starr, M., Himmelman, J. H. et Therriault, J. C. (1993). Environmental control of green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, spawning in the St. Lawrence Estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 894-894-901.

Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M. et Berger, W. (2006). Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Current Drug Targets* 7, 923-934.

Supino, R. (1995). MTT assays. In "Methods in Molecular Biology : *In vitro* Toxicity Testing Protocols" (S. O'Hare et C. K. Atterwill, Eds.), Vol. 43 pp. 137-149. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Svensson, S., Särngren, A. et Förlin, L. (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, 27-37.

Tamai, I. et Safa, A. R. (1990). Competitive interaction of cyclosporins with the vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant Cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 265, 16509-16513.

Titley-O'Neal, C. P., MacDonald, B. A., Pelletier, É., Saint-Louis, R. et Phillip, O. S. (2011). The Relationship between Imposex and Tributyltin (TBT) concentration in *Strombus gigas* from the British Virgin Islands. *Bulletin of Marine Science* 87, 421–435.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107.

Tsukazaki, M., Satsu, H., Mori, A., Sugita-Konishi, Y. et Shimizu, M. (2004). Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 315, 991-997.

Twentyman, P. R. et Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer* 56, 279-285.

van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Scheper, R. J., Sonneveld, P. et Wiemer, E. A. C. (2004). Efflux kinetics and intracellular distribution of daunorubicin are not affected by Major Vault Protein/Lung Resistance-related Protein (vault) expression. *Cancer research* 64, 4887-4892.

Viglino, L., Pelletier, É. et St.-Louis, R. (2004). Highly persistent butyltins in northern marine sediments: A long-term threat for the Saguenay Fjord (Canada). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2673-2681.

Vincent, B. (1990). The macrobenthic fauna of the St. Lawrence Estuary. In "Oceanography of a Large-Scale Estuarine System. The St. Lawrence." (M. El-Sabh et N. Silverberg, Eds.), Vol. 39. Springer-Verlag, Berlin.

Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W. E. G., Zahn, R. K. et Kurelec, B. (1995). Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research* 342, 113-123.

- Widdows, J. et Johnson, D. (1988). Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. *Marine Ecology Progress Series* 46, 113-121.
- Willingham, M. C., Cornwell, M. M., Cardarelli, C. O., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1986). Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells : effects of verapamil and other drugs. *Cancer research* 46, 5941-5946.
- Wu, C.-P., Klokouzas, A., Hladky, S. B., Ambudkar, S. V. et Barrand, M. A. (2005). Interactions of mefloquine with ABC proteins, MRP1 (ABCC1) and MRP4 (ABCC4) that are present in human red cell membranes. *Biochemical Pharmacology* 70, 500-510.
- Wu, Y.-q., Wang, C.-g., Wang, Y., Zhao, Y., Chen, Y.-x. et Zuo, Z.-h. (2007). Antioxidant responses to benzo[a]pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebasticus marmoratus*. *Journal of Environmental Sciences* 19 1129-1135.
- Wu, Y.-T., Kao, Y.-L., Lin, L.-C. et Tsai, T.-H. (2010). Effects of a P-glycoprotein modulator on the pharmacokinetics and distribution of free levobupivacaine and bupivacaine in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 396, 127-133.
- Xing, K., Yang, H. S. et Chen, M. Y. (2008). Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquatic Biology* 2, 85-92.
- Zaja, R., Caminada, D., Lončar, J., Fent, K. et Smital, T. (2008). Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227, 207-218.
- Zaja, R., Klobucar, G. I. V., Sauerborn Klobucar, R., Hackenberger, B. K. et Smital, T. (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: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 143, 103-112.
- Zaja, R., Loncar, J., Popovic, M. et Smital, T. (2011). First characterization of fish P-glycoprotein (abcb1) substrate specificity using determinations of its ATPase activity and calcein-AM assay with PLHC-1/dox cell line. *Aquatic Toxicology* 103, 53-62.
- Zaja, R., Sauerborn Klobucar, R. et Smital, T. (2007). Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* 81, 365-376.

