Neuroendocrinologie et neuroimmunologie chez un modèle invertébré, l'huître Crassostrea gigas

Arnaud Lacoste

▶ **To cite this version:**

Arnaud Lacoste. Neuroendocrinologie et neuroimmunologie chez un modèle invertébré, l'huître Crassostrea gigas. Neurobiologie. Paris 6, 2001. Français. NNT : . tel-01117505

HAL Id: tel-01117505

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117505

Submitted on 17 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie-Curie (Paris 6)

Spécialité : Océanologie Biologique et Environnement Marin

Présentée par

Arnaud LACOSTE

Pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de thèse :

Neuroendocrinologie et neuroimmunologie du stress chez un modèle invertébré, l'huître *Crassostrea gigas*

Soutenue le 9 Mars 2001
Devant le jury composé de :

Dr Evelyne Bachère	Directeur de Recherche, Ifremer Montpellier	Rapporteur
Dr Antonio Figueras	Directeur de Recherche, Vigo, Espagne	Examinateur
Pr Steve Perry	Professeur à l'Université d'Ottawa, Canada	Rapporteur
Dr Richard Pipe	Directeur de Recherche, Plymouth, Angleterre	Examinateur
Dr Serge Poulet	Directeur de Recherche CNRS, Roscoff	Directeur de Thèse
Pr André Toulmond	Professeur à l'Université Paris 6	Examinateur

Cette thèse est dédiée à mes grands-parents maternels et à ma tante qui, lorsque j'étais enfant, ont éveillé et encouragé ma passion pour la biologie et pour ces mille créatures fantastiques qui peuplent les forêts, les plages et les étangs landais.
Cette thèse est aussi dédiée à mes parents.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique de Roscoff dans l'équipe Invertébrés Marins et Zooplancton.

Je remercie le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station Biologique.

Je remercie le Docteur Serge Poulet pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe IMZ, pour avoir toujours veillé à ce que je dispose de bonnes conditions de travail et pour ses conseils et son soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Merci aux autres membres de l'équipe, Anne Cueff, Fabienne Jalabert, Florence Gélébart, Anne Maubois, Shelagh Malham et Jean-Baptiste Marchand, pour leur soutien, leurs conseils et pour avoir entretenu une atmosphère chaleureuse au sein du groupe.

J'adresse de sincères remerciements à Nicole Guyard et Maryse Collin du Service de Documentation de la Station pour leur aide et la rapidité avec laquelle elles sont capables de dénicher les plus obscures publications. Je remercie aussi Olivier Collin et Claude Leroux du Service Informatique et le personnel du Service Administratif.

Je tiens à remercier le Conseil Régional de Bretagne, la Direction du Département du Finistère, Côtes d'Armor et Ille-et-Vilaine et la Section Régionale Conchylicole de Bretagne Nord qui ont financé une grande partie de ce travail.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, je remercie Marie-Cécile De Cian (mon petit coach personnel) pour son grand soutien au cours de cette thèse et pour son indulgence à chaque fois que, passée la porte d'entrée du labo, je pénètre dans un autre espace-temps. J'adresse aussi une pensée particulière aux étudiants et jeunes chercheurs de la Station qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à ce que cette thèse soit un moment agréable, Annabelle, Julia, Fabrice, Laurence, Stéphane, Stéphan, Florent, the Maries connection, Kamal, François-Yves, Florence *et al*...

RESUME

Chez les vertébrés, le système immunitaire et le système neuroendocrine communiquent de façon étroite grâce à diverses cytokines et hormones. Ce type de communication joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie, particulièrement lorsque l'animal fait face à une situation de stress. Afin d'améliorer nos connaissances concernant l'origine évolutive de ces mécanismes adaptatifs, nous avons étudié la neuroendocrinologie et de la neuroimmunologie du stress chez un modèle invertébré.

Notre modèle d'étude a été choisi parmi les mollusques parce que ces organismes possèdent un système immunitaire relativement simple et parce que leur système nerveux est assez bien caractérisé aux niveaux fonctionnel, cellulaire et moléculaire. Parmi les mollusques, nous avons choisi l'huître *Crassostrea gigas*, parce que ce bivalve présente un intérêt économique important et parce que les recherches concernant la physiologie du stress chez l'huître sont applicables en aquaculture.

Nous avons pu déterminer que l'huître possède une forme primitive de réponse neuroendocrine au stress. En effet, deux catécholamines, la noradrénaline et la dopamine, sont libérées dans l'hémolymphe lorsque l'animal se trouve en situation de stress.

Les cellules responsables de la sécrétion de catécholamines chez l'huître présentent des similitudes morphologiques, biochimiques et fonctionnelles avec les cellules chromaffines de vertébrés. De plus, les cellules chromaffines d'huîtres peuvent se différencier en cellules nerveuses, comme chez les vertébrés, ou en phagocytes apparentés aux cellules gliales.

La noradrénaline produite par les cellules chromaffines contrôle certaines fonctions immunitaires (production d'espèces oxygénées réactives, phagocytose). Cette hormone peut aussi déclencher des mécanismes d'apoptose et/ou l'expression de gènes de protéines de stress (*hsp70*) au sein des immunocytes d'huîtres. Ces mécanismes impliquent des récepteurs α et β-adrénergiques, des GTPases de la famille des protéines Ras (Rho), des MAP kinases et des caspases P35 sensibles.

Nous avons finalement pu montrer que le stress et la sécrétion de noradrenaline induite par le stress, modulent les capacités de résistance des huîtres à des pathogènes bactériens.

Ces résultats présentent un intérêt en termes de neuroendocrinologie et d'immunologie comparées et ils indiquent que des interactions neuroendocrino-immunitaires complexes existaient avant l'apparition des vertébrés. Ce travail apporte de nouvelles informations en ce qui concerne les mécanismes d'immunorégulation et les relations hôte-pathogène chez les mollusques. Enfin, ces informations, ainsi que les outils mis au point au cours de cette thèse, permettent de mieux comprendre comment apparaissent des pathologies en conchyliculture.

Neuroendocrinology and neuroimmunology of stress in an invertebrate model, the oyster *Crassostrea gigas*

ABSTRACT

In vertebrates, the immune and neuroendocrine systems communicate and interact via diverse cytokines and hormones. Thus, both systems constitute an integrated network allowing the organism to elicit neuroendocrine as well as immune responses to both cognitive and non-cognitive stimuli. This neuro-immune axis plays essential roles in the maintenance of homeostasis, particularly when the animal faces stressful situations. The present work aimed at providing further knowledge concerning the evolutionary origins of these adaptative mechanisms by studying neuroendocrinology and neuroimmunology of stress in an invertebrate model.

Our biological model was chosen among molluscs because these organisms possess a relatively simple immune system and because their nervous system is well characterised at the functional, cellular and molecular levels. Among molluscs, we focused on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* because this bivalve is of economical interest and because research on the physiology of stress in oysters can be directly applied in aquaculture.

We provide evidence that oysters possess a form of neuroendocrine response to stress. Indeed, two catecholamines, namely noradrenaline and dopamine, are released in the hemolymph when the animal encounters stressful situations.

Oyster catecholamine-secreting cells possess morphological, biochemical and functionnal characteristics of vertebrate chromaffin cells. Moreover, these cells exhibit a remarkable plasticity since they can transdifferentiate into either neuron-like or glial-like cells.

Noradrenaline produced by chromaffin cells modulate certain immune functions such as the production of reactive oxygen species and phagocytosis. This catecholamine can also trigger hemocyte apoptosis and/or upregulate the transcription of the heat stress protein 70 (*hsp70*) gene in immune cells. These mechanisms involve α and β-adrenergic receptors, GTPases of the Ras family such as Rho, MAP kinases and P35-sensitive caspases.

Finally, we found that stress and stress-induced noradrenaline secretion modulate oyster resistence to bacterial pathogens.

These results are of interest in terms of comparative neuroendocrinology and neuroimmunology because they point out the existence of complex neuro-immune interactions that preceded the emergence of vertebrates. In addition, this work provides further insights into immunoregulatory mechanisms and host-pathogen interactions in molluscs. Finally, information and tools provided by this research work help understanding how pathologies appear in cultured oyster stocks.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....7

SECTION I : NEUROENDOCRINOLOGIE ET NEUROIMMUNOLOGIE DU STRESS CHEZ LES ANIMAUX

CHAPITRE 1. Neuroendocrinologie du stress. 11

1.1. Le concept de stress. 11

1.1.1. Introduction.....11

1.1.2. Définition du stress et questions sémantiques.....11

1.1.3. Les facteurs de stress 12

1.1.4. La réponse au stress 13

1.2. La réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés. 16

1.2.1. L'axe hypothalamus-hypophyse-cellules stéroïdogènes.....16
A. Rôle de l'hypothalamus : sécrétion de CRH.....18
B. Rôle de l'hypophyse et des dérivés de la POMC.....20
C. Rôle de la glande cortico-surrénale : sécrétion de corticostéroïdes.....21

1.2.2. L'axe hypothalamus-système nerveux sympathique-cellules chromaffines.....24
A. Les cellules chromaffines.....27
B. Contrôle de la sécrétion de catécholamines.....28
a. Contrôle cholinergique.....28
b. Contrôle non-cholinergique. 28
C. Récepteurs et fonctions des catécholamines au cours de la réponse au stress.....31

1.3. Les hormones de stress chez les invertébrés. 34

1.3.1. Présence de CRH chez les invertébrés. 35

1.3.2. Opioïdes, ACTH et autres dérivés de la POMC chez les invertébrés. 36

1.3.3. Cortisol et corticostérone chez les invertébrés. 37

1.3.4. Les catécholamines chez les invertébrés. 37

1.3.5. La réponse neuroendocrine au stress chez les invertébrés : faits et hypothèses. 38

CHAPITRE 2. Interactions entre le système neuroendocrine et le système immunitaire. Neuroimmunologie du stress.....40

2.1. Neuroimmunologie du stress chez les vertébrés. 40

2.1.1. Principales composantes du système immunitaire des vertébrés. 40

2.1.2. Actions du système neuroendocrine sur le système immunitaire.....43
A. Effets de la CRH. 45
B. Effets de l'ACTH et d'autres dérivés de la POMC. 45
C. Effets du cortisol et de la corticostérone. 46
D. Effets des catécholamines. 47
E. Effets du stress sur le système immunitaire : inhibition ou activation?.....48

2.1.3. Actions du système immunitaire sur le système neuroendocrine. 49
A. Libération de neuropeptides par les cellules immunitaires. 49
B. Action des cytokines sur le système neuroendocrine. 51
2.1.4. Communication bi-directionnelle entre le système neuroendocrine et le système immunitaire. 52
2.2. Cas des invertébrés. 54
2.2.1. Principales composantes du système immunitaire des invertébrés. 54
A. Reconnaissance du non-soi. 54
B. Les effecteurs de la réaction immunitaire 56
C. Les cytokines chez les invertébrés 59
2.2.2. Neuroimmunologie du stress chez les invertébrés. 60
A. Effet des "hormones de stress" sur le système immunitaire. 60
B. Effets des cytokines sur la production "d'hormones de stress" 62
CONCLUSION 64

SECTION II : NEUROENDOCRINOLOGIE ET NEUROIMMUNOLOGIE DU STRESS CHEZ L'HUÎTRE

PARTIE I. LA RÉPONSE NEUROENDOCRINE AU STRESS CHEZ L'HUÎTRE 67

Chapitre 1. Mise en évidence d'une réponse catécholaminergique au stress chez l'huître 68

1.1. Régulation de la réponse catécholaminergique au stress chez l'huître 70
Publication n°1 71
1.2. Réponse catécholaminergique à divers types de facteurs de stress 98
Publication n°2 99

Chapitre 2. Propriétés particulières des cellules chromaffines d'huîtres *in vitro* 122

Publication n°3 124

PARTIE II. EFFETS DE LA NORADRÉNALINE SUR LES FONCTIONS IMMUNITAIRES DE L'HUÎTRE 139

Chapitre 1. Effets de la noradrénaline sur la production d'espèces oxygénées réactives 141

1.1. Effets de la noradrénaline seule 142
Publication n°4 143
1.2. Effets conjugués de la noradrénaline et du pouvoir immunostimulant de l'interleukine-1 157
Publication n°5 158

Chapitre 2. Effets de la noradrénaline sur l'activité de phagocytose des hémocytes 181

Publication n°6 182

Chapitre 3. Noradrénaline et apoptose chez les hémocytes d'huîtres 206

Publication n°7 208

Chapitre 4. Noradrénaline et transcription du gène de la protéine de stress hsp 70 236
Publication n°8.....237

PARTIE III. CONSÉQUENCES DU STRESS SUR LES RELATIONS HUÎTRE-PATHOGÈNE. 266

Chapitre 1. Utilisation d'indicateurs de stress et isolement d'un pathogène bactérien chez l'huître 269
Publication n°9.....270

Chapitre 2. Influence du stress et des hormones de stress sur la résistance de l'huître à un pathogène bactérien 295
Publication n°10.....296

SECTION III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Existence d'une réponse neuroendocrine au stress chez l'huître. 313

2. Les catécholamines en tant qu'indicateurs de stress.....315

3. Mise en évidence de nouveaux mécanismes d'immunorégulation chez les mollusques 317

3.1. Récepteurs adrénergiques et voies de transduction du signal 317
3.2. Hypothèses concernant l'existence de sous-populations hémocytaires. 318

4. Stress, catécholamines et pathologie 320

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....326

INTRODUCTION

Les invertébrés constituent environ 94 % des espèces animales connues (Barnes, 1987). On estime que la moitié des espèces d'invertébrés ont été décrites, ce qui représente à peu près un million d'espèces (Barnes, 1987). Le phylum des arthropodes contient le plus grand nombre d'espèces, immédiatement suivi par le phylum des mollusques dont 50 000 espèces vivantes ont été décrites et 60 000 espèces fossiles sont connues (Brusca et Brusca, 1990). Quelques-uns de ces mollusques font l'objet de recherches scientifiques parce qu'ils posent des problèmes de santé humaine (par exemple, mollusques vecteurs de pathogènes des genres *Schistosoma* ou *Cryptosporidium*, de bactéries pathogènes des genres *Salmonella* et *Vibrio*, de virus entériques ou du virus de l'hépatite A), parce qu'ils représentent des modèles biologiques relativement simples et adaptés à certaines formes d'approches expérimentales (en neurobiologie, par exemple) ou parce qu'ils présentent un intérêt économique important (cas des espèces utilisées en alimentation humaine).

Parmi les mollusques cultivés, l'huître représente le groupe dominant et constitue une importante source de protéines dans de nombreuses régions du globe. La majeure partie de la production ostréicole mondiale (3 millions de tonnes par an selon les dernières estimations de la FAO, 1996) est assurée par la Chine (2,28 millions de tonnes) suivie du Japon (0,22 millions de tonnes annuels), de la Corée (0,19 millions de tonnes) et de la France (0,15 millions de tonnes). Environ 98 % des huîtres produites appartiennent au genre *Crassostrea* et au sein de ce genre, 85 % de la production concernent *C. gigas* et 12 % *C. virginica*.

La culture des huîtres est principalement de type extensif et connaît une expansion importante depuis deux à trois décennies. Cette expansion est cependant ralentie par l'apparition de maladies infectieuses causées par divers virus, bactéries ou protozoaires. Ces pathologies sont responsables de pertes économiques considérables dans de nombreuses

régions (Roch, 1999) et ont amené les différents pays producteurs à prendre des mesures zoosanitaires, à règlementer les déplacements de stocks entre zones d'élevage et à développer des axes de recherches en physiologie, pathologie, immunologie et génétique des mollusques. Ces recherches ont pour but de mettre au point des techniques de détection de pathogènes et des outils permettant d'évaluer l'état physiologique et la capacité de résistance des mollusques. L'objectif final étant de prévenir ou d'enrayer les pathologies et de mettre au point des protocoles de sélection d'individus résistants.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans ces thématiques de recherche. Ils sont nés d'une collaboration entre ostréiculteurs Bretons et chercheurs de l'équipe Invertébrés Marins et Zooplancton de la Station Biologique de Roscoff.

La profession ostréicole bretonne fait face, depuis le milieu des années 80, à des mortalités estivales importantes affectant les stocks d'huîtres "juvéniles" (*i.e.* âgées de moins de 12 mois). En Bretagne, ces mortalités sont estimées systématiquement depuis 1994 par les services de l'Ifremer. En Baie de Morlaix, ce type de mortalité affecte chaque année entre 25 et 50% des stocks d'huîtres *Crassostrea gigas* âgées de moins de 12 mois (certains ostréiculteurs rapportent 80% de pertes) et engendrent des pertes économiques importantes. Des équipes de recherche tentent de résoudre ce problème en développant des approches de pathologistes ou en recherchant des outils permettant d'évaluer l'état immunitaire des mollusques. Nous avons choisi d'aborder le problème sous un angle complémentaire en recherchant notamment des outils permettant d'évaluer l'état physiologique et l'état de stress des mollusques.

La **première section** de cette thèse passe en revue les connaissances concernant le stress et la physiologie du stress chez les animaux.

La **deuxième section**, subdivisée en trois parties, présente nos travaux sous la forme de publications. La première partie est consacrée à la réponse neuroendocrine au stress chez

l'huître. Nous montrons que le stress provoque une augmentation des concentrations de dopamine et de noradrénaline dans l'hémolymphe des huîtres et nous mettons en évidence certains acteurs cellulaires et moléculaires de cette forme de réponse neuroendocrine au stress.

Dans la seconde partie, nous examinons l'influence de la noradrénaline sur la réponse immunitaire de l'huître. Nous montrons que les hémocytes d'huîtres possèdent des récepteurs de type α et β adrénergiques permettant à la noradrénaline de moduler certaines réactions de défense telles que la phagocytose et la production d'espèces oxygénées réactives. Nos résultats indiquent que la noradrénaline peut aussi provoquer un processus d'apoptose ou une réponse cellulaire au stress (expression du gène de "heat shock protein 70") chez les hémocytes d'huîtres.

Dans la troisième partie de cette section, nous examinons les conséquences du stress et des hormones de stress sur les relations huîtres-pathogènes.

Une **troisième section**, intitulée "discussion et conclusions et perspectives", synthétise l'ensemble de nos résultats. Elle présente les axes de recherche pouvant être envisagés à la suite de ce travail et indique comment l'industrie conchylicole pourrait en bénéficier.

SECTION I : NEUROENDOCRINOLOGIE ET NEUROIMMUNOLOGIE DU STRESS CHEZ LES ANIMAUX

CHAPITRE 1. Neuroendocrinologie du stress.

1.1. Le concept de stress.

1.1.1. Introduction

Le concept de stress à été formulé au cours de la première moitié du 20è siècle par Cannon (sous le terme "fight or flight response") et Selye (sous le terme de "general adaptation syndrome"). Les psychologues furent pratiquement les seuls scientifiques intéressés par les travaux de Selye jusqu'à ce que, relativement récemment, l'avancée des découvertes en neuroendocrinologie et en immunologie (découverte des cytokines, notamment) permît de décrire l'état de stress en termes physiologiques et d'aborder ses mécanismes par des méthodes expérimentales.

Au cours des deux dernières décennies, le nombre d'études portant sur la physiologie du stress chez les animaux a augmenté de manière considérable. Ceci est lié, d'une part, au fait qu'un nombre croissant de disciplines s'intéressent au stress (psychologie, physiologie, immunologie, endocrinologie, neurobiologie, pathologie, éthologie, écologie, toxicologie) et, d'autre part, au fait que le concept de stress peut être appliqué à tous les niveaux d'organisation, depuis l'écosystème jusqu'à la molécule.

1.1.2. Définition du stress et questions sémantiques.

La survie de tout organisme nécessite qu'un état d'équilibre physiologique soit maintenu en toutes circonstances. Cette notion d'état d'équilibre physiologique fut établie par Claude Bernard au 19è siècle (Bernard, 1865) puis, au début du 20è siècle, Walter Cannon (1935) introduisit le terme "**homéostasie**".

Cet état d'équilibre est sans cesse menacé par diverses perturbations intrinsèques à l'organisme ou provenant de son environnement. Empruntant aux physiciens, Selye (1936) introduisit le terme "**stress**" pour désigner l'état dans lequel se trouve un organisme lorsqu'il fait face à des forces menaçant son intégrité. Ce terme s'avéra cependant ambigu puisqu'il peut désigner à la fois les stimuli s'appliquant à un organisme et la réponse de l'organisme à ces stimuli. En 1973, Selye créa alors le néologisme "stressor" (ce terme sera traduit ici par "**facteur de stress**") qui désigne les perturbations appliquées à un organisme, et il introduisit la notion de "**réponse au stress**" ("stress response"), qui désigne un vaste ensemble de réactions comportementales ou physiologiques visant à maintenir l'homéostasie. *Le stress est donc aujourd'hui considéré comme un état de déséquilibre physiologique provoqué par un facteur de stress et déclenchant une réponse au stress*.

Bien que, dans certaines conditions, la frontière entre ces trois notions demeure assez floue, nous essaierons, dans la suite de ce document, de rester cohérents avec ces définitions.

1.1.3. Les facteurs de stress

On considère aujourd'hui que les facteurs de stress se répartissent en deux groupes : le groupe des "stimuli cognitifs" et celui des "stimuli non-cognitifs".

Les **stimuli cognitifs** sont des facteurs de stress perceptibles par les organes des sens. Ils sont de nature abiotique (qualité de l'air ou de l'eau : température, quantité d'oxygène, salinité, présence de polluants, pratiques agricoles ou aquacoles) ou biotique (quantité ou qualité de nourriture, compétition, présence de prédateurs, surpopulation).

La notion de **stimulus non-cognitif** a été introduite par Blalock en 1984 dans un article intitulé "*The immune system as a sensory organ*". Soulignant que le système immunitaire et le système neuroendocrine sécrètent un ensemble de molécules identiques et répondent à des messagers communs (neuropeptides, catécholamines et cytokines notamment;

voir chapitre 2 de cette section), Blalock propose que le système immunitaire peut assurer une fonction d'organe sensoriel réagissant à des facteurs de stress qui ne sont pas perçus par les organes des sens classiques. En effet, les cellules immunitaires reconnaissent divers antigènes (virus, bactéries, protozoaires) qui menacent l'intégrité de l'organisme mais ne sont pas détectés par les organes des sens ou le système nerveux. Cette information est alors transmise au système neuroendocrine via des messagers hormonaux sécrétés par les cellules immunitaires ce qui déclenche une réponse au stress.

1.1.4. La réponse au stress

Selye (1936) fut le premier à proposer une véritable théorie concernant le stress et ses effets sur l'organisme. Il remarqua que des perturbations différentes provoquaient un certain nombre de réponses similaires chez les animaux. D'après lui, ces réponses constituaient la base de ce qu'il appela le Syndrome Général d'Adaptation (**General Adaptation Syndrome** ou GAS, Selye, 1950). Le GAS comprend trois étapes. Une *phase d'alarme* ou phase initiale de la réponse, suivie par une *phase de résistance* au cours de laquelle l'organisme essaie de s'adapter à la perturbation et de rétablir l'homéostasie. Si l'organisme ne parvient pas à rétablir un équilibre, il entre dans une *phase d'épuisement*, qui peut conduire à l'apparition de diverses pathologies ou à la mort (Selye, 1973). La théorie du GAS considère que la réponse au stress est non-spécifique et ne dépend pas de la nature du facteur de stress. Ceci fut l'objet de nombreuses critiques (Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1997) et bien que certains aspects de cette théorie constituent encore aujourd'hui une base permettant d'aborder le concept de stress, elle est considérée comme obsolète.

Sous le terme de "réponse au stress", on désigne aujourd'hui un ensemble de réactions comportementales et physiologiques (Tableau 1) permettant de maintenir l'homéostasie de

l'organisme face à une situation défavorable (Chrousos et Gold, 1992). Les réactions comportementales ont pour but de stimuler l'attention, la vigilance, voire l'agressivité de

Adaptations comportementales
Activation des comportements adaptatifs:
Etat d'excitation et/ou d'aggressivité accru
Vigilance accrue
Attention focalisée sur le facteur de stress
Inhibition des comportements non-immédiatement nécessaires
Suppression des comportements liés à la prise de nourriture
Suppression des comportements liés à la reproduction
Adaptations physiologiques
Réponse neuroendocrine
Sécrétion de neuropeptides, de corticostéroïdes et de catécholamines
Redirection des substrats vitaux:
Acheminement de l'oxygène et des nutriments vers le système nerveux central, certains muscles et les parties lésées de l'organisme
Augmentation de la fréquence cardiaque
Augmentation de la fréquence respiratoire
Stimulation de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse et de la lipolyse
Inhibition du système reproducteur
Inhibition de la croissance

Tableau 1. Principales adaptations comportementales et physiologiques durant la réponse au stress chez les vertébrés (modifié d'après Chrousos, 1992).

l'animal. Les réactions physiologiques servent à rediriger l'énergie vers le système nerveux central, certains muscles et les parties éventuellement lésées de l'organisme de façon à faciliter son adaptation. Au cours de la réponse au stress, on assiste notamment à une augmentation de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire, de la pression sanguine, de la lipolyse, de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse de façon à augmenter les quantités circulantes de substrats vitaux (oxygène et glucose notamment). Les fonctions physiologiques qui ne sont pas immédiatement nécessaires (croissance, reproduction, certaines fonctions immunitaires) sont inhibées (Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997; Perry et Gilmour, 1999; Steffens et de Boer, 1999; Pottinger, 1999).

La capacité d'un organisme à s'adapter à une perturbation ne dépend pas uniquement de la rapidité et de l'efficacité avec lesquelles il met en place une réponse de stress. Elle dépend aussi en grande partie de sa capacité à générer une contre-réaction qui le protège d'une réponse au stress disproportionnée. En absence de contre-réaction, la réponse au stress perd ses propriétés adaptatives et contribue à l'apparition de troubles pathologiques. Chez l'homme par exemple, une absence d'inhibition de la réponse au stress peut engendrer une anxiété chronique, une dépression, des troubles obsessionnels compulsifs, une anorexie nerveuse ou la recherche obsessionnelle d'alcool ou de narcotiques (Chrousos, 1992).

Nous verrons, dans les paragraphes suivants que la réponse physiologique au stress débute par une activation du système neuroendocrine (sécrétion de neuropeptides, catécholamines et glucocorticoïdes) qui influence diverses fonctions physiologiques à l'échelle de l'organisme entier.

1.2. La réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés.

La réponse neuroendocrine au stress présente de nombreuses similitudes chez tous les vertébrés. De nombreuses hormones sont impliquées dans ce processus et la réponse du système neuroendocrine diffère selon le type de facteur de stress considéré. Cependant, il est communément admis que les glucocorticoïdes et les catécholamines jouent un rôle dominant dans la réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés. Ces hormones sont les messagers majeurs de deux principaux axes neuroendocrines sollicités au cours de la réponse au stress (Figure 1) : l'**axe hypothalamus-hypophyse-cellules stéroïdogènes** et l'**axe hypothalamus-système nerveux sympathique-cellules chromaffines** (Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997). Dans la suite de cette première section, nous nous intéresserons plus particulièrement aux hormones impliquées dans la réponse au stress. Pour cette raison, plusieurs hormones sécrétées notamment par l'hypothalamus et l'hypophyse seront mentionnées mais, afin de rester concis, leurs mécanismes d'action ne seront pas détaillés.

1.2.1. L'axe hypothalamus-hypophyse-cellules stéroïdogènes

Cet axe neuroendocrine aboutit à la sécrétion de **glucocorticoïdes** (cortisol et corticostérone, notamment) via une cascade hormonale impliquant principalement la **CRH** ("corticotropin-releasing hormone" aussi appelée "corticotropin-releasing factor", CRF) et l'**ACTH** ("adrenocorticotropic hormone" aussi appelée adrénocorticotropine). CRH et ACTH sont sécrétées par l'une des principales structures endocrines du cerveau, le complexe hypothalamo-hypophysaire.

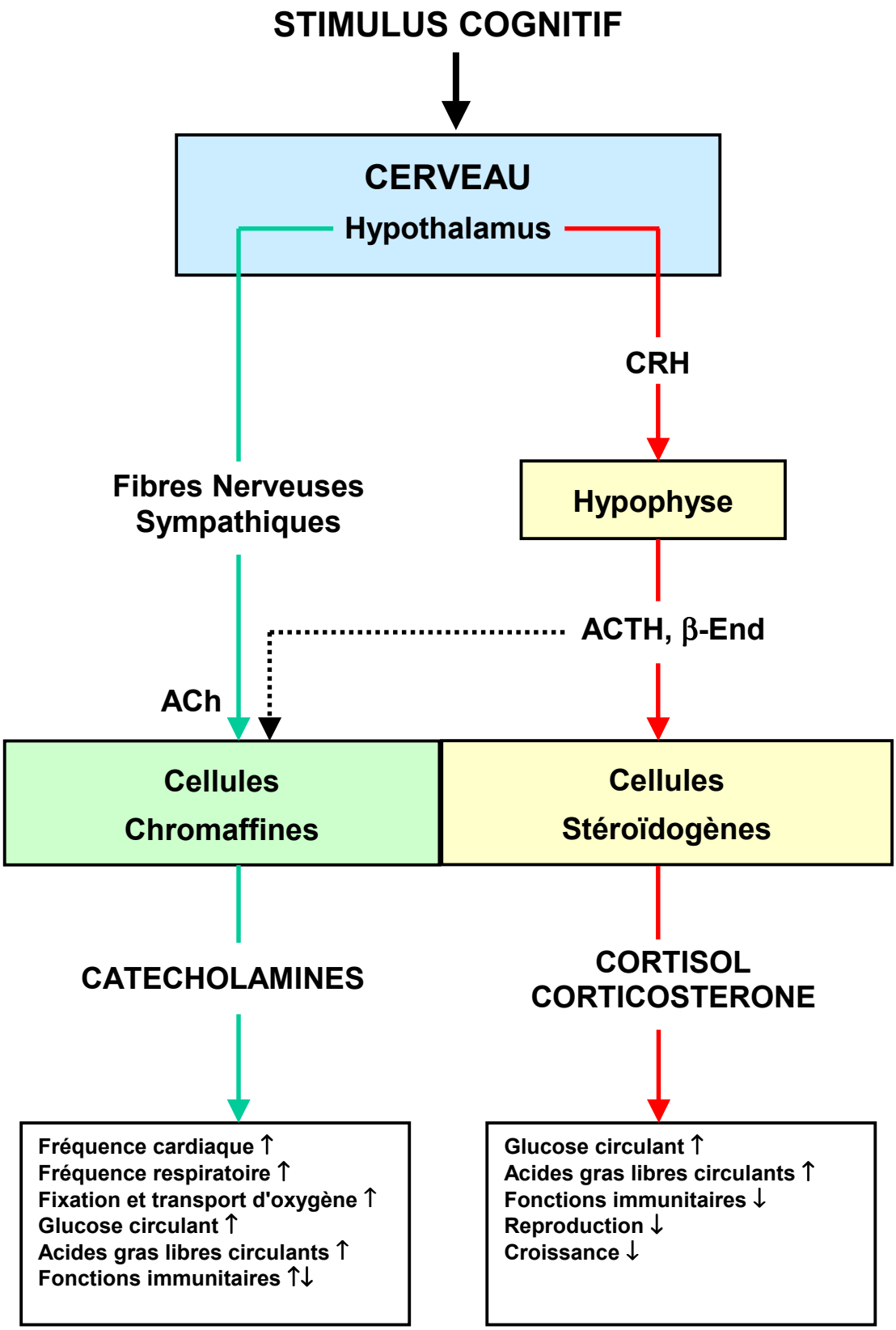

Figure 1. Représentation schématique des deux principaux axes neuroendocrines de réponse au stress : l'axe hypothalamus-hypophyse-cellules stéroïdogènes et l'axe hypothalamus-système nerveux sympathique-cellules chromaffines.
CRH, "corticotropin releasing hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone", β-End, β-endorphine; ACh, acétylcholine; ↑, activation; ↓, inhibition.

A. Rôle de l'hypothalamus : sécrétion de CRH.

L'hypothalamus se trouve à la base du cerveau de tous les vertébrés (Figure 2). Il se divise en une série de noyaux (aggrégations de neurones) ou parviennent des informations provenant de toutes les régions du cerveau. Ces informations sont initialement générées par les organes des sens en réponse à des stimuli externes ou internes. L'hypothalamus traite et coordonne ces informations avant de les transmettre à l'hypophyse par voie nerveuse ou humorale. Parmi les substances humorales sécrétées par l'hypothalamus, se trouvent des amines biogènes telles que la dopamine et des peptides tels que la TRH ("thyrotropin-releasing hormone" ou thyréolibérine), la GnRH (gonadolibérine ou "gonadotropin-releasing hormone" aussi appelée "luteinizing hormone-releasing hormone" ou LHRH), la somatostatine, la bradykinine, l'angiotensine, la vasotocine, la substance P, le neuropeptide Y, le peptide YY ou encore la **CRH**. Ces substances activent ou inhibent de façon directe ou indirecte les fonctions hypophysaires.

La sécrétion de CRH est considérée comme l'un des principaux composants de la réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés (Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997). Ce peptide a été isolé et caractérisé à partir d'extraits d'hypothalamus d'ovins (Vale *et al.*, 1981; Spiess *et al.*, 1981; Rivier *et al.*, 1982) mais, chez les mammifères, il est aussi présent dans divers autres tissus tels que le pancréas (Petrusz *et al.*, 1983), le tissus stomacal, le duodénum, les poumons, le foie et les glandes surrénales (Suda *et al.*, 1984). Des substances CRH-like sont aussi présentes dans le tissu nerveux des élasmobranches (Vallarino *et al.*, 1989), des téléostéens (Olivereau *et al.*, 1984, 1988; Yulis *et al.*, 1986), des amphibiens (Tonon *et al.*, 1985) et des oiseaux (Panzica *et al.*, 1986). Le pancréas des poissons, des amphibiens, des reptiles et des oiseaux contient aussi de la CRH (Petrusz *et al.*, 1983).

La CRH est le principal régulateur de la sécrétion d'ACTH et autres dérivés de la proopiomélanocortine (POMC) par l'hypophyse.

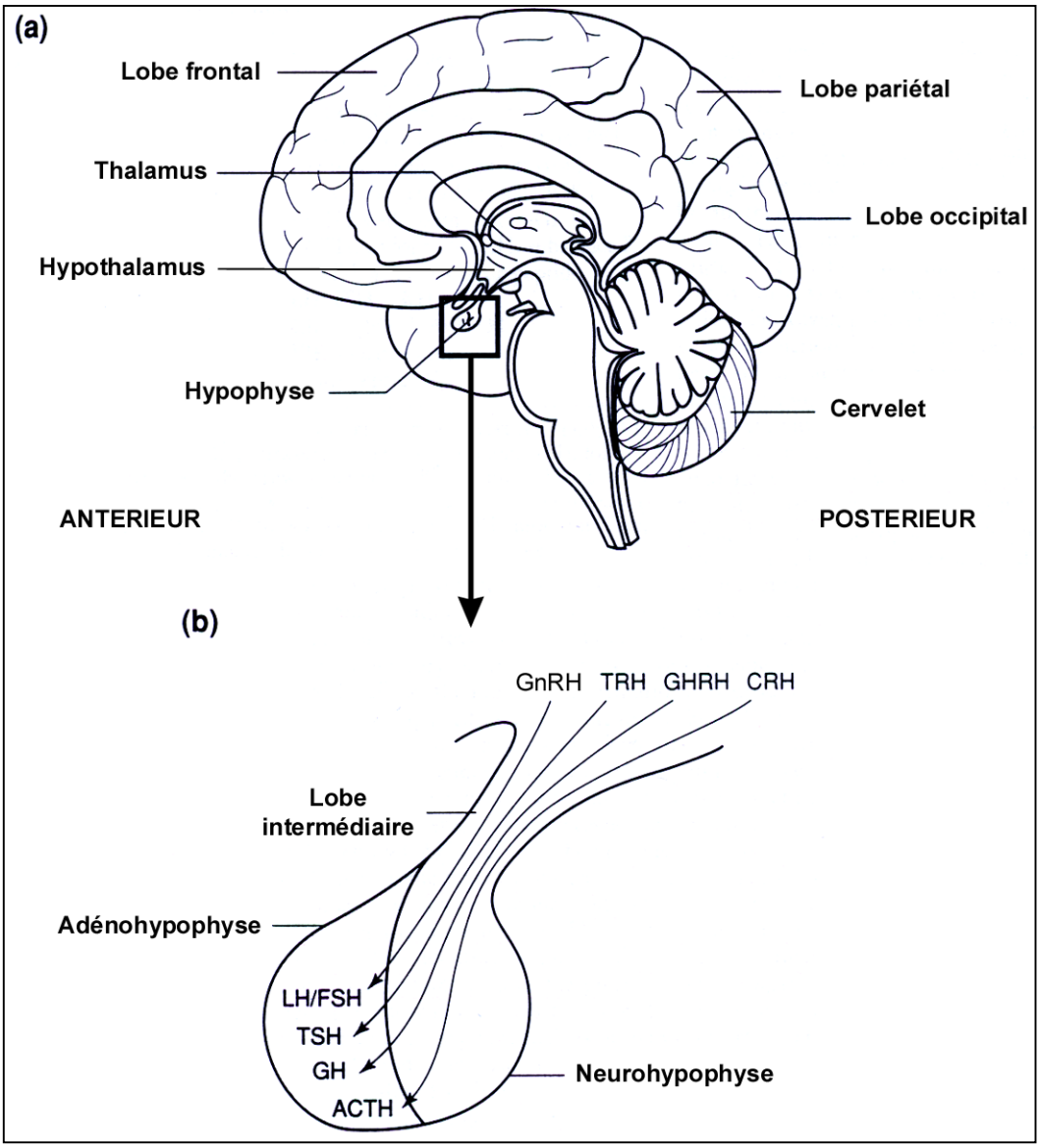

Figure 2. Représentation schématique du cerveau (a) et du complexe hypothalamo-hypophysaire (b) humains.
Facteurs hypothalamiques: GnRH, "gonadotropin-releasing hormone"; TRH, "thyrotropin-releasing hormone"; GHRH, "growth-hormone-releasing hormone"; CRH, "corticotropin-releasing hormone".
Hormones hypophysaires: LH, "luteinizing hormone"; FSH, "follicle-stimulating hormone"; TSH, "thyroid-stimulating hormone"; GH, "growth hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone".
(modifié d'après Blalock, 1994).

B. Rôle de l'hypophyse et des dérivés de la POMC.

L'hypophyse est formée de plusieurs tissus d'origines embryologiques distinctes. Le lobe antérieur ou **adénohypophyse** est principalement constitué de cellules dérivées de l'épithelium buccal. Le lobe postérieur ou **neurohypophyse** est constitué de terminaisons nerveuses issues des différents noyaux de l'hypothalamus. Le lobe intermédiaire contient à la fois des cellules nerveuses et des cellules dérivées de l'épithélium buccal (Figure 2).

L'adénohypophyse est très largement irriguée par un système de vaisseaux sanguins véhiculant les substances humorales émises par l'hypothalamus. Ces substances (activatrices ou inhibitrices) contrôlent la croissance des cellules hypophysaires, les échanges sanguins au sein du complexe hypothalamo-hypophysaire ou la sécrétion de diverses hormones par les cellules sécrétrices de l'hypophyse.

Les hormones hypophysaires peuvent être classées en quatre familles (Henderson, 1997) :

1. La famille des somatomammotropines incluant la prolactine et l'hormone de croissance. Ces hormones sont produites par l'adénohypophyse.

2. La famille des hormones hypophysaires glycoprotéiques incluant notamment la TSH ("thyroid-stimulating hormone") et des gonadotropines telles que la FSH ("follicle-stimulating hormone") et la LH ("luteinizing hormone"). La sécrétion de FSH et de LH est en grande partie contrôlée par la GnRH, un peptide très conservé au cours de l'évolution (Henderson, 1997) et sécrété par l'hypothalamus ainsi que par certains tissus des gonades.

3. La MCH ("melanocyte-concentrating hormone, aussi appelée "melanin-concentrating hormone" ou encore "melanophore-concentrating hormone").

4. Les dérivés de la POMC et autres opioïdes. Cette famille comprend l'ACTH, l'α et la β-MSH ("melanocyte stimulating hormone") ou la mélanotropine, la β-lipotropine, des endorphines, des enképhalines et de petits fragments bioactifs de la POMC et de certains de

ses dérivés (Figure 3). Plusieurs peptides de cette famille ont été séquencés chez divers vertébrés. Leurs séquences en acides aminés ont été très conservées au cours de l'évolution (Ottaviani et Franceschi, 1996; Henderson, 1997; Stefano et Salzet, 1999).

L'ACTH, comme les autres peptides opioïdes, est produite dans le lobe antérieur et le lobe intermédiaire de l'hypophyse par maturation post-traductionnelle de la POMC (Henderson, 1997, Stefano et Salzet, 1999). Cette hormone est cependant présente dans divers autres tissus tels que le système nerveux central (Emson *et al.*, 1984), les gonades (Margioris *et al.*, 1983), le pancréas et le tissu gastro-intestinal (Sanchez-Franco *et al.*, 1981) et la glande thyroïde (Clements *et al.*, 1982). Nous verrons dans le chapitre 2 de cette section que l'ACTH est aussi produite par les cellules du système immunitaire chez les poissons, les amphibiens, les reptiles et les mammifères (Ottaviani et Franceschi, 1996).

La sécrétion d'ACTH par l'hypophyse est principalement activée par la CRH libérée par l'hypothalamus. D'autres hormones hypothalamiques telles que la vasotocine ou le neuropeptide Y pourraient aussi stimuler la sécrétion d'ACTH (Henderson, 1997; Wendelaar-Bonga, 1997).

La sécrétion d'ACTH est activée au cours de la réponse au stress et stimule la libération de cortisol ou de corticostérone par les cellules stéroïdogènes (Ottaviani et Franceschi, 1996; Henderson, 1997). L'ACTH stimule aussi la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines (voir paragraphe 1.2.2.). Ceci confère à l'hypophyse un rôle primordial dans la réponse neuroendocrine au stress (Figure 1).

C. Rôle de la glande cortico-surrénale : sécrétion de corticostéroïdes.

Les mammifères possèdent une paire de glandes surrénales situées, comme leur nom l'indique, au dessus du pôle antérieur des reins. Ces glandes sont composées de deux régions distinctes : la médulla et le cortex. La zone **médullosurrénale** contient les cellules

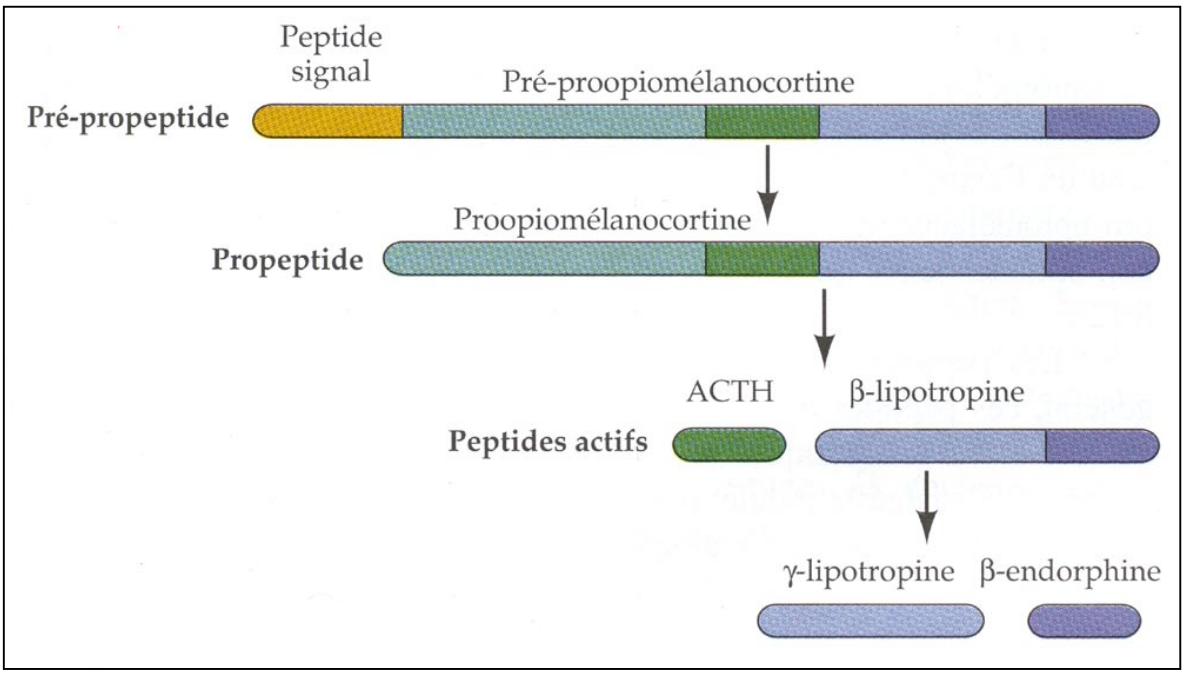

Figure 3. Maturation de la pré-proopiomélanocortine et de la proopiomélanocortine (POMC) en neuropeptides bioactifs.
La pré-POMC est maturée en POMC par excision du peptide signal, puis une série de processus protéolytiques permettent d'obtenir des peptides bioactifs tels que l'ACTH ("adrénocorticotropic hormone"), la γ-lipotropine et la β-endorphine.
(d'après Purves *et al.*, 1997).

chromaffines (sécrétrices de catécholamines) et dérive des cellules de la crète neurale de l'embryon (voir paragraphe 1.2.2.). La **corticosurrénale** contient les cellules stéroïdogènes.

Chez les vertébrés non-mammifères, cellules chromaffines et cellules stéroïdogènes ne sont pas organisées en une médulla et un cortex, mais ces deux types cellulaires sont étroitement associés chez tous les vertébrés.

Les cellules stéroïdogènes sont capables d'utiliser le cholestérol comme substrat pour produire plusieurs corticostéroïdes dont les principaux sont le cortisol, le 11-déoxycortisol, la corticostérone, la cortisone, la 11-déoxycorticostérone, la 18-hydroxycorticostérone et l'aldostérone (Henderson, 1997). Ces hormones ont des activités variées, mais il semble que le cortisol et la corticostérone soient les principaux corticostéroïdes sécrétés au cours de la réponse neuroendocrine au stress (Ottaviani et Franceschi, 1996, Wendelaar-Bonga, 1997).

Lorsque qu'un animal fait face à un facteur de stress, les concentrations plasmatiques en cortisol et en corticostérone augmentent plus ou moins rapidement selon la nature, l'intensité et la durée de la perturbation. Face à une perturbation ponctuelle, la réponse hormonale survient en général en l'espace de quelques minutes et un retour à des concentrations normales est observé en une à cinq heures. Lorsque la perturbation est chronique, les concentrations en corticoïdes atteignent un pic au début du stress puis diminuent, mais restent supérieures à la normale pendant toute la durée de la perturbation (Wendelaar-Bonga, 1997; Maule et Vanderkooi, 1999).

Les corticostéroïdes exercent des activités dites minéralocorticoïdes et des activités dites glucocorticoïdes (Henderson, 1997). Les activités minéralocorticoïdes concernent principalement l'excrétion du sodium et du chlore et participent par conséquent au maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. Les activités glucocorticoïdes sont liées au métabolisme des glucides, lipides et protéines; elles aboutissent généralement à une lyse des réserves énergétiques et à une hyperglycémie (Ottaviani et Franceschi, 1996; Henderson,

1997; Wendelaar-Bonga, 1997). Les corticostéroïdes agissent sur la croissance en inhibant la sécrétion d'hormone de croissance et sur le système reproducteur en inhibant la sécrétion de gonadotropines et donc celle de FSH et de LH (Pottinger, 1999). Les corticostéroïdes exercent aussi un effet inhibiteur sur le système immunitaire en diminuant notamment la production de cytokines ou la réponse des cellules immunitaires à ces molécules (voir chapitre 2 de cette section). La croissance, les fonctions reproductrices et immunitaires sont donc momentanément stoppées.

Au cours d'un stress, les corticostéroïdes participent donc à la re-direction de l'énergie vers les fonctions immédiatement nécessaires à l'organisme de façon à faciliter son adaptation. Cependant, lorsque les concentrations en corticostéroïdes demeurent élevées de manière chronique (plusieurs jours, voire plusieurs semaines), cette réponse hormonale perd ses propriétés adaptatives. Par exemple, une inhibition prolongée de la sécrétion de gonadotropines par les corticostéroïdes provoque une involution des gonades, inhibe la spermatogenèse et l'ovulation, ou retarde la puberté (Johnson *et al.*, 1992; Pottinger, 1999). La suppression prolongée de la sécrétion d'hormone de croissance inhibe la croissance et le développement de certains organes (Wingfield et Ramenofsky, 1999). La sécrétion prolongée de corticostéroïdes peut aussi entraîner un épuisement des réserves énergétiques et des carences en nutriments essentiels. Par exemple, la synthèse d'acide arachidonique diminue, ce qui affecte le fonctionnement de diverses cellules et provoque la mort de certains neurones (Sapolsky, 1996; Wingfield et Ramenofsky, 1999).

1.2.2. L'axe hypothalamus-système nerveux sympathique-cellules chromaffines

Il y a cent ans, deux groupes de recherche indépendants isolèrent une substance bioactive qui augmentait la fréquence cardiaque et la pression sanguine lorsqu'elle était injectée à des vertébrés. Cette substance, isolée à partir d'extraits de glandes surrénales, fut

nommée adrénaline par l'un des groupes de recherche (Takamine, 1901) et épinephrine par l'autre (Aldrich, 1901). L'adrénaline/épinephrine fut le premier messager de type hormonal et neurotransmetteur identifié. D'autres substances proches, la dopamine et la noradrénaline furent identifiées par la suite et ces composés structurellement apparentés furent regroupés sous le terme "catécholamines".

Nous savons aujourd'hui, que les catécholamines sont libérées dans la circulation sanguine lorsque l'animal fait face à une situation nécessitant une augmentation du transport d'oxygène par le sang et une mobilisation des réserves énergétiques. L'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine sont présentes chez tous les vertébrés et interviennent dans la réponse neuroendocrine au stress à des degrés divers (Hart *et al.*, 1989). La noradrénaline est la principale catécholamine libérée au cours du stress chez les cyclostomes et les élasmobranches alors que l'adrénaline est libérée en plus grande quantité chez les autres vertébrés (Reid *et al.*, 1998).

Les catécholamines sont principalement localisées dans le cerveau, les neurones du système nerveux sympathique et les cellules chromaffines (situées dans la glande médullosurrénale chez les mammifères). Elles sont synthétisées à partir de la tyrosine (Figure 4) au niveau de l'appareil de Golgi et stockées dans des granules de sécrétion (Henderson, 1997; Reid *et al.*, 1998).

Au cours de la réponse neuroendocrine au stress, adrénaline, noradrénaline et, dans une moindre mesure dopamine, sont libérées dans le sang. Une partie de la noradrénaline circulante est libérée au niveau des terminaisons nerveuses du système sympathique (Scheurink et Steffens, 1990; Henderson, 1997), mais la majeure partie des catécholamines véhiculées par le sang provient des cellules chromaffines (Livett et Marley, 1993; Henderson, 1997; Wendelaar-Bonga, 1997; Reid *et al.*, 1998). La sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines est principalement contrôlée par le système nerveux sympathique, via

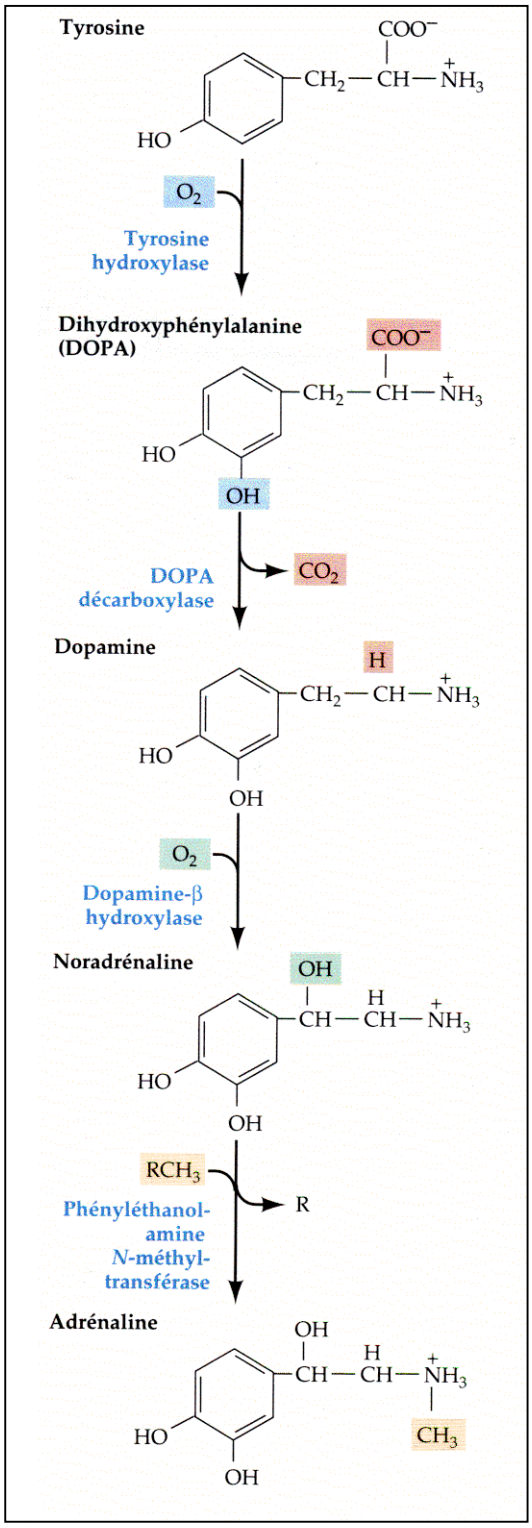

Figure 4. Cascade de biosynthèse des catécholamines.
(d'après Purves *et al.*, 1997).

des synapses à acétylcholine. Nous verrons dans le paragraphe suivant que d'autres neurotransmetteurs et diverses hormones peuvent cependant déclencher la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines (Livett et Marley, 1993; Wendelaar-Bonga, 1997; Reid *et al.*, 1998).

A. Les cellules chromaffines.

Les cellules chromaffines, comme les neurones du système nerveux sympathique dérivent de la crête neurale. Ces cellules ont été nommées "chromaffines" par Kohn (1902) parce qu'elles possèdent une affinité pour les sels de chrome. En effet, en présence de chromate et/ou dichromate les catécholamines s'oxydent et forment des cristaux donnant une couleur jaune-marron à la cellule.

Chez les mammifères, on distingue plusieurs populations de cellules chromaffines : les cellules contenant principalement de l'adrénaline, celles contenant de la noradrénaline (dans la glande surrénale de rat, les quantités relatives de ces deux types cellulaires sont de 4,4:1) et une population mineure de cellules appelées cellules à petits granules ("small granule-containing cells") dont le rôle est mal connu (Unsicker et Krieglstein, 1996).

Les cellules chromaffines ne sécrètent pas uniquement des catécholamines, elles produisent aussi divers facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), le TGF-β (Transforming Growth Factor-β) ou l'IGF (Insulin-Like Growth Factor), des interleukines (IL-1 et IL-6) et des neurotrophines telles que le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et les neurotrophines 3 et 4.

Chez le rat, l'ensemble des cellules chromaffines occupe 63% du volume de la glande médullosurrénale. Douze pour cent du volume sont constitués de tissu connectif et 20% sont occupés par des vaisseaux sanguins recueillant les produits de sécrétion de cellules chromaffines et amenant des substances humorales régulant leur activité. Les 5% restants sont

occupés par des fibres nerveuses cholinergiques et non-cholinergiques régulant la sécrétion de catécholamines (Unsicker et Krieglstein, 1996).

B. Contrôle de la sécrétion de catécholamines.

a. Contrôle cholinergique.

Depuis les téléostéens jusqu'aux mammifères, la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines est principalement contrôlée par des fibres sympathiques via l'**acétylcholine** (Figure 5). Chez les poissons et les oiseaux, la sécrétion de catécholamines est principalement déclenchée par la stimulation de récepteurs nicotiniques alors que chez les mammifères, des **récepteurs nicotiniques** et des **récepteurs muscariniques** sont impliqués. L'interaction de l'acétylcholine avec ses récepteurs provoque une élévation de la concentration en calcium intracellulaire, ce qui déclenche notamment un réarrangement du cytosquelette, le mouvement des granules de sécrétion vers la membrane plasmique et la libération de catécholamines par exocytose (Livett et Marley, 1993; Reid *et al.*, 1998). L'activation des récepteurs nicotiniques stimule aussi l'activité des enzymes de synthèse des catécholamines (Tuominen *et al.*, 1992).

b. Contrôle non-cholinergique.

La sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines est aussi contrôlée par des **fibres nerveuses peptidergiques**, par des **agents non-humoraux** ou par des **hormones** provenant d'autres organes endocrines (telles que l'hypothalamus par exemple) ou par des hormones agissant de manière paracrine ou autocrine (Figure 5).

Les tachykinines, la substance P, le neuropeptide Y, les peptides opioïdes, le VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) et le PACAP (Pituitary Adenylyl-Cyclase Activating

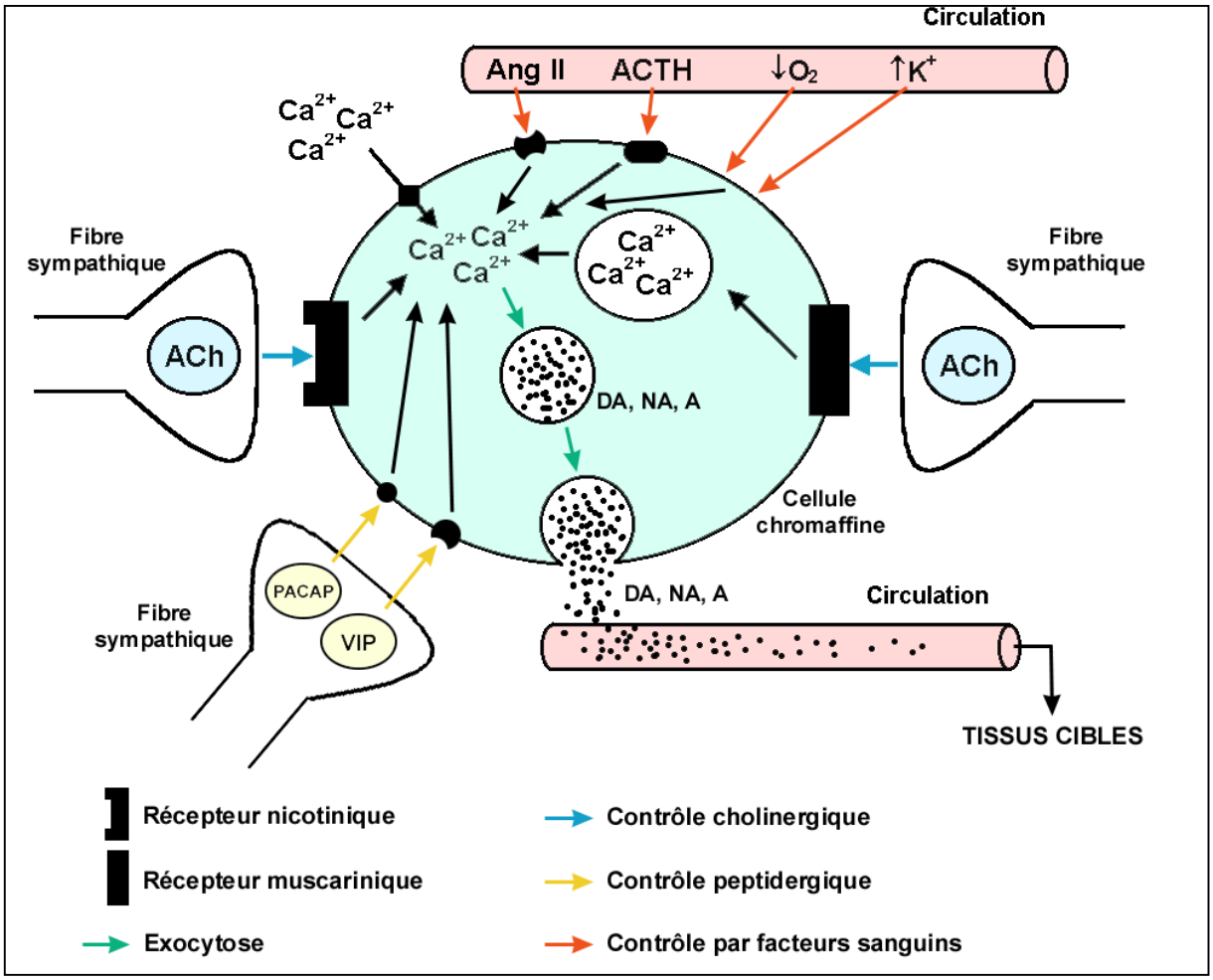

Figure 5. Représentation schématique des voies de contrôle de la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines de vertébrés.
Depuis les élasmobranches jusqu'aux mammifères, la sécrétion de dopamine (DA), de noradrénaline (NA) et d'adrénaline (A) est principalement activée par voie cholinergique (ACh, acétylcholine). Des fibres peptidergiques (PACAP, Pituitary Adenylyl-Cyclase Activating Polypeptide; VIP, Vasoactive Intestinal Polypeptide) peuvent aussi déclencher la sécrétion de catécholamines, ainsi que des hormones (ACTH, adrénocorticotropic hormone; Ang II, angiotensine II) et des facteurs non-humoraux ($\uparrow K^+$, augmentation de la concentration en ions potassium; $\downarrow O_2$, diminution de la quantité d'oxygène sanguin). Bien que les messagers secondaires activés par ces différents signaux soient mal connus, la sécrétion de catécholamines semble activée par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Ca^{2+}). La stimulation des récepteurs nicotiniques déclenche une entrée de calcium par des canaux ioniques membranaires alors que la stimulation des récepteurs muscariniques entraîne la libération de réserves stockées notamment dans le réticulum endoplasmique (voir Reid, 1998).
Chez les cyclostomes, la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines est uniquement contrôlée par des facteurs humoraux.

Polypeptide) sont les principaux neurotransmetteurs non-cholinergiques stimulant l'activité sécrétrice des cellules chromaffines (Livett et Marley, 1993; Unsicker et Krieglstein, 1996; Reid *et al.*, 1998).

Une augmentation de la concentration sanguine en ions potassium, une diminution de la concentration sanguine en oxygène ou une augmentation de la concentration en CO_2 sont les principaux facteurs non-humoraux déclenchant la sécrétion de catécholamines (Reid *et al.*, 1998).

Parmi les hormones stimulant l'activité sécrétrice des cellules chromaffines, on connaît notamment la sérotonine, les angiotensines (les cellules chromaffines possèdent notamment des récepteurs pour l'angiotensine II) et l'histamine ainsi que l'adrénaline et la dopamine elles-mêmes. L'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) stimule la sécrétion de catécholamines chez la truite, l'inhibe chez les amphibiens et n'a pas d'effets chez les mammifères (Livett et Marley, 1993; Reid *et al.*, 1998).

L'activation du complexe hypothalamo-hypophysaire stimule aussi la sécrétion de catécholamines. Par exemple, l'injection de CRH dans le cerveau entraîne une augmentation des concentrations sanguines en adrénaline et noradrénaline chez le rat (Brown *et al.*, 1982). De plus, l'ACTH stimule la libération de catécholamines par les cellules chromaffines et le cortisol augmente la sensibilité des cellules chromaffines à l'acétylcholine (Livett et Marley, 1993; Wendelaar-Bonga, 1997).

Le contrôle non-cholinergique de la sécrétion de catécholamines semble particulièrement important chez les cyclostomes. Les cellules chromaffines de lamproie ou de myxine peuvent sécréter des catécholamines en réponse à une stimulation par l'acétylcholine *in vitro*, mais ce type de régulation n'existe probablement pas *in vivo* parce que le tissu chromaffine de ces poissons n'est pas innervé par des fibres cholinergiques (Reid *et al.*, 1998).

Plusieurs études suggèrent que chez la myxine, la sécrétion des catécholamines est uniquement controlée par voie hormonale (Perry *et al.*, 1993; Bernier et Perry, 1996).

C. Récepteurs et fonctions des catécholamines au cours de la réponse au stress.

Du fait que, chez la plupart des vertébrés, la libération de catécholamines se trouve principalement sous contrôle nerveux, la réponse catécholaminergique au stress survient en général très rapidement (quelques minutes). Si la perturbation est de courte durée, la concentration en catécholamines circulantes décroît très vite (la demi-vie des catécholamines dans le plasma sanguin n'est que de quelques dizaines de secondes à quelques minutes, Ferreira et Vane, 1967) mais si la perturbation est prolongée, les concentrations en catécholamines circulantes restent élevées (Mazeaud *et al.*, 1977, 1981; Brown et Whitehead, 1995).

Les catécholamines agissent sur divers types cellulaires via des récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés à des protéines G. On distingue les récepteurs de la dopamine et les récepteurs adrénergiques qui sont activés par l'adrénaline et la noradrénaline (O'Dowd *et al.*, 1989; Missale *et al.*, 1998). Il existe deux types de récepteurs de la dopamine, les récepteurs de type **D1** (récepteurs D_1 et D_5) qui sont couplés à des protéines G stimulatrices (protéines G_s) et les récepteurs de type **D2** (récepteurs D_2, D_3 et D_4) qui sont couplés à des protéines G inhibitrices (protéines G_i). La famille des récepteurs de l'adrénaline et de la noradrénaline comprend les récepteurs **α-adrénergiques** (on distingue les sous-types α_1 et α_2) et les récepteurs **β-adrénergiques** (on distingue les sous-types β_1, β_2, β_3).

Comme la plupart des récepteurs couplés à des protéines G, les récepteurs de la dopamine et les récepteurs adrénergiques comportent sept domaines hydrophobes transmembranaires arrangés sous forme d'hélices α. Ces sept domaines maintiennent la structure tridimensionnelle du récepteur et forment le site de fixation de l'agoniste (Figure 6).

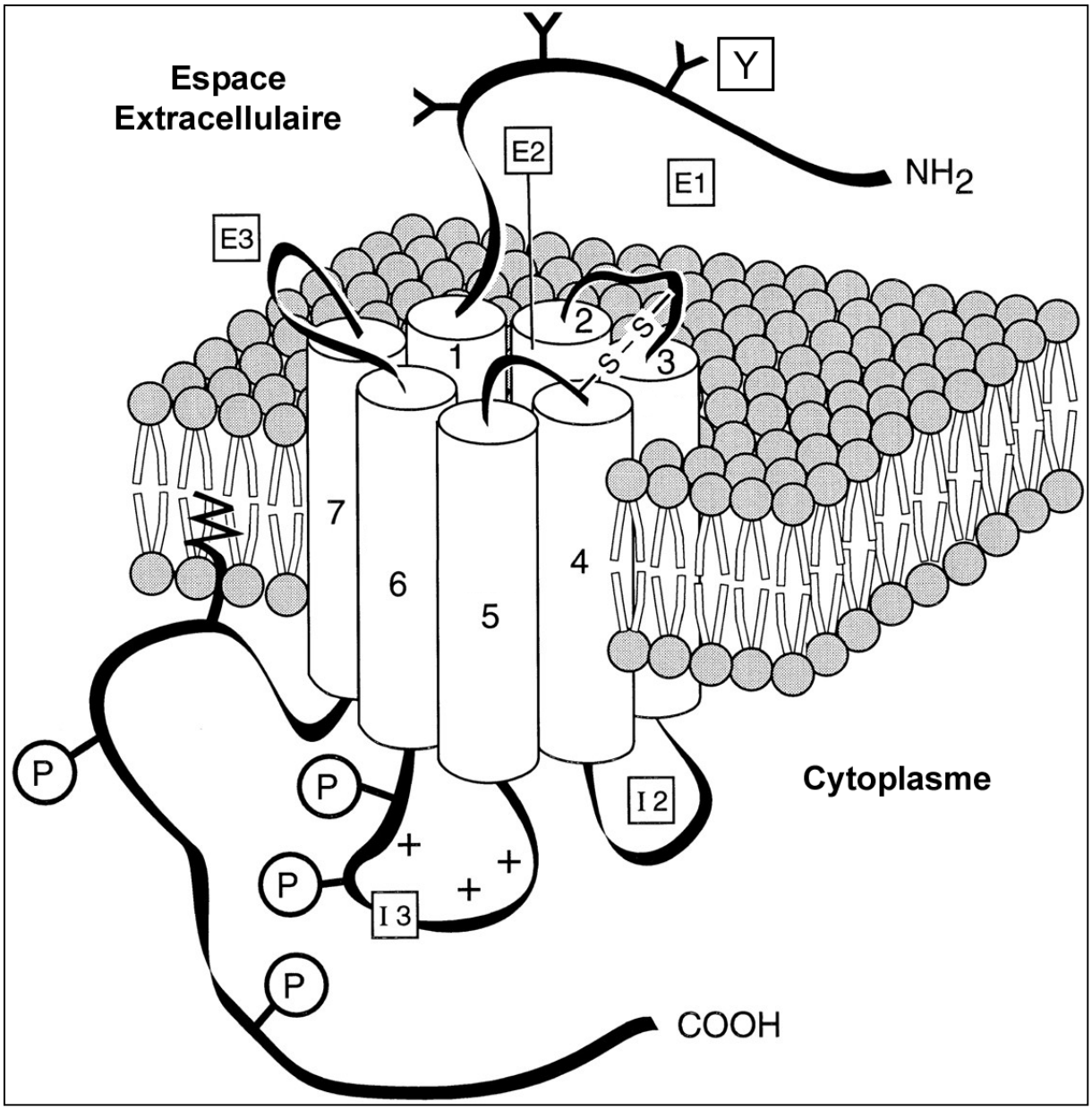

Figure 6. Représentation schématique du récepteur de type D_1.
Comme les récepteurs adrénergiques et les autres récepteurs de la dopamine, ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Tous les récepteurs de cette famille comportent sept domaines transmembranaires maintenant la structure tridimensionnelle du récepteur et formant le site de liaison de l'agoniste. Les différents récepteurs de cette famille diffèrent principalement par la nature des parties intracellulaires (boucles I1-3 et partie C-terminale) et extracellulaires (boucles E1-3 et partie N-terminale) de la protéine, par le nombre de sites de phosphorylation (P) et le nombre de sites de glycosylation (Y). La partie I3 interagit avec la protéine G. S-S, pont dissulfure.
(modifié d'après Missale, 1998).

La liaison du ligand au récepteur provoque un changement de conformation de la protéine afin de permettre le couplage à la protéine G qui, à son tour, agit sur divers effecteurs tels que l'adénylate cyclase, des canaux ioniques ou des phospholipases. Le nombre de sites de glycosylation de la partie N-terminale (extracellulaire) et la nature des parties cytoplasmiques de la protéine diffèrent d'un type de récepteur à l'autre et déterminent l'activité du récepteur. Par exemple, les récepteurs dont la troisième partie cytoplasmique est longue sont couplés à la protéine G_i alors que ceux dont la troisième partie cytoplasmique est courte sont couplés à la protéine G_s (O'Dowd *et al.*, 1989; Cotecchia *et al.*, 1990; Suryanarayana *et al.*, 1992; George *et al.*, 1998; Missale *et al.*, 1998).

En situation de stress, l'interaction des catécholamines avec leurs récepteurs stimule le système respiratoire et le système cardiovasculaire et participe à la mobilisation des substrats énergétiques (Figure 1; Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997; Reid *et al.*, 1998; Perry et Gilmour, 1999). La libération de noradrénaline et d'adrénaline provoque notamment une augmentation de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire et de l'hématocrite de façon à optimiser l'apport d'oxygène au cerveau et aux muscles (Wendelaar-Bonga, 1997; Perry et Gilmour, 1999). Chez la truite, l'adrénaline stimule (via des récepteurs β-adrénergiques) les échanges Na^+/H^+ et inhibe les échanges Cl^-/HCO_3^- au niveau de la membrane plasmique des érythrocytes. Ceci entraîne une alcalinisation du cytoplasme qui augmente l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (Nikinmaa, 1992).

L'adrénaline et la noradrénaline stimulent la glycogénolyse et la néoglucogenèse en agissant soit directement au niveau des hépatocytes, soit indirectement en stimulant la sécrétion de glucagon et en inhibant la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas. Les catécholamines stimulent aussi la libération d'acides gras libres par les adipocytes. L'action de la noradrénaline et de l'adrénaline provoque ainsi une hyperglycémie et une augmentation des concentrations en acides gras libres circulants de façon à couvrir les besoins métaboliques

provoqués par le stress (Pickering et Pottinger, 1995; Steffens et de Boer, 1999). Lorsque la perturbation prend fin, la sécrétion d'insuline reprend et les concentrations en glucose et acides gras circulants reprennent des valeurs normales (Steffens et de Boer, 1999).

1.3. Les hormones de stress chez les invertébrés.

Des réactions comportementales au stress (rétraction au sein d'une coquille, fuite, agressivité...) existent chez les invertébrés (Akberali, 1985) et la réponse au stress est un processus indispensable au maintien de l'homéostasie de tout organisme. Ceci laisse supposer que certaines formes de réponses neuroendocrines au stress sont présentes chez les invertébrés mais elles demeurent encore mal connues (Ottaviani et Franceschi, 1996).

Quelques études ont montré que certaines structures nerveuses des prochordés pourraient constituer des homologues ou des précurseurs du complexe hypothalamo-hypophysaire des vertébrés (Gorbman, 1995; Henderson, 1997). Par exemple, Gorbman (1995) a avancé l'hypothèse que l'hypophyse des vertébrés aurait évolué à partir d'une structure olfactive (chimiosensible) présente chez les prochordés : le complexe "organe de Hatschek-glande neurale". L'organe de Hatschek, une petite invagination de la paroi buccale, et la glande neurale sont en contact avec l'eau environnante et réguleraient les fonctions reproductrices grâce à des substances semblables aux hormones hypophysaires de vertébrés (la GnRH et la LH) afin que la période de reproduction coïncide avec la saison la plus favorable au développement des larves. Gorbman (1995) propose qu'au cours de l'évolution, les fonctions endocrines auraient été conservées au sein de l'adénohypophyse des vertébrés et les fonctions sensorielles auraient été transférées vers les centres nerveux adjacents. Il est important de signaler que ces hypothèses n'ont pas encore été confirmées et il semble qu'elles fassent encore l'objet de débats.

De nombreux travaux indiquent aussi que les principaux acteurs hormonaux de la réponse au stress des vertébrés sont présents chez pratiquement tous les invertébrés (Ottaviani et Franceschi, 1996; Stefano et Salzet, 1999). Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant l'organisation de la réponse neuroendocrine au stress chez ces animaux.

Dans les paragraphes suivants, nous passons en revue les informations concernant la présence de CRH, d'ACTH, de corticostéroïdes et de catécholamines chez les invertébrés.

1.3.1. Présence de CRH chez les invertébrés.

Un nombre croissant d'études d'immunohistochimie et immunocytochimie montrent que des substances CRH-like sont présentes chez les invertébrés.

Le système nerveux des annélides *Dendrobaena subrubicunda* (Rémy *et al.*, 1982) et *Nereis diversicolor* (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985), du mollusque *Planorbarius corneus* (Sonetti *et al.*, 1986) et de divers insectes (Verhaert *et al.*, 1984; Schols *et al.*, 1987; Te Brugge *et al.*, 1999) contiennent des molécules CRH-like. L'hémolymphe et les hémocytes de mollusques *Planorbarius corneus*, *Viviparus ater*, *Lymnea stagnalis* et *Mytilus galloprovincialis* contiennent aussi des substances CRH-like (Ottaviani *et al.*, 1990, 1994, 1998). De plus, les hémocytes de moule expriment des ARN messagers codant des récepteurs de CRH (Malagoli *et al.*, 2000).

Le rôle de la CRH chez les invertébrés est mal connu. Chez les mollusques, cette hormone semble impliquée dans des processus immunorégulateurs (Ottaviani et Franceschi, 1996; voir chapitre 2 de cette section). Chez les insectes, des hormones diurétiques (dites "hormones diurétiques CRH-like") présentent une forte homologie de séquence avec des peptides de la famille CRH/sauvagine/urotensine I/urocortine des vertébrés, une famille de peptides qui stimulent notamment la libération d'ACTH et la diurèse chez les vertébrés

(Landau *et al.*, 1997; Furuya *et al.*, 2000). Ceci suggère que la CRH d'invertébrés pourrait remplir des fonctions similaires à celles de la CRH de vertébrés.

1.3.2. Opioïdes, ACTH et autres dérivés de la POMC chez les invertébrés.

Des substances ACTH-like ont été détectées chez le nématode *Goodeyus ulmi* (Leach *et al.*, 1987) et le trématode *Schistosoma mansoni* (Duvaux-Miret et Capron, 1992). Elles sont aussi présentes dans le système nerveux des mollusques (Boer *et al.*, 1979; van Noorden *et al.*, 1980; Leung *et al.*, 1990) et des insectes (Verhaert *et al.*, 1984; Hansen *et al.*, 1986; Schols *et al.*, 1987) ainsi que dans les gonades du prochordé *Styela plicata* (Pestarino et Facchinetti, 1995). L'hémolymphe et les cellules immunitaires des mollusques (Ottaviani *et al.*, 1990, 1995; Stefano et Salzet, 1999), des annélides *Eisina foetida* (Cooper *et al.*, 1995) et *Theromyzon tessulatum* (Salzet *et al.*, 1997) et des insectes *Leucophaea maderae* (Smith *et al.*, 1990) et *Calliphora vomitoria* (Franchini *et al.*, 1996) contiennent eux aussi des molecules ACTH-like.

Un peptide similaire à la POMC de mammifères et six peptides dérivés (incluant l'α-MSH et l'ACTH) ont été purifiés à partir d'hémolymphe et d'hémocytes de sangsue *T. tessulatum* (Salzet *et al.*, 1997) et de moule *Mytilus edulis* (Stefano *et al.*, 1999). Il semble que les séquences en acides aminés de ces peptides aient été très conservées au cours de l'évolution. En effet chez la moule, l'α-MSH et l'ACTH présentent respectivement 90 % (85 % chez la sangsue) et 74 % (70 % chez la sangsue) d'identité avec l'α-MSH et l'ACTH de mammifères (Stefano et Salzet, 1999).

L'ACTH possède des propriétés immunorégulatrices chez les mollusques (Ottaviani et Franceschi, 1996; Stefano et Salzet, 1999). Et d'autres opioïdes tels que la méthionine-enképhaline sont capables de moduler l'activité des neurones dopaminergiques chez la moule (Stefano, 1982).

1.3.3. Cortisol et corticostérone chez les invertébrés.

A ce jour, les hormones stéroïdes décrites chez les invertébrés sont principalement des hormones reproductives (oestrogènes ou androgènes) et des hormones de mue (cas des arthropodes). Peu d'informations sont disponibles concernant la présence de cortisol ou de corticostérone chez les invertébrés. Il semble que la mouche *Calliphora vicina* possède des sites de fixation pour la corticostérone (Bidmon et Stumpf, 1991) et par une approche immunocytochimique, Ottaviani *et al.* (1998) ont récemment détecté des molécules cortisol-like dans les hémocytes des gastéropodes *Planorbarius corneus*, *Viviparus contectus* et *Lymnea stagnalis* et dans les hémocytes de moule *Mytilus edulis*, mais le rôle de ces substances chez les invertébrés demeure inconnu.

1.3.4. Les catécholamines chez les invertébrés.

De la noradrénaline et de la dopamine ont été détectées dans les fibres nerveuses des cœlentérés (Pani et Anctil, 1994), des annélides (Anctil *et al.*, 1990), des plathelminthes (Gustafsson et Eriksson, 1991), des arthropodes (Shimizu *et al.*, 1991) et des mollusques (Sloley *et al.*, 1990; Takeda, 1992; Pani et Croll, 1995, 1998). Les hémocytes et les gonades de mollusques contiennent aussi des catécholamines (Ottaviani et Franceschi, 1996; Osada et Nomura, 1989). Il semble que l'adrénaline soit absente chez de nombreux invertébrés.

Chez les crustacés, la noradrénaline et la dopamine sont impliquées dans les méchanismes d'osmorégulation (Zatta, 1987) et dans la dispersion ou la concentration des pigments rétiniens (Landau *et al.*, 1997). De plus, la dopamine a un effet hyperglycémiant chez le homard (Landau *et al.*, 1997). Chez les plathelminthes, ces catécholamines contrôlent les processus de régénération tissulaire (Landau *et al.*, 1997). Chez les mollusques, les catécholamines modulent les fonctions respiratoires (Syed et Winlow, 1991), la reproduction

(Martínez et Rivera, 1994), la métamorphose (Pires *et al.,* 1997) et elles influent sur les fonctions de locomotion (Sakharov et Salanski, 1982).

Des récepteurs α et β adrénergiques sont présents chez les mollusques (Rosza, 1984; Coon et Bonar, 1987; Pertseva *et al.*, 1992) et un récepteur de dopamine de type D1 a été récemment découvert chez la sangsue *T. tessulatum* (Salzet *et al.*, 1998).

1.3.5. La réponse neuroendocrine au stress chez les invertébrés : faits et hypothèses.

Plusieurs études suggèrent que des catécholamines pourraient être impliquées dans une forme de réponse neuroendocrine au stress chez les invertébrés. Par exemple, Stefano et Catapane (1977) ont montré qu'un stress thermique influe sur les concentrations en dopamine et en noradrénaline dans les ganglions de mollusques. Récemment, deux études ont établi que la présence de dopamine est nécessaire à l'apparition de comportements de fuite ou d'aggressivité chez le criquet *Grillus bimaculatus* (Stevenson *et al.*, 2000) et le crabe *Carcinus maenas* (Sneddon *et al.*, 2000). Ces auteurs montrent aussi que l'octopamine, une autre amine biogène (David et Coulon, 1985), est nécessaire à l'apparition de comportements de fuite ou d'aggressivité chez le criquet et le crabe. Des amines biogènes autres que les catécholamines sont donc vraisemblablement impliquées dans la réponse neuroendocrine au stress des invertébrés.

Les hémocytes de bivalves et de gastéropodes sécrètent des catécholamines lorsqu'ils sont maintenus *in vitro* en présence d'ACTH et ils libèrent de l'ACTH en présence de CRH (Ottaviani et Franceschi, 1996). Il est possible que cette cascade hormonale participe uniquement à des méchanismes immunorégulateurs et non à une réponse neuroendocrine permettant à l'ensemble de l'organisme de faire face à un stress. Cependant, chez la moule, une injection intra-cardiaque de certains peptides opioïdes tels que la méthionine-enképhaline entraîne une augmentation de la concentration en dopamine dans les ganglions nerveux

(Stefano, 1982). Il semble donc que chez les mollusques, il existe des cascades hormonales semblables à celles qui constituent la réponse neuroendocrine au stress des vertébrés et il est possible que ces cascades hormonales prennent part à une réponse neuroendocrine au stress chez certains invertébrés (Ottaviani et Franceschi, 1996; 1997; Stefano et Salzet, 1999).

Nous verrons dans la deuxième partie de cette thèse que nos recherches confirment qu'une forme de réponse au stress impliquant des catécholamines et probablement de l'ACTH existe chez les mollusques.

CHAPITRE 2. Interactions entre le système neuroendocrine et le système immunitaire. Neuroimmunologie du stress.

Depuis environ deux décennies, un nombre considérable d'études a examiné les relations entre le système neuroendocrine et le système immunitaire. Ces études montrent que diverses cytokines et hormones, ainsi que les récepteurs correspondants, sont produits à la fois par le système neuroendocrine et par le système immunitaire et permettent à ces deux compartiments de communiquer de manière étroite. Nous verrons, dans la suite de ce chapitre, que les interactions neuro-immunitaires jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie (Blalock, 1984, 1994; Jafarian-Tehrani et Sternberg, 1999).

2.1. Neuroimmunologie du stress chez les vertébrés.

2.1.1. Principales composantes du système immunitaire des vertébrés (Figure 7).

Les premières grandes théories concernant l'immunité furent établies entre la fin du 19è et le début du 20è siècles par Paul Ehrlich et Elie Metchnikoff. Ehrlich proposa les premières bases des théories concernant la défense humorale, tandis que Metchnikoff, à la suite d'observations effectuées en 1882 sur les amibocytes d'invertébrés, développa l'idée que les macrophages sanguins constituaient un système de défense contre les micro-organismes (Metchnikoff, 1901; Baggliolini, 1982). Ehrlich et Metchnikoff reçurent le prix Nobel de Médecine en 1908 pour leurs contributions respectives à la théorie de l'immunité. On considère que les découvertes de Metchnikoff représentent les débuts de l'immunologie moderne (Heifets, 1982).

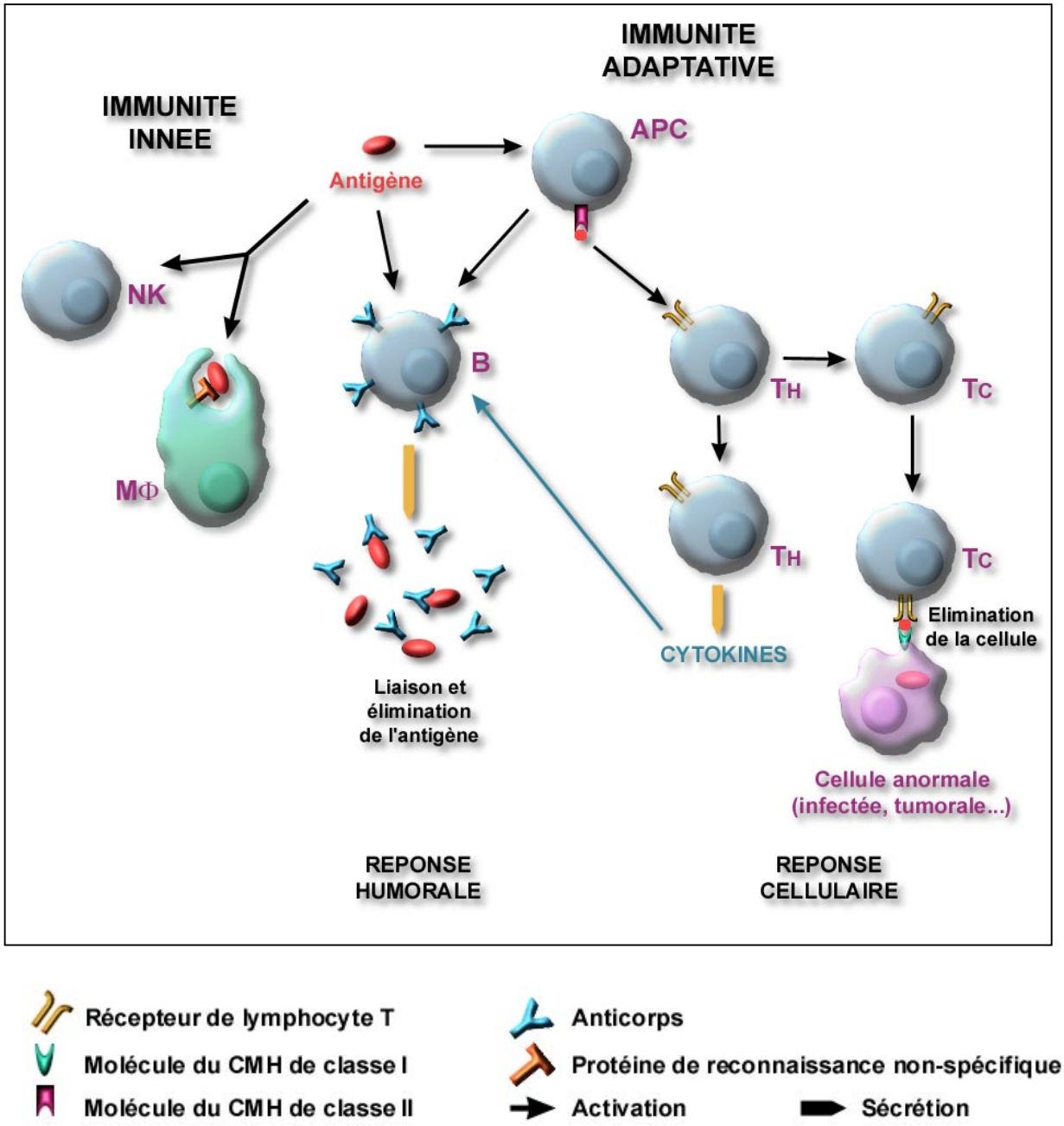

Figure 7. Représentation schématique de la réponse immunitaire adaptative des vertébrés.
La présence d'un corps étranger active d'abord les cellules de l'immunité innée : macrophages (MΦ) et cellules NK (natural killer). Celles-ci constituent une première ligne de défense et déterminent la nature de la réponse adaptative. La réponse adaptatique débute par la présentation d'un épitope de l'antigène à des lymphocytes T_H (helper) par les cellules APC (antigen presenting cells). Les lymphocytes T_H sélectionnent alors les effecteurs adéquats. Elles stimulent les lymphocytes T_C (cytotoxiques) qui éliminent les cellules infectées ou tumorales et elles produisent des cytokines qui stimulent la production d'anticorps par les lymphocytes B (B). Ces anticorps se lieront au corps étranger, participeront à sa dégradation et faciliteront la phagocytose par les macrophages. CMH, complexe majeur d'histocompatibilité (d'après Roitt *et al.*, 1998).

Nous savons aujourd'hui que le système immunitaire a pour fonction de défendre l'organisme contre les corps étrangers (bactéries, virus, champignons, protéines étrangères ou substances inorganiques toxiques) et contre les cellules anormales de l'organisme (cellules tumorales). La réponse immunitaire nécessite d'une part la reconnaissance du "soi" et du "non-soi" et d'autre part, la mise en place d'une réponse permettant d'éliminer les substances étrangères (Kuby, 1994; Roitt *et al.*, 1998).

Les vertébrés possèdent une immunité innée (encore appelée non-spécifique ou naturelle) et une immunité adaptative (encore appelée spécifique ou acquise).

L'**immunité innée** assure une première ligne de défenses contre les corps étrangers et détermine la nature de la réponse adaptative déclenchée par la suite en activant des cascades de gènes particulières, telles que voie dite "Toll-NF-κB". Elle met aussi en jeu des cascades protéolytiques (complément), des substances humorales telles que le lysozyme ou divers peptides antimicrobiens et des composants cellulaires tels que les cellules phagocytaires (monocytes/macrophages et neutrophiles). Cette réponse est mise en place lorsque des molécules présentes chez les micro-organismes, mais absentes chez les eukaryotes (les lipopolysacharides des bactéries à Gram négatif ou le β-1,3-glucan des levures par exemple), sont détectées (Kuby, 1994; Roitt *et al.*, 1998).

L'**immunité adaptative** comprend un ensemble de réponses humorales et cellulaires spécifiquement dirigées contre l'antigène détecté. Cette réponse vise non seulement à éliminer le corps étranger, mais aussi à garder son passage en mémoire de façon à répondre plus rapidement et plus efficacement s'il se manifeste à nouveau. La **spécificité** de la réponse repose sur des molécules de reconnaissance synthétisées par les lymphocytes B et T (récepteur des lymphocytes T et molécules du complexe majeur d'histocompatibilité) et sur la production d'immunoglobulines (anticorps) spécifiquement dirigées contre l'antigène reconnu.

Au sein des lymphocytes, les produits des gènes RAG (Recombination Activating Genes) réarrangent les gènes codant les molécules de reconnaissance ou les immunoglobulines de façon à ce que la réponse soit spécifique. La **mémoire** repose sur la sélection clonale des lymphocytes exprimant les immunoglobulines adaptées à l'antigène détecté (Mc Blane *et al.*, 1995; Mc Heyzer-Williams *et al.*, 1995).

Une population particulière de lymphocytes, les lymphocytes T-suppresseurs stoppent la réponse immunitaire lorsque l'antigène contre lequel elle était dirigée a été éliminé. Le système neuroendocrine joue aussi un rôle dans la régulation du système immunitaire, particulièrement au cours de la réponse au stress (Blalock, 1994; Maule et Vanderkooi, 1999; Sternberg, 2000). Nous verrons dans les paragraphes suivants que la réponse neuroendocrine au stress peut avoir des effets stimulateurs ou suppresseurs sur la réponse immunitaire.

2.1.2. Actions du système neuroendocrine sur le système immunitaire.

Parmi les hormones sécrétées au cours de la réponse au stress, les corticostéroïdes (cortisol et corticostérone, notamment) sont bien connus pour leurs effets immunomodulateurs. Plusieurs hormones peptidiques (CRH et dérivés de la POMC) et les catécholamines influent aussi sur la réponse immunitaire.

De plus, les macrophages et les lymphocytes synthétisent des hormones telles que la CRH, des dérivés de la POMC (ACTH, endorphines) et des catécholamines (Blalock, 1994; Stefano et Salzet, 1999). Nous verrons que la sécrétion de ces hormones peut être stimulée au cours de la réponse neuroendocrine au stress et moduler l'activité des cellules immunitaires par une action autocrine ou paracrine (Figure 8).

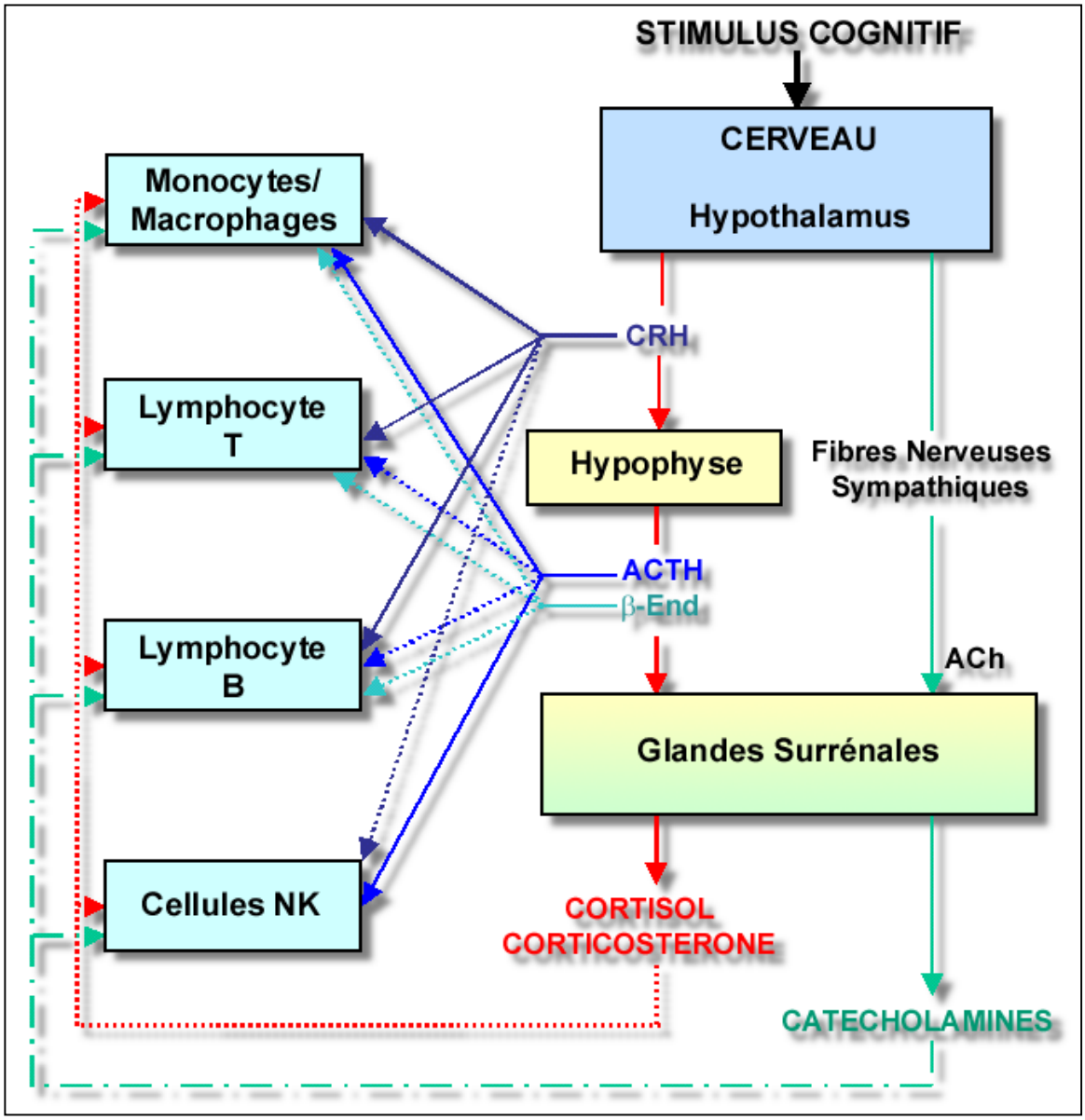

Figure 8. Action des hormones impliquées dans la réponse au stress sur les principaux acteurs du système immunitaire. L'action de la CRH est vraisemblablement indirecte.
Ce schéma synthétise les informations disponibles chez les mammifères.
CRH, "corticotropin releasing hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone", β-End, β-endorphine; ACh, acétylcholine.

A. Effets de la CRH.

Le mode d'action de la CRH sur le système immunitaire est encore assez mal connu et différentes études et conditions expérimentales ont montré que cette hormone peut avoir des effets immunostimulateurs ou immunosuppresseurs (Blalock, 1994; Maule et Vanderkooi, 1999).

Les lymphocytes et les macrophages possèdent des récepteurs de CRH (Webster et Souza, 1988; Blalock, 1994) et Irwin et Jones (1991) ont montré que, chez les mammifères, une administration de CRH dans le système nerveux central induit une diminution de la cytotoxicité des cellules NK. Cependant, cette hormone agit vraisemblablement de façon indirecte. En effet, lorsque les cellules NK sont exposées à la CRH *in vitro* ou lorsque la CRH est administrée par injection sous-cutanée, l'activité des cellules n'est pas affectée.

Les lymphocytes et les macrophages humains peuvent être stimulés *in vitro* par la présence de CRH mais ceci semble principalement lié au fait que ce neuropeptide induit la sécrétion d'ACTH et de cytokines qui peuvent agir de façon autocrine ou paracrine sur les lymphocytes en culture (Smith *et al.*, 1986; Blalock, 1994).

La CRH semble donc agir de façon indirecte sur les cellules immunitaires.

B. Effets de l'ACTH et d'autres dérivés de la POMC.

Plusieurs dérivés de la POMC tels que l'ACTH et la β-endorphine agissent de façon directe sur le système immunitaire (Figure 8). Des récepteurs d'opioïdes ont été mis en évidence à la surface des lymphocytes B et T (Clarke et Bost, 1989) et des composés tels que l'ACTH ou la β-endorphine activent des messagers secondaires dans les lymphocytes (Johnson *et al.*, 1988). Cependant, les effets de ces hormones sur le système immunitaire ne sont pas clairement établis, certains auteurs montrent qu'elles exercent des fonctions

immunostimulatrices alors que d'autres y associent des effets inhibiteurs (Maule et Vanderkooi, 1999). Par exemple, l'ACTH inhibe l'activité des lymphocytes T (Johnson *et al.*, 1982), stimule l'activité des macrophages et active la différentiation des lymphocytes B (Alvarez-Mon *et al.*, 1985). Bost *et al.* (1990) ont montré que de faibles concentrations en ACTH stimulent la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B alors que de fortes concentrations l'inhibent. Une partie des effets immunosuppresseurs de l'ACTH pourraient être due au clivage du peptide en α-MSH (peptide immunosuppresseur) par des enzymes protéolytiques présentes dans les cellules immunitaires (Smith *et al.*, 1992). La β-endorphine inhibe l'activité des macrophages et des lymphocytes B et T (Maule et Vanderkooi, 1999).

C. Effets du cortisol et de la corticostérone.

Un grand nombre d'études a montré que chez les vertébrés, le cortisol et la corticostérone inhibent les fonctions immunitaires (Figure 8) et la majorité des effets immunosuppresseurs du stress est associée à ces hormones (Wendelaar-Bonga, 1997; Maule et Vanderkooi, 1999).

Tous les processus illustrés dans la figure 7 sont inhibés en présence de ces hormones. Elles inhibent aussi la différentiation des monocytes circulants en macrophages (Rinehart *et al.*, 1982), la production d'interleukine-1 et de molécules de reconnaissance par les macrophages (Hirschberg *et al.*, 1982), la synthèse d'interleukine-2, d'interféron-γ et de CSF (colony stimulating factor) par les lymphocytes T (Gillis *et al.*, 1979; Kelso et Munck, 1984) ou la production d'anticorps par les lymphocytes B (Cupps *et al.*, 1985).

Le cortisol et la corticostérone affectent les fonctions immunitaires en inhibant la synthèse de protéines clés (cytokines notamment) ou en supprimant la transcription de gènes d'interleukines (Guyre *et al.*, 1988; Scheiman *et al.*, 1995). Ces corticostéroïdes peuvent aussi activer la transcription de gènes de protéines exerçant des effets immunosuppresseurs. Par

exemple, ils stimulent la transcription de la protéine IκBβ qui inhibe NF-κB, un facteur nucléaire jouant un rôle important dans la transcription de gènes d'interleukines (Auphan *et al.*, 1995; Scheiman *et al.*, 1995).

Les effets immunosuppresseurs du cortisol et de la corticostérone ne se manifestent cependant pas toujours avec la même intensité. Par exemple, au cours de la prolifération des lymphocytes T et B, ils varient en fonction des phases du cycle cellulaire (Crabtree *et al.*, 1980; Hsu et DeFranco, 1995).

D. Effets des catécholamines.

Les études ayant examiné les effets des catécholamines sur les fonctions immunitaires concernent principalement l'adrénaline et la noradrénaline. Tous les organes clé du système immunitaire (le thymus, la moëlle osseuse, la rate et autres tissus lymphoïdes) sont innervés par des fibres catécholaminergiques du système nerveux sympathique (Felten et Felten, 1988). De plus, les lymphocytes B et T, les macrophages et les neutrophiles possèdent des récepteurs adrénergiques (Madden et Felten, 1995) et sont sous l'influence des catécholamines circulantes libérées par les cellules chromaffines (Maule et Vanderkooi, 1999). Les effets des catécholamines sur ces divers tissus et cellules sont inhibiteurs ou stimulateurs selon le type de processus immunitaire et le type de cellule considérés (Figure 8). Par exemple, une injection d'adrénaline à des souris, six heures avant l'injection d'un corps étranger (hématies de chèvre) stimule la production d'anticorps alors qu'une injection d'adrénaline deux jours avant l'administration d'hématies de chèvre inhibe la production d'anticorps (Depelchin et Letesson, 1981). La libération de catécholamines par les fibres du système sympathique module la sécrétion d'interleukines-1 et 2 et régule l'activité des cellules NK (Madden et Felten, 1995). L'adrénaline et la noradrénaline peuvent aussi diminuer la stabilité des ARN messagers codant pour les protéines de reconnaissance des lymphocytes T (Wajeman-Chao *et*

al., 1998), diminuer les capacités prolifératrices des lymphocytes, causer une augmentation du nombre de monocytes et lymphocytes circulants ou supprimer l'activité phagocytaire des macrophages (Madden et Felten, 1995).

Récemment, Alaniz *et al.* (1999) ont examiné le rôle des catécholamines en utilisant des souris dont le gène codant la dopamine β-hydroxylase est inactif. Ces souris peuvent donc synthétiser de la dopamine mais pas d'adrénaline ou de noradrénaline (voir Figure 4). Les animaux présentent un nombre normal de leucocytes et les lymphocytes B et T et se développent normalement, cependant, leur réponse immunitaire est moins efficace. Par exemple, ces souris transgéniques sont plus susceptibles que des souris normales à une infection par des pathogènes bactériens et leurs lymphocytes T produisent moins de cytokines.

E. Effets du stress sur le système immunitaire : inhibition ou activation?

Il apparaît que les catécholamines et les neuropeptides impliqués dans la réponse neuroendocrine au stress peuvent exercer à la fois des fonctions immunostimulatrices et des fonctions immunosuppressives. Ceci amène à se demander quel est l'effet global du stress sur le système immunitaire. Est-ce un effet immunostimulateur ou immunosuppresseur?

La réponse au stress est un processus adaptatif. Sa principale fonction est de rediriger l'énergie vers les fonctions immédiatement nécessaires à l'organisme (ce qui, en général, exclut les fonctions immunitaires, voir chapitre 1 de cette section), mais elle ne peut laisser l'organisme entièrement vulnérable à d'éventuels parasites et pathogènes. Les conséquences du stress sur les fonctions immunitaires d'un animal sont donc très complexes et dépendent de nombreux facteurs tels que l'espèce animale considérée, l'état physiologique de l'individu, la durée et l'intensité du stress, la nature du facteur de stress et le moment auquel survient ce facteur de stress au cours de la réponse immunitaire (Maule et Vanderkooi, 1999).

En général, lorsqu'un animal est soumis à un stress très intense, prolongé ou chronique, il présente des immunodéficiences et une vulnérabilité accrue aux pathogènes (Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997; Maule et Vanderkooi, 1999). Cependant, des stress de courte durée peuvent avoir un effet positif sur certaines fonctions immunitaires parce qu'ils stimulent la sécrétion de certaines cytokines et déclenchent un état de vigilance générale chez l'animal (Maule et Vanderkooi, 1999). Par exemple, un stress ponctuel peut faciliter le développement de la réponse inflammatoire (Chrousos et Gold, 1992).

2.1.3. Actions du système immunitaire sur le système neuroendocrine.

A. Libération de neuropeptides par les cellules immunitaires.

A ce jour, plus de 20 différents neuropeptides et/ou leurs ARN messagers ont été identifiés dans des cellules du système immunitaire. Ces composés peuvent agir selon des modes autocrines, paracrines et probablement aussi endocrines. Ils modulent certaines fonctions immunitaires mais pourraient aussi agir sur le système neuroendocrine (Figure 9; Blalock, 1994, 1997; Maule et Vanderkooi, 1999).

L'ACTH pourrait être une hormone clé dans les relations entre le système immunitaire et le système neuroendocrine (Stefano et Smith, 1996). Chez l'homme, la CRH ou un stress peuvent stimuler la production d'ACTH par les lymphocytes circulants (Meyer *et al.*, 1987; Blalock, 1994) et plusieurs études ont montré qu'après ablation de l'hypophyse, la production de cortisol et de corticostérone pouvait encore être stimulée chez la souris (Smith *et al.*, 1982) et le poulet (Blalock, 1994).

D'après Blalock (1994), l'ACTH libérée par des cellules immunitaires pourrait stimuler la sécrétion de ces corticostéroïdes par la glande surrénale, en absence d'hypophyse. Les cellules immunitaires produisent certes de moins grandes quantités d'hormones peptidiques

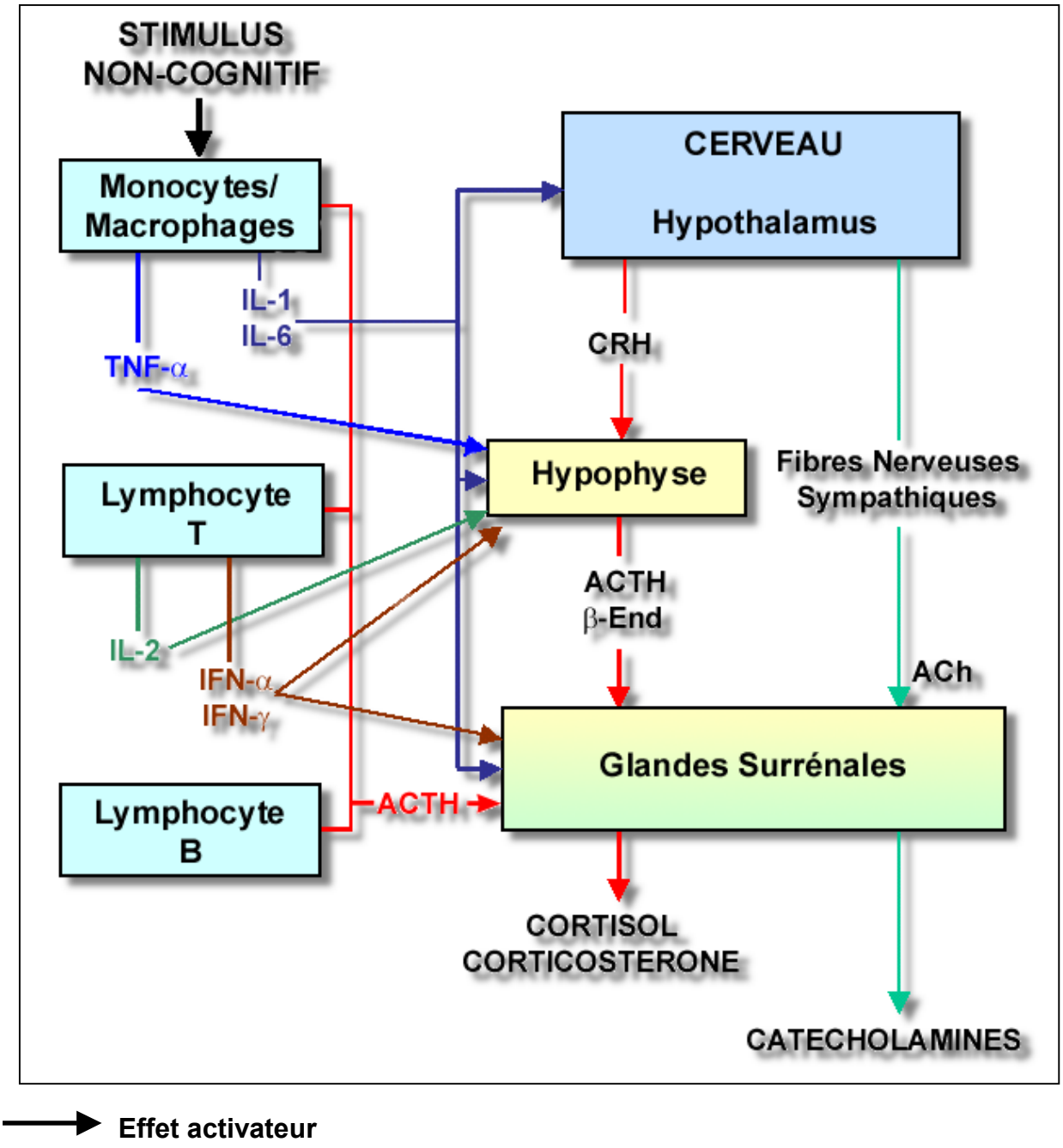

Figure 9. Activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-glandes surrénales par les principaux acteurs du système immunitaire. Ce schéma synthétise les informations disponibles chez les mammifères.
CRH, "corticotropin releasing hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone", β-End, β-endorphine; ACh, acétylcholine; IL, interleukine, TNF, "tumor necrosis factor"; IFN, interféron.

que le système neuroendocrine, mais ces cellules sont présentes en plus grand nombre. En plus de l'axe hypothalamus-hypophyse-glande surrénale, pourrait donc exister un axe immuno-surrénalien (Blalock, 1994).

B. Action des cytokines sur le système neuroendocrine.

L'action du système immunitaire sur le système neuroendocrine n'est pas uniquement modulée par des hormones peptidiques, des cytokines jouent aussi un rôle important dans ce processus (Figure 9).

Les cytokines sont des polypeptides (8-60 kDa) solubles, régulant la croissance, la différentiation et les fonctions de nombreux types cellulaires. Ces molécules ont initialement été considérées comme spécifiques du système immunitaire, mais on sait aujourd'hui qu'elles sont aussi présentes et actives au niveau des tissus nerveux et du système neuroendocrine (Turnbull et Rivier, 1999). Les cytokines agissent sur des récepteurs membranaires selon un mode autocrine, paracrine ou endocrine. Leurs actions sont dites pléïotropes (une même cytokine exerce généralement des effets différents sur des cibles cellulaires différentes), redondantes (plusieurs cytokines peuvent exercer des fonctions identiques) et synergiques (l'action concomittante de plusieurs cytokines peut être nécessaire pour déclencher une réponse cellulaire) ou antagonistes (l'action d'une cytokine peut nécessiter que l'effet d'une autre cytokine soit inhibé). Les cytokines sont classées en six familles, les interleukines (IL), les TNF (Tumor Necrosis Factors), les interférons, les chimiokines, les hématopoïétines (dont certaines sont aussi considérées comme des neuropoïétines) et les CSF (Colony Stimulating Factors). Certains facteurs de croissance et certaines neurotrophines sont aujourd'hui aussi considérés comme des cytokines (Kuby, 1994; Turnbull et Rivier, 1999).

De nombreuses études montrent que les cytokines modulent la synthèse et la sécrétion d'ACTH, de corticostéroïdes et de catécholamines par le système neuroendocrine. Chez les

mammifères, une administration intraveineuse, intrapéritonéale ou intracérébrale d'interleukine-1 (IL-1) provoque une augmentation des concentrations en ACTH, cortisol et corticostérone circulants. De même, une administration intraveineuse d'interleukine-2, d'interleukine-6, de TNF-α, d'interféron-α ou d'interféron-γ stimule la sécrétion d'ACTH et de corticostéroïdes par le système neuroendocrine (Madden et Felten, 1995, Turnbull et Rivier, 1999). L'interleukine-1 stimule aussi la synthèse de noradrénaline par les fibres du système nerveux sympathique et la production de neuropeptides par les cellules chromaffines (Eskay et Eiden, 1992).

Des récepteurs de cytokines sont présents dans le cerveau, l'hypophyse et à la surface des cellules stéroïdogènes et des cellules chromaffines. Par conséquent, l'action des cytokines sur les organes du système neuroendocrine peut être à la fois indirecte (via l'ACTH par exemple) ou directe.

2.1.4. Communication bi-directionnelle entre le système neuroendocrine et le système immunitaire.

Il apparaît que le système neuroendocrine et le système immunitaire communiquent selon un mode bi-directionnel. Ces interactions neuro-immunitaires jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie (Blalock, 1984, 1994; Sternberg, 2000).

Par exemple, lorsqu'une réponse inflammatoire est mise en place, des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF-α) sont libérées pour activer et attirer des macrophages et des lymphocytes au niveau de la zone lésée. A leur tour, les cellules activées vont sécréter des cytokines et la réponse va s'amplifier. Comme nous venons de le voir, les cytokines vont aussi déclencher la sécrétion de corticostéroïdes. Les cellules immunitaires vont alors se trouver sous l'influence antagoniste de cytokines et de corticostéroïdes. Tant que l'influence des cytokines est plus forte que celle des corticostéroïdes, la réponse inflammatoire s'amplifie, mais dès que

l'influence des corticostéroïdes devient plus forte que celle des cytokines, la réponse inflammatoire diminue. Ce mode de régulation empêche une réponse inflammatoire disproportionnée (Sternberg, 2000).

Au cours des années 80, Blalock a émis l'hypothèse que les interactions neuro-immunitaires joueraient aussi un rôle déterminant lorsque l'organisme se trouve confronté à des stimuli non-cognitifs (présence de virus, bactéries et autres stimuli non détectés par les organes sensoriels "classiques", voir paragraphe 1.1.3). Après reconnaissance du stimulus, le système immunitaire informerait le système neuroendocrine via les cytokines et hormones produites par les leucocytes de façon à ce que la réponse immunitaire soit complétée par un ensemble de réactions physiologiques facilitant l'adaptation de l'organisme (Blalock, 1984, 1994; Weigent et Blalock, 1997).

Au cours des années 90, les interactions neuro-immunitaires ont reçu une attention particulière parce que plusieurs études ont montré que cancers, pathologies infectieuses, maladies autoimmunes, stress et dépressions étaient interconnectés (Chrousos et Gold, 1992; Holden *et al.*, 1998). Par exemple, des individus dont l'axe hypothalamus-hypophyse-glande surrénale est hypo-actif sont plus susceptibles de développer des maladies autoimmunes parce que leurs fonctions immunitaires ne sont pas soumises à une régulation négative efficace (Wilder, 1995; Sternberg, 2000). Chez des patients stressés ou dépressifs (axe hypothalamus-hypophyse-glande surrénale hyper-actif), la résistance aux maladies infectieuses est amoindrie et la progression des tumeurs cancéreuses est accrue (Holden *et al.*, 1998; Sternberg, 2000). Inversement, les traitements médicaux à base d'interleukines ou d'interférons (notamment utilisés dans le traitement des cancers) provoquent souvent l'apparition de syndromes dépressifs (Kronfol et Remick, 2000).

2.2. Cas des invertébrés.

2.2.1. Principales composantes du système immunitaire des invertébrés.

Les invertébrés possèdent une forme d'immunité innée, mais pas d'immunité adaptative.

Kasahara *et al.* (1999, 2000) ont récemment donné une explication à l'absence d'immunité adaptative chez les invertébrés. Ces auteurs ont en effet montré que les composantes indispensables du système immunitaire adaptatif des vertébrés (notamment le complexe majeur d'histocompatibilité, voir Figure 7) sont apparues à la suite de deux étapes de duplication de blocs de gènes (phénomène appelé paralogie) qui ont toutes deux eu lieu chez les chordés. La première serait survenue il y a environ 515 millions d'années chez un ancêtre commun à tous les vertébrés et la deuxième aurait eu lieu chez un ancêtre commun à tous les gnathostomes. Ces duplications ont généré quatre ensembles de gènes paralogues qui ont ensuite évolué indépendamment et ont donné naissance aux principaux systèmes spécifiques de reconnaissance du soi et du non-soi.

La réponse immunitaire des invertébrés, comme celle des vertébrés, nécessite une étape de reconnaissance des substances étrangères et la mise en place d'une réponse visant à éliminer ces substances.

A. Reconnaissance du non-soi.

Chez les invertébrés, la reconnaissance du non-soi fait intervenir des protéines plasmatiques ou membranaires reconnaissant des motifs structuraux invariants spécifiques de différents groupes de pathogènes (Figure 10). Parmi ces molécules, se trouvent des protéines liant les lipopolysaccharides (caractéristiques des bactéries à Gram négatif), des protéines reconnaissant les motifs β-1,3 glucans de cellules fongiques ou des lectines et collectines qui

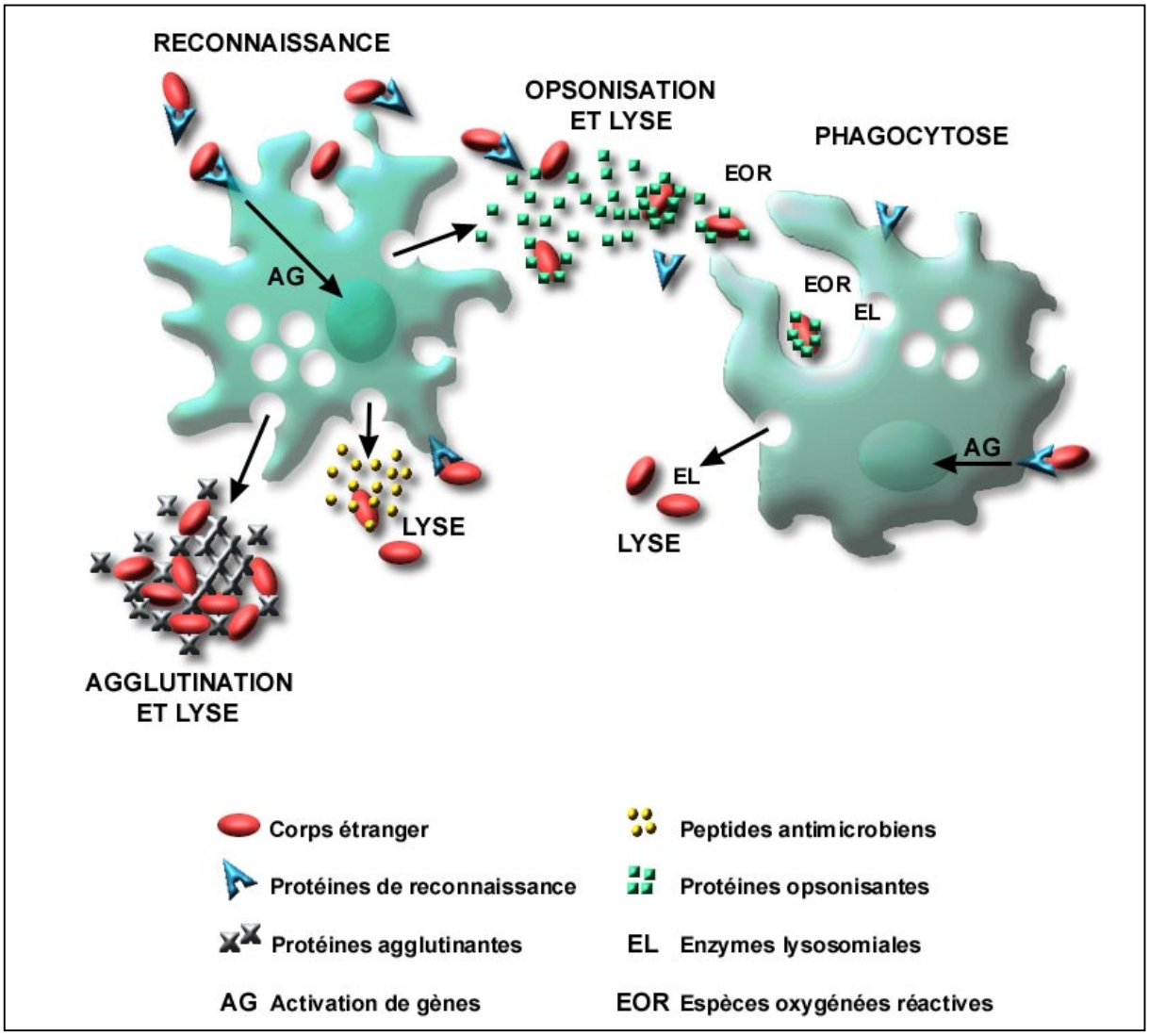

Figure 10. Représentation schématique de la réponse immunitaire chez les invertébrés.
Les cellules immunitaires des invertébrés sont appelées hémocytes ou cœlomocytes ou encore amibocytes. Une étape de reconnaissance fait intervenir des protéines liant des motifs structuraux invariants caractéristiques de certains micro-organismes. En plus de leurs fonctions de reconnaissance, ces molécules présentent souvent des propriétés opsonisantes, agglutinantes ou antimicrobiennes. La reconnaissance de corps étrangers active des cascades de gènes et diverses réactions de défenses telles que la production de peptides antimicrobiens, de protéines agglutinantes ou de protéines opsonisantes qui faciliteront la phagocytose. Des enzymes lysosomiales et des espèces oxygénées réactives sont aussi libérées à l'intérieur du phagosome ou dans le milieu extracellulaire. La réponse immunitaire est vraisemblablement régulée et coordonnée par des messagers de type cytokines qui agiraient selon des modes autocrines, paracrines ou endocrines.

reconnaissent un large spectre de microbes et de virus. Ces protéines n'exercent généralement pas uniquement une fonction de reconnaissance, elle possèdent souvent des propriétés antimicrobiennes, agglutinantes ou opsonisantes et elles provoquent des inductions successives de gènes et des cascades protéolytiques qui conduisent à la mise en place de réponses humorales et cellulaires plus généralisées.

Par exemple, dans l'hémolymphe du ver *Eisenia foetida*, le CCF (Coelomic Cytolytic Factor), une protéine de 42 kDa liant les lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives, les β-1,3-glucans et la *N,N'*-diacétylchitibiose des levures est aussi capable de déclencher la cascade de la prophénoloxydase et présente des similarités fonctionnelles avec le TNF de mammifères (Beschin *et al.*, 1998, 1999; Bloc *et al.*, 2000).

Chez les insectes, la reconnaissance de motifs structuraux de micro-organismes déclenche l'activation de gènes codant des molécules de défenses telles que des peptides antimicrobiens. Bien qu'aboutissant à l'activation de gènes différents, certaines de ces voies de transduction du signal ont des homologues chez les mammifères. Par exemple, la voie induite par l'activation du récepteur Toll est très similaire chez la drosophile et chez les mammifères (Aderem et Ulevitch, 2000). Chez les mammifères, cette voie active notamment des gènes de cytokines, alors que chez la drosophile, elle active des gènes de peptides antimicrobiens (Figure 11).

B. Les effecteurs de la réaction immunitaire

La réponse immunitaire implique à la fois des substances humorales et des cellules (appelées hémocytes, cœlomocytes ou amibocytes, voir Figure 10).

Les hémocytes d'invertébrés présentent de nombreuses similitudes fonctionnelles et structurales avec les cellules de la lignée des monocytes/macrophages des vertébrés (Bayne, 1990; Renwrantz, 1990). Au cours de la réaction de défense immunitaire, l'un des rôles

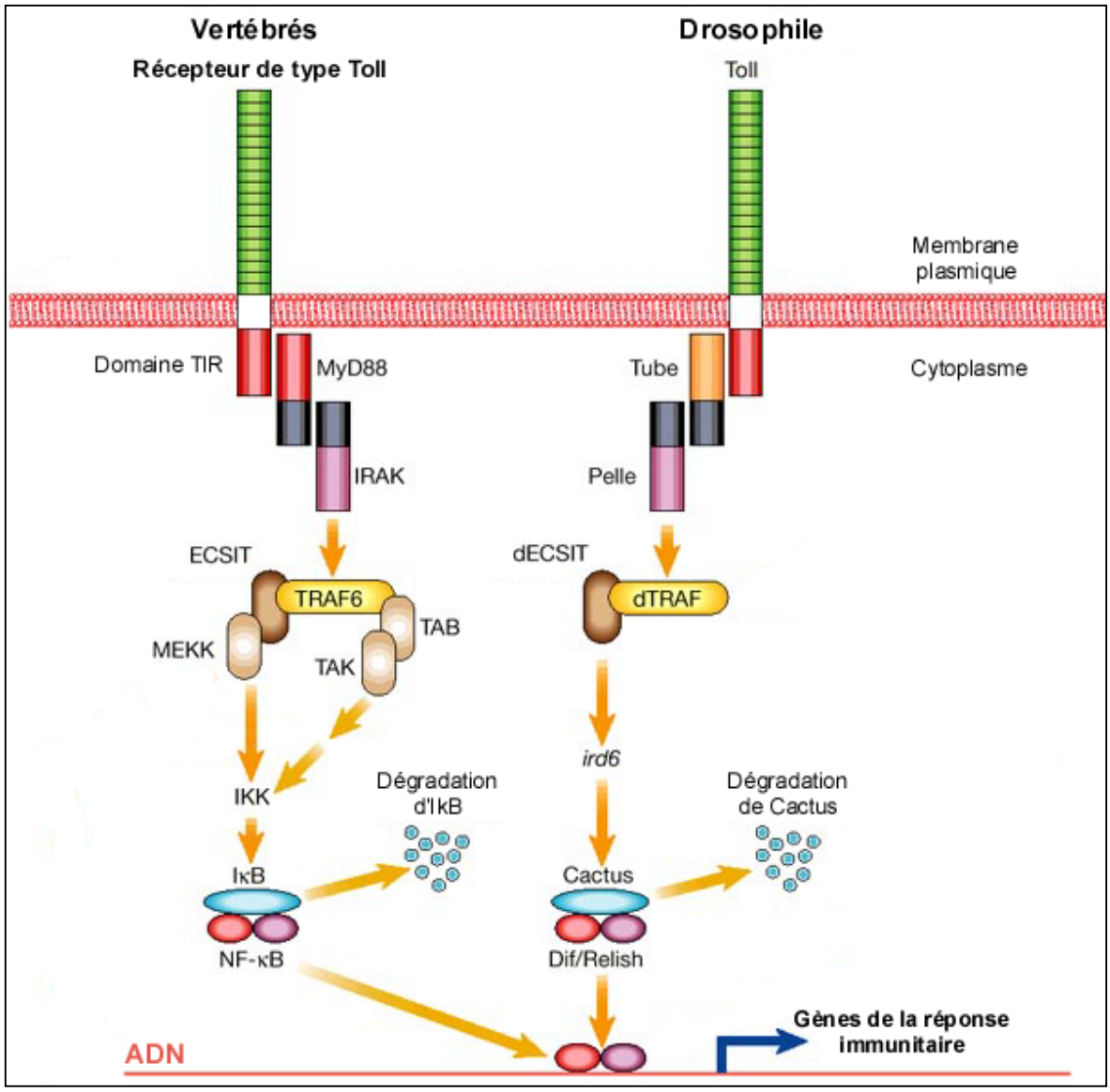

Figure 11. Représentation schématique d'une cascade d'activation de gènes similaire chez les vertébrés et la drosophile : la voie Toll.
Le domaine intracellulaire du récepteur Toll de drosophile (homologue du domaine TIR du récepteur de type Toll de vertébrés) se lie à l'adaptateur Tube (homologue fonctionnel de la protéine MyD88 de vertébrés). Tube se lie à la kinase Pelle (homologue de la kinase IRAK de vertébrés). Ceci active une série de protéines telles que dTRAF et dECSIT (homologues de TRAF et ECSIT des vertébrés) et des intermédiaires dont on connaît mal les mécanismes d'action tels que les protéines exprimées par des gènes *ird*. Finalement, la protéine Cactus (homologue d'IκB) est dégradée, ce qui libère les facteurs de transcription Dif et Relish (homologues de NF-κB) et permet l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. (modifié d'après Aderem et Ulevitch, 2000).

Certains composants de cette voie de signalisation sont aussi présents chez les mollusques. Par exemple, les hémocytes d'huîtres expriment une IκB-kinase (IKK) homologue à celle des mammifères (Escoubas *et al.*, 1999).

principaux de ces cellules est de phagocyter les corps étrangers. Le processus de phagocytose a été décrit en détail chez les mollusques (Renwrantz, 1990). Comme chez les vertébrés, il se décompose en trois étapes, (1) la reconnaissance du corps étranger, (2) son internalisation grâce à des extensions cytoplasmiques ou pseudopodes, qui permettent la formation d'une vacuole ou phagosome et (3) la fusion de lysosomes à la membrane du phagosome afin d'y libérer des enzymes à activités bactériolytiques et bactériotoxiques (Krosckinski et Renwrantz, 1988; Renwrantz, 1990) telles que du lysozyme, de la phosphatase acide, de la β-glucuronidase ou de la leucine aminopeptidase (Gourdon *et al.*, 1998; Malham *et al.*, 1998).

Au contact d'un corps étranger, la NADPH oxydase, une enzyme présente à la surface des hémocytes, est aussi activée. Ceci initie une réaction appelée "choc respiratoire" (ou plus couramment "burst oxydatif"). Cette réaction produit des espèces oxygénées réactives (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyles...) et des espèces azotées réactives (NO, NO_2^-, NO_3^-...) qui détruisent la particule étrangère enfermée dans le phagosome (Torreilles *et al.*, 1996; Pipe *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2001).

Les espèces oxygénées réactives et les enzymes lysosomiales peuvent aussi être libérées dans le milieu extracellulaire (Cheng *et al.*, 1975; Pipe *et al.*, 1997) où elles participent à la réaction humorale. Les hémocytes d'invertébrés et certains tissus tels que le corps gras des insectes, synthétisent aussi divers peptides antibactériens, antifongiques ou cytolytiques qui sont libérés dans l'hémolymphe de façon constitutive ou en réponse à une infection (Charlet *et al.*, 1995; Destoumieux *et al.*, 1997; Hétru *et al.*, 1998; Mitta *et al.*, 2000a, b).

De plus, des protéines homologues aux galectines et aux protéines MASP (Mannose-binding lectin-Associated Serine Protease) et C3 du complément des vertébrés ont été identifiées chez les échinodermes et les prochordés, il est donc possible qu'une forme de cascade protéolytique ressemblant à la cascade du complément existe au moins chez les

deutérostomes (Nonaka et Azumi, 1999; Vasta *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2000). Chez la limule, la présence de lipopolysaccharides dans l'hémolymphe déclenche une autre forme de cascade protéolytique menant à la conversion du coagulogène (une protéine libérée par les hémocytes) en un gel insoluble. Cette réaction vise à circonscrire l'infection (Iwanaga *et al.*, 1998). Chez les insectes et les crustacés, une cascade protéolytique implique la prophénoloxydase, une proenzyme inactive libérée par les hémocytes après reconnaissance de motifs β-1,3 glucans ou lipopolysaccharidiques. Au niveau des sites d'infection, la prophénoloxydase est activée et une succession de réactions enzymatiques mènent à la formation de composés toxiques (quinones, anions superoxydes) et de mélanine (Nappi *et al.*, 1995; Iwanaga *et al.*, 1998; Söderhäll et Cerenius, 1998; Carton et Nappi, 2000).

C. Les cytokines chez les invertébrés

Des substances cytokine-like semblent jouer un rôle dans la coordination et la régulation de la réponse immunitaire chez les invertébrés. Les gènes de ces cytokines n'ont pas encore été caractérisés mais par des approches immunohistochimiques, des molécules de type interleukine-1 ont été mises en évidence chez les mollusques, les annélides, les échinodermes, les insectes et les prochordés. Des substances de type TNF-α ont été décrites chez les gastéropodes et les bivalves ainsi que chez la mouche *Calliphora vomitoria* et chez le ver *Eisenia foetida*. Enfin, des molécules de type interleukine-2 existent chez les mollusques et de l'interleukine-6 semble présente chez les bivalves, les gastéropodes et l'étoile de mer *Asteria forbesi* (pour revue, voir Ottaviani et Franceschi, 1997). Ces substances sont principalement produites par les hémocytes (Ottaviani et Franceschi, 1997) ou par les neurones (Stefano *et al.*, 1991; Pestarino *et al.*, 1997). Certains auteurs sont parvenus à purifier des substances de type interleukines-1 et 6 et à montrer qu'elles stimulent la phagocytose chez les invertébrés (Beck *et al.*, 1991, 1993, 1996; Raftos *et al.*, 1991, 1992).

Récemment, Barcia *et al.* (1999) ont montré que des récepteurs d'interleukine-2 sont présents à la surface des hémocytes de moule *Mytilus galloprovincialis* et Beck *et al.* (2000) ont purifié et caractérisé un récepteur d'interleukine-1 à partir d'hémocytes d'étoile de mer *Asteria forbesi*. L'interleukine-1 de mammifère ainsi que l'interleukine-1-like d'échinodermes peuvent se fixer à ce récepteur, ce qui suggère que la structure tridimensionnelle de cette cytokine a été au moins partiellement conservée au cours de l'évolution. Nous verrons dans la deuxième section de cette thèse que l'interleukine-1 de mammifère peut aussi stimuler la production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huître.

2.2.2. Neuroimmunologie du stress chez les invertébrés (Figure 12).

Relativement peu d'informations sont disponibles concernant les interactions entre le système immunitaire et le système neuroendocrine chez les invertébrés et la majorité des études dans ce domaine ont été menées *in vitro*.

A. Effet des "hormones de stress" sur le système immunitaire.

Nous avons vu précédemment que les hémocytes de mollusques, d'annélides et d'insectes produisent de la CRH et de l'ACTH. Ceci a amené divers auteurs à examiner l'effet de ces hormones sur les fonctions hémocytaires.

Ottaviani *et al.* (1990, 1991) et Genedani *et al.* (1994) ont montré que la CRH et l'ACTH de mammifères stimulent, *in vitro*, l'activité phagocytaire des hémocytes de mollusques. Certains fragments d'ACTH de mammifères provoquent aussi un réarrangement du cytosquelette et stimulent la mobilité des cellules immunitaires de moule. Le rôle de cette hormone n'est cependant pas clair parce que d'autres fragments d'ACTH inhibent la migration et la phagocytose chez les mollusques (Ottaviani et Franceschi, 1996). Les effets

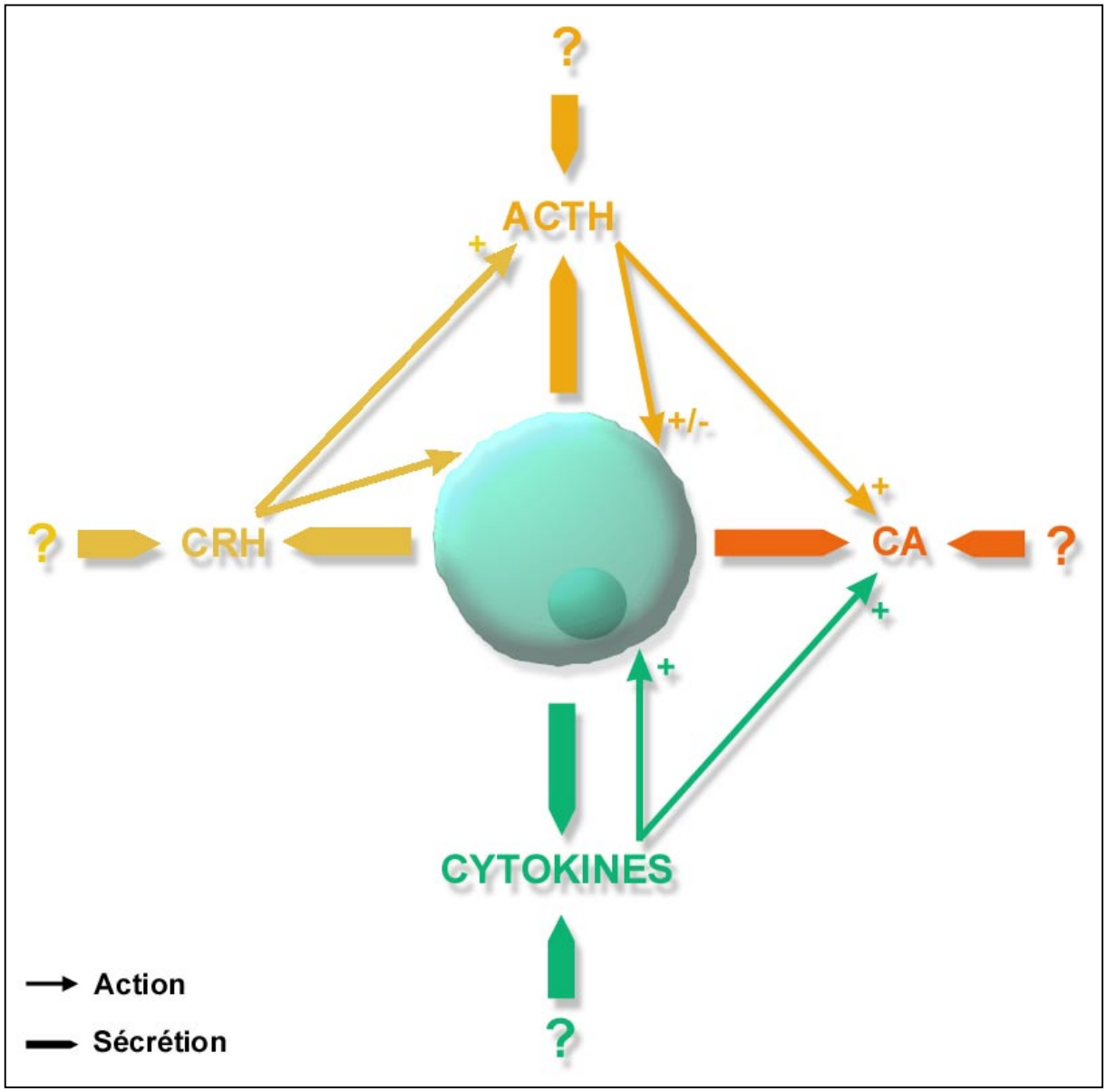

Figure 12. Représentation schématique des cascades hormonales et des mécanismes neuroendocrines au niveau de l'hémocyte de mollusque.
L'hémocyte produit de la CRH qui stimule la libération d'ACTH. L'ACTH exerce un effet stimulateur ou inhibiteur sur les fonctions hémocytaires et active la libération de catécholamines. Des cytokines régulent aussi les fonctions hémocytaires et stimulent la libération de catécholamines. Toutes ces substances peuvent probablement émaner d'autres cellules que les cellules immunitaires, comme les neurones par exemple, mais peu d'informations sont disponibles à ce sujet.

CRH, "corticotropin releasing hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone", CA, catécholamines; (+), effet stimulateur; (+/-), effet stimulateur ou inhibiteur; (?), autres sources possibles (neurones par exemple).

immunosuppresseurs de l'ACTH ne sont cependant probablement pas dûs à une action directe de l'hormone sur les immunocytes. Shipp et al. (1990) et Smith et al. (1992) ont montré que l'ACTH présente des effets inhibiteurs parce qu'elle est convertie en α-MSH (un dérivé immunosuppresseur de la POMC) par une NEP (neutral endopeptidase) présente sur la membrane des cellules immunitaires de mollusques (et de vertébrés). La β-endorphine stimule aussi la migration des hémocytes de moule.

Les effets de ces hormones peuvent être bloqués par un antagoniste des récepteurs d'opioïdes (la naloxone) et des récepteurs d'opioïdes de type δ et μ ont été mis en évidence à la surface des hémocytes de mollusques et d'insectes (Stefano *et al.*1993; Stefano et Salzet 1999). Ceci confirme que les hémocytes d'invertébrés sont soumis à l'action autocrine, paracrine ou endocrine de certains opioïdes.

Le parasite *Schistosoma mansoni* utilise d'ailleurs cette voie de régulation à son profit. *Schistosoma mansoni* est un trématode parasite pour l'homme dont l'un des hôtes intermédiaires est le gastéropode *Biomphalaria glabrata*. A l'intérieur de l'organisme hôte, le trématode produit de l'ACTH qui, convertie en α-MSH par la NEP, exerce un effet immunosuppresseur et permet au parasite d'échapper aux système immunitaire du mollusque ainsi qu'à celui de l'homme (Duvaux-Miret *et al.*, 1992).

Les effets des corticostéroïdes sur le système immunitaire des invertébrés demeurent inconnus et l'influence des catécholamines sur les fonctions hémocytaires des invertébrés a été examinée pour la première fois dans le cadre de cette thèse.

B. Effets des cytokines sur la production "d'hormones de stress".

Ottaviani et Franceschi (1996) ont montré que l'interleukine-1, l'interleukine-2, le TNF-α et le TNF-β stimulent la libération de catécholamines par les hémocytes de

mollusques *in vitro*, mais les effets de ces cytokines sur le système neuroendocrine des invertébrés restent inconnus.

CONCLUSION

Nous avons vu que des hormones telles que la CRH, l'ACTH et les catécholamines semblent avoir été conservées au cours de l'évolution entre les invertébrés et les vertébrés. Certaines de ces hormones (les opioïdes, notamment) ont d'ailleurs été mises en évidence chez certains protozoaires (LeRoith, 1982); elles seraient donc plus anciennes que les métazoaires. De plus, il semble que certains processus neuroendocrines ou immunitaires présentent une forte homologie entre les invertébrés et les vertébrés (Hughes, 1998). Par exemple, les cellules immunitaires des invertébrés et des vertébrés produisent des opioïdes (Ottaviani et Franceschi, 1996, 1997; Stefano et Salzet, 1999) et certaines voies d'activations de gènes, telles que la voie Toll, existent chez les insectes et les mammifères (Aderem et Ulevitch, 2000).

Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt des mollusques comme modèle d'étude des relations entre le système neuroendocrine et le système immunitaire (Clatworthy, 1996; 1998; Ottaviani et Franceschi, 1996; 1997; Stefano et Salzet, 1999). Les mollusques existent en effet depuis le précambrien et ils constituent le second phylum en terme de nombre d'espèces, ce qui suggère que ces invertébrés disposent de systèmes adaptatifs efficaces. Leur système immunitaire est encore insuffisamment connu, mais leur système nerveux est relativement simple et assez bien caractérisé aux niveaux fonctionnel, cellulaire et moléculaire (Clatworthy, 1998). Par conséquent, la relative simplicité des mollusques permet d'étudier des mécanismes de base des relations neuroendocrino-immunitaires qui sont souvent rendus inaccessibles par la complexité des modèles vertébrés (Ottaviani, 1996; Clatworthy, 1998).

Dans la suite de cette thèse, nous avons cherché à apporter de nouvelles informations concernant la neuroendocrinologie et la neuroimmunologie du stress chez les mollusques. Plus précisémment, nous avons examiné le rôle des catécholamines dans la réponse au stress

SECTION II : NEUROENDOCRINOLOGIE ET NEUROIMMUNOLOGIE DU STRESS CHEZ L'HUÎTRE

PARTIE I. LA RÉPONSE NEUROENDOCRINE AU STRESS CHEZ L'HUÎTRE

Chapitre 1. Mise en évidence d'une réponse catécholaminergique au stress chez l'huître

Nous avons vu dans la section I que les bivalves et les gastéropodes possèdent des neuropeptides de type CRH et ACTH ainsi que des catécholamines. Il semble donc que certains des principaux acteurs hormonaux de la réponse au stress des vertébrés soient aussi présents chez les mollusques. Ottaviani et Franceschi (voir Ottaviani et Franceschi, 1996; 1997 pour revues) ont aussi mis en évidence des cascades hormonales impliquant successivement la CRH, l'ACTH et des catécholamines au niveau des hémocytes de bivalves et de gastéropodes. Les expériences de ce groupe de recherche ont cependant toutes été réalisées *in vitro* sur des hémocytes isolés. Elles ne permettent pas de déterminer si ces cascades hormonales sont uniquement impliquées dans des mécanismes immunorégulateurs ou si elles prennent part à une réponse neuroendocrine au stress influant sur les diverses fonctions physiologiques de l'organisme.

Dans un premier temps, nous avons choisi de quantifier les concentrations en catécholamines circulantes chez l'huître *in vivo* afin de déterminer si ces hormones sont impliquées dans une forme de réponse neuroendocrine au stress chez les mollusques. Dans l'hypothèse où les catécholamines seraient effectivement sécrétées au cours de la réponse au stress, nous espérions pouvoir disposer (i) d'un outil permettant d'étudier la réponse au stress chez un modèle invertébré et (ii) d'un moyen d'évaluer l'état de stress de l'huître en aquaculture, en laboratoire ou dans le milieu naturel.

La mesure des concentrations en CRH et/ou ACTH aurait aussi pu constituer un outil intéressant mais les méthodes de détection de ces composés (techniques RIA - "radioenzymatic immunoassay"- ou EIA - "enzymatic immunoassay") nécessitent des

anticorps spécifiques de l'ACTH et de la CRH de mollusques. De tels anticorps ne sont pas disponibles aujourd'hui.

La détection des catécholamines se fait principalement par chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique (CLHP-DE). Les catécholamines sont d'abord extraites de l'échantillon (solution préparée à partir de tissus, de cellules, de plasma sanguin ou, dans notre cas, d'hémolymphe) par adsorption sur de l'alumine dans un tampon à fort pH (en général pH 8). Les autres substances contenues dans l'échantillon sont ensuite éliminées par des lavages successifs puis les catécholamines sont désorbées de l'alumine par abaissement du pH (pH 4). Les différentes catécholamines contenues dans l'extrait sont ensuites séparées à l'aide d'une colonne de type C18 en CLHP à phase inverse. Finalement, un détecteur électrochimique permet de quantifier la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Le composant principal de ce type de détecteur est la cellule électrochimique. Au sein de cette cellule, un potentiel (0.5 à 0.7 mV) est appliqué entre une électrode auxilliaire et une électrode de mesure. L'éluat provenant de la colonne de CLHP traverse la cellule. Les groupements hydroxyles des catécholamines sont oxydés au niveau de l'électrode de mesure (Figure 13) ce qui résulte en une perte d'électrons et donc en un courant électrique dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de la substance traversant la cellule électrochimique. Ce courant est amplifié et matérialisé sous la forme d'un chromatogramme.

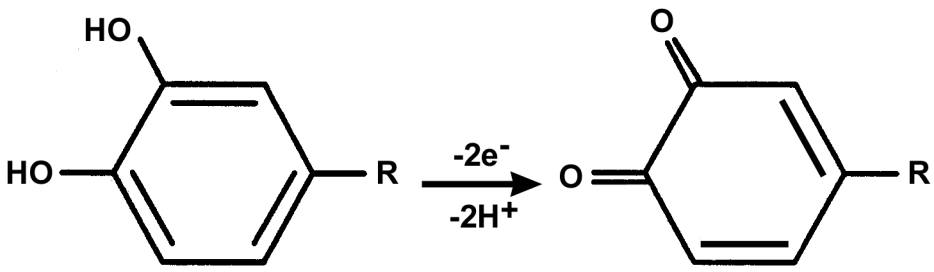

Figure 13. Réaction d'oxydation des groupements hydroxyles des catécholamines au niveau de l'électrode de mesure du détecteur électrochimique.

1.1. Régulation de la réponse catécholaminergique au stress chez l'huître

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les catécholamines sont impliquées dans la réponse neuroendocrine au stress chez l'huître *in vivo*.

Les travaux présentés dans la **publication n°1** montrent que deux catécholamines, la noradrénaline et la dopamine, sont libérées dans l'hémolymphe des huîtres en réponse à un facteur de stress expérimental consistant à agiter les huîtres. Ces catécholamines sont produites et libérées au niveau de cellules présentant des similitudes morphologiques et biochimiques avec les cellules chromaffines de vertébrés.

Nous avons ensuite utilisé une approche pharmacologique pour essayer de déterminer si, comme chez les vertébrés, la libération de catécholamines par les cellules chromaffines d'huîtres est sous contrôle cholinergique. Nos résultats indiquent que l'acétylcholine n'est pas impliquée dans la libération de noradrénaline et de dopamine. Il semble que des neuropeptides tels que l'ACTH soient responsables de la sécrétion de ces catécholamines dans l'hémolymphe.

Publication n°1

Journal of Experimental Biology 204, 1247-1255

Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusc *Crassostrea gigas*

A. LACOSTE*, S. K. MALHAM, A. CUEFF, F. JALABERT, F. GELEBART AND S. A. POULET

Station Biologique de Roscoff, CNRS, INSU, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6 - B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France

* Author for correspondence (e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr)

Manuscript information: 19 pages, 5 figures.

Author for correspondence:
Arnaud LACOSTE
Station Biologique de Roscoff, CNRS, INSU, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France
Phone: (33) 02.98.29.23.23
Fax: (33) 02.98.29.23.24
e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Acknowledgements: This work was supported by grants from the North Brittany research program GIGASMOR and from the Conseil Régional de Bretagne. We thank Drs Serge Thomas and Laurent Meijer for critical review of the manuscript.

Summary

Catecholamines (CA) and pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides, some of the central regulators of the stress-response systems of vertebrates, are also present in invertebrates. However, studies are needed to determine how these hormones take part in the organisation of neuroendocrine stress-response axes in invertebrates. The present work provides evidence for the presence of an adrenergic stress-response system in the oyster *Crassostrea gigas*. Noradrenaline (NA) and dopamine (DA) are released in the circulation in response to stress. Storage and release of these hormones take place in neurosecretory cells presenting morphological and biochemical similarities with vertebrate chromaffin cells. Both *in vivo* and *in vitro* experiments showed that applications of the neurotransmitters acetylcholine (ACh) or carbachol did not cause any significant release of NA or DA. Moreover, the nicotinic antagonists hexamethonium (HEX) and α-bungarotoxin (BGT) and the muscarinic antagonist atropine (ATR) did not cause any significant inhibition of the CA release in stressed oysters. Adrenocorticotropic hormone (ACTH), induced a significant release of NA, the release of DA was not significant. These results suggest that, unlike vertebrates, the adrenergic stress-response system of oysters is not under the control of acetylcholine. Other factors such as the neuropeptide ACTH might control this system.

Key Words: catecholamine, noradrenaline, dopamine, acetylcholine, ACTH, chromaffin cell, stress, mollusc, *Crassostrea gigas*

Publication n°2

General and Comparative Endocrinology 122, 181-188

Stress-induced Catecholamine Changes in the Hemolymph of the Oyster, *Crassostrea gigas*

Arnaud Lacoste, Shelagh K. Malham, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

Corresponding author: Arnaud Lacoste, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France. Phone: +33 (0)2 98 29 23 23; fax: +33 (0)2 98 29 23 24; e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Short title: Stress and Catecholamines in Oyster

The stress-response is a series of coordinated physiological reactions increasing an organism's capacity to maintain homeostasis in the presence of threatening agents. This fundamental process is known to involve hormonal signaling to rapidly modulate key physiological functions in vertebrates, but data are lacking concerning neuroendocrine responses to stress in invertebrates. The present study examined circulating catecholamine (CA) responses to stress in oysters. Mechanical disturbances (consisting in shaking the animals) and temperature or salinity variations were applied to the animals because these three types of stressors are commonly encountered by oysters in aquaculture or in their natural habitat. Results show that both circulating noradrenaline (NA) and dopamine (DA) concentrations increased in response to stress. The catecholaminergic response to acute mechanical stressors was rapid (less than 5 minutes), transient (a return to basal CA levels was observed after 60-90 minutes) and reflected both the intensity and duration of the perturbation. In contrast, responses to temperature and salinity variations were long lasting (up to 72 hours). CA concentrations varied from 1.61 ± 0.30 ng NA/ml and 0.41 ± 0.05 ng DA/ml to maximal values of 22.07 ± 0.97 ng NA/ml and 2.24 ± 0.19 ng DA/ml. Such CA concentrations are known to induce physiological responses in bivalves, suggesting that stress-induced NA and DA changes exert a regulatory function in oysters.

***Key Words: Crassostrea gigas*; Mollusc; Catecholamines; Noradrenaline; Dopamine; Stress**

Chapitre 2. Propriétés particulières des cellules chromaffines d'huîtres *in vitro*

Chez les vertébrés, les cellules chromaffines et les neurones sympathiques dérivent d'un même précurseur cellulaire formé à partir des cellules de la crête neurale de l'embryon (Allan et Newgreen, 1977; Vogel et Weston, 1990; Anderson, 1993). La destinée de ce précurseur cellulaire est déterminée, au cours du développement embryonnaire, par la nature des facteurs de croissance et des hormones qu'il rencontre pendant sa migration. Les cellules qui se trouvent sous l'influence de NGF ("nerve growth factor") se différencieront en neurones catécholaminergiques alors que les cellules qui colonisent la glande surrénale vont se différencier en cellules chromaffines. Les facteurs conduisant à l'acquisition d'un phénotype de type cellule chromaffine sont mal connus. Le cortisol sécrété par les cellules stéroïdogènes de la glande surrénale a longtemps été considéré comme responsable de la différenciation des précurseurs issus de la crête neurale en cellules chromaffines (Landis et Patterson, 1981; Doupe *et al.*, 1985; Anderson, 1993). Une étude récente a cependant montré que des souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur des glucocorticoïdes possèdent un nombre normal de cellules chromaffines. Les cellules chromaffines de ces animaux sont déficientes en PNMT (phényléthanolamine-*N*-méthyltransferase), elles ne peuvent donc pas synthétiser d'adrénaline (Figure 4), mais elles possèdent la morphologie et les caractéristiques ultrastructurales typiques des cellules chromaffines de souris normales (Finotto *et al.*, 1999). Il semble donc que l'influence des glucocorticoïdes soit nécessaire à l'expression de la PNMT, mais pas à l'acquisition des autres caractéristiques du phénotype des cellules chromaffines.

En présence de NGF, les cellules chromaffines matures de mammifères conservent la propriété de se différencier *in vitro* et *in vivo* en cellules dont les caractéristiques

morphologiques, ultrastructurales et biochimiques sont semblables à celles des neurones sympathiques. En effet, elles développent des extensions semblables à des axones, elles forment des synapses fonctionnelles et elles expriment des marqueurs (protéine de neurofilament, par exemple) spécifiques des neurones (Unsicker *et al.*, 1978; 1996; Doupe *et al.*, 1985; Förander *et al.*, 1998). Une étude récente a montré qu'en présence de NGF, les cellules chromaffines d'amphibiens sont aussi capables d'acquérir un phénotype de neurone *in vitro* (Shepherd et Holzwarth, 1998).

De fortes similitudes existent entre le développement des neurones de mollusques et la formation de cellules nerveuses à partir de la crête neurale, chez les vertébrés (Mc Allister *et al.*, 1983). Par exemple, les neurones d'aplysie se développent à partir de cellules issues d'une zone de l'ectoderme et migrent jusqu'à l'emplacement des ganglions (Mc Allister *et al.*, 1983). Des études récentes ont aussi montré que le gastéropode *Lymnaea stagnalis* possède un récepteur de type Trk (van Kesteren *et al.*, 1998), un type de récepteur à tyrosine kinase spécifique des neurotrophines chez les mammifères. De plus, le NGF stimule la croissance des neurones de gastéropodes et module l'activité des synapses de céphalopodes *in vitro* (Ridway *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1998). Ces études suggèrent que des mécanismes de signalisation impliquant le NGF et des récepteurs de type Trk sont présents chez les mollusques.

Dans la **publication n°3**, nous avons donc examiné les effets du NGF sur les cellules chromaffines d'huîtres *in vivo*. Nous montrons que les cellules chromaffines d'huîtres acquièrent des caractéristiques morphologiques et biochimiques de neurones catécholaminergiques en présence de NGF. Ces cellules sont aussi capables d'acquérir une morphologie et des caractéristiques biochimiques de cellules gliales.

Publication n°3

Mollusc chromaffin cells can acquire neural stem cell attributes

Arnaud Lacoste, Shelagh K. Malham, Anne Cueff & Serge A. Poulet Article en préparation

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU, Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

Chromaffin cells play essential roles in molecular, cellular and developmental neurobiology. In mammals, they are located in the adrenal medulla and they secrete a wide range of bioactive molecules including hormones, cytokines, neurotrophins and growth factors. These neuroendocrine cells also share common features with sympathetic neurons, both are neural crest derivatives and chromaffin cells multiply, enlarge and elaborate neurite-like processes in the prolonged presence of nerve growth factor (NGF) *in vitro*[1, 2]. Chromaffin cells have recently been identified and characterised in the mollusc *Crassostrea gigas*[3]. Here we show that, as in vertebrates, NGF induces oyster chromaffin cells to differentiate into cells that resemble catecholaminergic neurons. Moreover, in the presence of interleukin-3, oyster chromaffin cells differentiate into amoeboid phagocytes expressing catecholamines, adrenocorticotropin (ACTH), interleukin-1α (IL-1α), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and gliary fibrillary acidic protein (GFAP), suggesting that these cells are apparented to glial cells. These results show that mollusc chromaffin cells can acquire neural stem cells attributes.

PARTIE II. EFFETS DE LA NORADRÉNALINE SUR LES FONCTIONS IMMUNITAIRES DE L'HUÎTRE

Les études réalisées dans la partie I montrent que la noradrénaline est la principale catécholamine présente dans l'hémolymphe.

La noradrénaline est capable de moduler les fonctions des cellules immunitaires chez les vertébrés grâce à des récepteurs α ou β-adrénergiques (voir l'introduction générale) mais les effets de cette catécholamine sur les fonctions immunitaires des invertébrés n'ont pas été étudiés. Dans cette partie, nous avons donc examiné, *in vitro*, comment des doses physiologiques de noradrénaline influent sur la production d'espèces oxygénées réactives, sur l'activité de phagocytose et sur la viabilité des hémocytes d'huîtres.

Chapitre 1. Effets de la noradrénaline sur la production d'espèces oxygénées réactives

Nous avons vu dans la section I qu'en présence de corps étrangers, les cellules immunitaires d'invertébrés sont capables de produire des radicaux oxygénés toxiques. Il semble que cette réponse, appelée choc respiratoire (ou "burst" oxydatif), soit un mécanisme de protection existant chez la plupart des espèces animales (Torreilles *et al.*, 1996) et les principaux mécanismes enzymatiques impliqués dans le choc respiratoire semblent similaires chez les vertébrés et les mollusques (Bachère *et al.*, 1991; Anderson, 1994; Torreilles *et al.*, 1996). La réponse débute par l'activation d'une **NADPH oxydase** membranaire catalysant la réduction univalente de l'oxygène cellulaire en ion superoxyde:

$$O_2 + NADPH \rightarrow O_2^- + NADP^+ + H^+$$

Cette première réaction provoque une consommation accrue d'oxygène d'où les termes "choc respiratoire" ou "burst oxydatif". La majeure partie des ions superoxydes est convertie en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), par réaction spontanée ou par une réaction enzymatique catalysée par la **superoxyde dismutase**:

$$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène constitue un agent antimicrobien efficace, mais il est généralement converti en espèces oxygénées plus toxiques comme l'acide hypochloreux grâce à une **myéloperoxydase**:

$$Cl^- + H_2O_2 \rightarrow OCl^- + H_2O$$

En présence d'une sonde luminogène telle que le luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione), la myéloperoxydase convertit ce composé en aminophtalate au cours d'une

réaction s'accompagnant d'une émission de photons. La quantité de lumière produite peut être mesurée grâce à un luminomètre, ce qui donne une estimation indirecte de la quantité de peroxyde d'hydrogène produit par les cellules.

Cette technique, couramment employée en immunologie des vertébrés et invertébrés, a été utilisée dans les deux études suivantes pour examiner l'effet de la noradrénaline sur la production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huîtres.

1.1. Effets de la noradrénaline seule

Les résultats présentés dans la **publication n°4**, montrent que des doses physiologiques de noradrénaline inhibent la production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huîtres *in vitro*. De plus, une approche pharmacologique indique que les effets de la noradrénaline impliquent des récepteurs β-adrénergiques.

Publication n°4

Developmental and Comparative Immunology 25, 285-289

Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via β-adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*

Arnaud Lacoste*, Shelagh K. Malham, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

*Corresponding author: Tel.: +33 (0)2 98 29 23 23; fax: +33 (0)2 98 29 23 24;

E-mail address: lacoste@sb-roscoff.fr

Abbreviations: CA, Catecholamine; ACTH, Adrenocorticotropic hormone; NA, noradrenaline; ROS, reactive oxygen species; CL, chemiluminescence

Abstract

Catecholamines (CA) are known to be present in the microenvironment of molluscan immunocytes. In the present study, experiments were conducted to determine the effects of noradrenaline (NA), the principal CA circulating in bivalve hemolymph, on the luminol-dependent chemiluminescence (CL) of oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. Results show that NA had a dose-dependent inhibitory effect on the CL-response at the physiological concentration of 0.1 μM and above. The α-adrenoceptor agonist phenylephrine had no significant effect on the CL-response whereas the β-adrenoceptor agonist isoproterenol mimicked the inhibitory effects of NA on the CL-response. The β-adrenoceptor antagonist propanolol, but not the α-adrenoceptor antagonist prazosin, prevented the negative effects of NA on the CL-response. Taken together, these results show that β-adrenergic receptors are present at the surface of oyster hemocytes and allow NA to down-regulate the CL-response.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Hemocytes; Reactive oxygen species; Luminol-dependent chemiluminescence; Catecholamines; Noradrenaline; Adrenergic receptors

1.2. Effets conjugués de la noradrénaline et du pouvoir immunostimulant de l'interleukine-1

Les hémocytes de mollusques sont vraisemblablement sous l'influence antagoniste de substances immunosuppressives, telles que la noradrénaline, et de molécules immunostimulantes, telles que des cytokines (voir introduction générale).

Les résultats présentés dans la **publication n°5**, montrent que l'interleukine-1 de mammifère est capable de stimuler la production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huîtres *in vitro*. Nous avons donc cherché à déterminer si les effets immunosuppresseurs de la noradrénaline pourraient être annihilés par les actions immunostimulantes d'une cytokine telle que l'interleukine-1. Les résultats montrent qu'au contraire, les effets immunostimulateurs de l'interleukine-1 sont inhibés lorsque les hémocytes d'huîtres sont préalablement incubés en présence de noradrénaline.

Publication n°5

Invertebrate Biology 120, (October issue)

Noradrenaline reduces the stimulatory effect of IL-1α on oyster immunocyte reactive oxygen species production

Arnaud Lacoste[a], Shelagh K. Malham, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France

[a] Author for correspondance: Phone: +33 (0)2 98 29 23 23; Fax: +33 (0)2 98 29 23 24. E-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Additionnal key words: catecholamines, cytokines, chemiluminescence, *Crassostrea gigas*

Short running title: Noradrenaline and IL-1α stimulation in mollusc hemocytes

Number of figures: 6

Abstract. Evidence suggest that interleukin-1 (IL-1)-like molecules are present in invertebrates. Both invertebrate and human IL-1α can bind to invertebrate IL-1 receptors and stimulate invertebrate immune functions. The present study shows that IL-1α increases reactive oxygen species (ROS) production by oyster immunocytes. However, physiological doses of noradrenaline (NA) exert a suppressive effect on IL-1α stimulation *in vitro*. The β-adrenoceptor agonist isoproterenol mimicked the effects of NA and the β-adrenoceptor antagonist propanolol blocked the NA-induced suppression of hemocyte responsiveness to IL-1α. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram acted in synergy with isoproterenol to reduce hemocyte response to IL-1α and the protein kinase A inhibitor H-89 suppressed the effects of isoproterenol. These results suggest that circulating NA impairs IL-1α-stimulation of oyster hemocytes via a β-adrenoceptor/cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. Considering that mollusc immunocytes secrete NA, an autocrine regulatory loop may also modulate the ability of these cells to respond to IL-1α.

Chapitre 2. Effets de la noradrénaline sur l'activité de phagocytose des hémocytes

Dans cette partie, nous avons utilisé la cytométrie en flux afin d'examiner les effets de la noradrénaline sur les capacités de phagocytose des hémocytes d'huîtres *in vitro*.

Les résultats présentés dans la **publication n°6** montrent que l'activité de phagocytose des hémocytes d'huîtres est inhibée en présence de noradrénaline. Les effets de cette catécholamine impliquent des récepteurs β-adrénergiques et une protéine kinase AMPc-dépendante.

Publication n°6

General and Comparative Endocrinology 122, 252-259

Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a β-adrenergic receptor - cAMP signalling pathway

Arnaud Lacoste, Shelagh K. Malham, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

Corresponding author: Arnaud Lacoste, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France. Phone: +33 (0)2 98 29 23 23; fax: +33 (0)2 98 29 23 24; e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Short title: β-adrenergic control of phagocytosis in molluscs

Catecholamines (CA) regulate several physiological processes in molluscs. Experiments have been conducted to determine the effects of noradrenaline (NA), the principal CA circulating in bivalve hemolymph, on oyster hemocyte phagocytosis. Results show that NA had a dose-dependent inhibitory effect on phagocytosis at physiological concentrations of 0.1 µM and above. The β-adrenoceptor agonist isoproterenol mimicked the inhibitory effects of NA on phagocytosis whereas the α-adrenoceptor agonist phenylephrine had no significant effect. Furthermore, the β-adrenoceptor antagonist propanolol, but not the α-adrenoceptor antagonist prazosin, prevented the inhibition of phagocytosis by NA. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram acted synergistically with a suboptimal concentration of isoproterenol to inhibit phagocytosis and the proteine kinase A inhibitor H-89, but not the proteine kinase C inhibitor calphostin C attenuated the effect of isoproterenol. These results show that NA can modulate oyster hemocyte phagocytosis via a β-adrenergic receptor/cAMP/proteine kinase A signalling pathway.

***Key Words: Crassostrea gigas*; Hemocytes; Phagocytosis; CA; Noradrenaline; Adrenergic receptors**

Chapitre 3. Noradrénaline et apoptose chez les hémocytes d'huîtres

Au cours des trois études précédentes, les hémocytes d'huîtres n'étaient exposés à la noradrénaline que pendant quelques dizaines de minutes. Dans le cadre d'expériences similaires, nous avons examiné les effets d'expositions de plusieurs heures à la noradrénaline. Ces expériences n'ont pas donné de résultats cohérents parce que la viabilité des cellules maintenues en présence de noradrénaline décroît beaucoup plus rapidement que celle des cellules contrôles. Dans l'étude suivante, nous avons testé l'hypothèse que cette perte de viabilité cellulaire pourrait être due à un phénomène d'apoptose induit par la noradrénaline.

La méthode de marquage dite annexine V-iodure de propidium (Vermes *et al.*, 1995) a été choisie pour détecter les cellules apoptotiques parce qu'elle est très spécifique, parce qu'elle permet de distinguer les cellules nécrotiques des cellules apoptotiques et parce qu'elle marque les cellules à un stade plus précoce du processus d'apoptose que d'autres méthodes classiques telles que la technique TUNEL par exemple (Vermes *et al.*, 1995).

Cette technique utilise deux marqueurs, l'iodure de propidium et l'annexine V conjuguée à du FITC (fluoresceine isothiocyanate). L'iodure de propidium ne pénètre pas dans les cellules vivantes, mais il traverse la membrane plasmique des cellules en nécrose ou en apoptose tardive et s'intercale entre les bases de l'ADN nucléaire, colorant le noyau en rouge sous lumière bleue. L'annexine V est une protéine présentant la propriété de se fixer à la phosphatidylsérine en présence d'ions calcium (Andree *et al.*, 1995). Lorsqu'une cellule entre en apoptose, la phosphatidylsérine, qui n'est normalement présente que sur le feuillet interne de la membrane plasmique, se déplace vers le feuillet externe et se trouve exposée à l'espace extracellulaire. L'utilisation d'annexine V conjuguée à un fluorochrome permet donc de marquer spécifiquement les cellules apoptotiques (Vermes *et al.*, 1995). Sous lumière bleue (488 nm), le double marquage annexine V-iodure de propidium permet donc de distinguer les

cellules vivantes (non colorées) imperméables aux deux marqueurs, les cellules apoptotiques colorées en vert grâce à l'annexine V-FITC et les cellules nécrotiques qui, perméables, sont colorées en vert (annexine V-FITC) et en rouge (iodure de propidium).

Les résultats présentés dans la **publication n°7** montrent que la noradrénaline déclenche un processus d'apoptose chez les hémocytes d'huîtres via des récepteurs β-adrénergiques, une protéine kinase A et des caspases sensibles à la protéine P35. Des expériences complémentaires montrent que des MAP kinases ("mitogen activated protein kinases") et la GTPase Rho inhibent les effets de la noradrénaline.

Publication n°7

Journal of Cell Science (sous presse)

P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate β-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells.

Arnaud Lacoste, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

Corresponding author: Arnaud Lacoste, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France. Phone: +33 (0)2 98 29 23 23; fax: +33 (0)2 98 29 23 24; e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Manuscript information: 18 pages of text, 8 figures, 177 words in the abstract and 42648 characters (including spaces, all text sections, the number of characters displaced by figures and additionnal space allowance for each figure).

Abbreviations: CA, catecholamines; NA, noradrenaline; ISO, isoproterenol; MAP kinases, mitogen-activated protein kinases

ABSTRACT Apoptosis is known to be an important mechanism for the preservation of a healthy and balanced immune system in vertebrates. Little is known, however on how apoptotic processes regulate invertebrate immune defenses. In the present study, we show that noradrenaline (NA), a catecholamine produced by the neuroendocrine system and by immune cells in molluscs, is able to induce apoptosis of oyster hemocytes. The apoptosis-inducing effect of NA was mimicked by isoproterenol (ISO) and blocked by propanolol, indicating that NA triggers apoptosis via a β-adrenergic signaling pathway. Exposure to the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK or expression of the caspase inhibitor P35 under the transcriptionnal control of a mollusc *hsp70* gene promoter reduced the number of apoptotic cells among NA-treated hemocytes. This results suggests that P35-sensitive caspases are involved in the apoptotic process triggered by β-adrenergic signaling. Complementary experiments show that MAP kinases and Rho, a member of the Ras GTPase family, are involved in antiapoptotic mechanisms that modulate the apoptotic effect of NA. Taken together, these results provide a first insight into apoptotic processes in mollusc immune cells.

Chapitre 4. Noradrénaline et transcription du gène de la protéine de stress hsp 70

Plusieurs études ont montré que des mécanismes protecteurs impliquant notamment les protéines de stress ou hsp ("heat shock proteins") s'opposent aux signaux cellulaires qui initient le processus d'apoptose. L'hsp70 est l'une des principales protéines de stress impliquées dans la protection des cellules de métazoaires (Mosser *et al.*, 1992; Mailhos *et al.*, 1993; Samali et Orrenius, 1998). Puisque la noradrénaline est capable de déclencher l'apoptose des cellules immunitaires d'huîtres, nous avons formulé l'hypothèse que cette catécholamine inhibait les mécanismes de protection cellulaire et pouvait notamment agir négativement sur l'expression du gène *hsp70*.

Nous montrons dans la **publication n°8** que les mécanismes de régulation impliquant la noradrénaline sont plus complexes qu'il n'y paraît et que cette hypothèse ne s'est pas vérifiée. En effet, nos résultats indiquent que la noradrénaline active la transcription du gène *hsp70* dans les hémocytes d'huîtres via des récepteurs α-adrénergiques, une protéine G, une phospholipase C et une protéine kinase C Ca^{2+}-dépendante.

Publication n°8

Journal of Cell Science 114, (October issue)

Noradrenaline and α-adrenergic signaling induce the *hsp70* gene promoter in mollusc immune cells

Arnaud Lacoste*, Marie-Cécile De Cian, Anne Cueff and Serge A. Poulet

Station Biologique de Roscoff, CNRS - Université Paris VI - INSU

Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France.

*Author for correspondance (e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr)

Author for correspondance: Arnaud Lacoste, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, B.P. 74, F-29682 Roscoff cedex, France. Phone: +33 (0)2 98 29 23 23; fax: +33 (0)2 98 29 23 24; e-mail: lacoste@sb-roscoff.fr

Short title: Noradrenaline and hsp70 expression in mollusc hemocytes

Key words: Mollusc, Immune cell, Noradrenaline, Heat shock protein, α-adrenergic signaling, Thermotolerance

SUMMARY

Expression of heat shock proteins (hsp) is a homeostatic mechanism induced in both prokaryotic and eukaryotic cells in response to metabolic and environmental insults. A growing body of evidence suggests that in mammals, the hsp response is integrated with physiological responses through neuroendocrine signaling. In the present study, we have examined the effect of noradrenaline (NA) on the hsp70 response in mollusc immune cells. Oyster and abalone hemocytes transfected with a gene construct containing a gastropod *hsp70* gene promoter linked to the luciferase reporter-gene were exposed to physiological concentrations of NA, or to various α- and β-adrenoceptor agonists and antagonists. Results show that NA and α-adrenergic stimulations induced the expression of luciferase in transfected mollusc immunocytes. Pertussis toxin (PTX), the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122, the protein kinase C (PKC) inhibitor calphostin C, the Ca^{2+}-dependent PKC inhibitor Gö 6976 and the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) inhibitor LY294002 blocked the phenylephrine (PE)-mediated induction of the *hsp70* gene promoter. These results suggest that α-adrenergic signaling through a PTX-sensitive G-protein, PLC, Ca^{2+}-dependent PKC and PI3 kinase induce the transcriptionnal upregulation of hsp70 in mollusc hemocytes. Thus, a functionnal link exists between neuroendocrine signaling and the hsp70 response in mollusc immune cells.

PARTIE III. CONSÉQUENCES DU STRESS SUR LES RELATIONS HUÎTRE-PATHOGÈNE.

Depuis le milieu des années 80, les stocks d'huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles cultivées en Bretagne subissent des mortalités importantes durant la période estivale. Des mortalités d'huîtres juvéniles et adultes sont aussi observées au Japon et aux Etats Unis. Dans tous les cas, les mortalités surviennent au cours de la période de reproduction des huîtres et lorsque la température de l'eau et la biomasse phytoplanctonique sont maximales (Deslou-Paoli *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1996; Cheney *et al.*, 2000a).

Les causes de ces mortalités sont mal connues et pourraient être différentes selon les pays considérés. Au Japon, les mortalités furent initialement associées à des déséquilibres métaboliques causés par une maturation trop rapide des gonades (Imai *et al.*, 1965; Tamate *et al.*, 1965). Une hypothèse semblable a été formulée pour tenter d'expliquer les mortalités estivales d'huîtres aux Etats-Unis (Perdue *et al.*, 1983). Plus récemment, un rôle possible d'agents infectieux a été examiné en Asie, aux Etats-Unis et en Europe (Sindermann, 1990; Elston, 1993). Elston *et al.* (1987) et Friedman *et al.* (1991) ont montré que certains épisodes de mortalités estivales étaient associés à une maladie (appelée nocardiose) causée par un agent bactérien. Nicolas *et al.* (1992) et Renault *et al.* (1994) ont observé des infections causées par un agent viral de type herpès dans les larves et certains stocks d'huîtres juvéniles en France. Ces auteurs n'ont cependant pas pu établir de façon claire que cet agent viral était responsable des mortalités d'huîtres en Bretagne. De plus, des infections par un virus de type herpès non pas été observées ailleurs qu'en France (Cheney *et al.*, 2000a).

De 1997 à 2000, l'équipe Invertébrés Marins et Zooplancton de la Station Biologique de Roscoff a examiné les conditions environnementales au voisinage des parcs à huîtres en Baie de Morlaix (mesures de la température et de la salinité de l'eau, estimations des quantités d'oxygène et de composés azotés dissous et évaluation de la biomasse phytoplanctonique et de l'abondance de bactéries hétérotrophes) et divers paramètres métaboliques des huîtres âgées de moins de 12 mois (estimation des taux de croissance, des teneurs en glucides, lipides et

protéines totales, suivi de la maturation des gonades). Ces études n'ont pas permis d'établir que des anomalies métaboliques ou des conditions environnementales particulières sont responsables des mortalités estivales d'huîtres en Baie de Morlaix.

Au début de l'été 1999, nous avons testé l'hypothèse qu'un agent bactérien était impliqué dans le phénomène des mortalités estivales au cours d'une série d'expériences consistant à incuber des huîtres en présence d'antibiotiques. Ces traitements permirent de diminuer les mortalités de manière significative et très reproductible. Les travaux de Boetcher *et al*. (1999) publiés à la même époque montraient que des traitements aux antibiotiques permettaient aussi de réduire les mortalités estivales d'huîtres aux Etats-Unis.

Dans les études suivantes, nous avons cherché à isoler un agent bactérien impliqué dans le phénomène des mortalités estivales en Baie de Morlaix et nous avons examiné les relations existant entre le stress et l'apparition de la pathologie.

Chapitre 1. Utilisation d'indicateurs de stress et isolement d'un pathogène bactérien chez l'huître

Nos premières tentatives visant à isoler un pathogène bactérien à partir d'huîtres mourantes (méthode couramment utilisée) se sont soldées par des échecs. Aucune des bactéries isolées ne présentaient de pouvoir pathogène vis-à-vis des huîtres juvéniles (huîtres âgées de moins de 12 mois). Ces bactéries faisaient très probablement partie de l'abondante faune opportuniste qui colonise les bivalves mourants. Des expériences annexes réalisées en 1998 et répétées en 1999, montraient qu'au cours des premières phases de la maladie, la réponse catécholaminergique des huîtres à un facteur de stress expérimental (agitation pendant une minute) est anormalement faible. Des études réalisées aux Etats-Unis à l'aide d'indicateurs de stress différents (protéines de stress et protéines de détoxification) indiquent que les huîtres américaines affectées par des mortalités estivales sont, elles aussi, incapables de mettre en place une réponse normale au stress (Cheney *et al.*, 2000a, b). Ce symptôme hormonal précoce nous a permis de sélectionner des huîtres affectées par la pathologie estivale avant qu'elles ne soient colonisées par des bactéries opportunistes. Les travaux présentés dans la **publication n°9** décrivent l'approche ayant permis d'isoler une souche bactérienne pathogène à partir de ces huîtres. Nous présentons aussi les résultats des tests de pathogénicité ayant permis d'établir que ce pathogène est responsable des mortalités d'huîtres en Baie de Morlaix et nous montrons que le pathogène bactérien est de type *Vibrio splendidus*.

Publication n°9

Diseases of Aquatic Organisms 45, (sous presse)

A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of the juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France)

A. Lacoste[1], F. Jalabert[1], S. Malham[1], A. Cueff[1], F. Gélébart[1], C. Cordevant[2], M. Lange[2], S. A. Poulet[1,*]

[1]Station Biologique de Roscoff, CNRS, Université Paris VI, 29682 Roscoff, France

[2]Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59013 Lille, France

[*] Addressee for correspondence.

E-mail: poulet@sb-roscoff.fr

ABSTRACT: Juvenile oysters *Crassostrea gigas* cultured in the Bay of Morlaix (France) have suffered unexplained summer mortalities for over a decade. In the present study, we tested the hypothesis that a bacterial pathogen could be responsible for this phenomenon. A first attempt failed to isolate a bacterial pathogen from moribund or weak oysters. Only non-pathogenic, probably opportunistic, bacteria were isolated. As an alternative approach, we focused on oysters presenting reduced stress-response capacities (determined by circulating noradrenaline measurements), a characteristic of juvenile oysters entering an early phase of the disease. Cultures of bacterial isolates on TCBS plates revealed that a *Vibrio* strain was present in diseased oysters and scarce or absent in healthy oysters. Experimental infections indicated that this *Vibrio* can cause mortalities of juvenile oysters when injected at concentrations ranging from 10^4-10^8 CFU/oyster. Similarly to the summer mortality disease, the *Vibrio* isolate caused higher mortalities at higher temperatures; apparently, it could not be transmitted horizontally, it did not affect adult oysters and it induced stress-response dysfunctions in juvenile oysters. Phenotypic and genotypic characterizations identified the pathogen as *Vibrio splendidus*. Taken together, the present results satisfy Koch's postulate and suggest that this bacterial strain is probably responsible for the juvenile oyster summer mortalities in the Bay of Morlaix.

KEY WORDS: *Crassostrea gigas* · Summer mortality · Juveniles · *Vibrio splendidus* · Stress · Noradrenaline

Chapitre 2. Influence du stress et des hormones de stress sur la résistance de l'huître à un pathogène bactérien

Plusieurs études antérieures ont montré que l'apparition de mortalités au sein des stocks de bivalves cultivés coïncidait souvent avec des stress liés à certaines pratiques aquacoles ou à des modifications des conditions environnementales telles qu'une augmentation de température (Bricelj *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1999). Nous avons donc réalisé une série d'expériences afin d'examiner l'effet du stress et des hormones de stress sur des huîtres expérimentalement infectées par le pathogène bactérien isolé précédemment.

Dans les expériences présentées dans la **publication n°10**, des huîtres juvéniles ont été infectées expérimentalement par injection d'une faible quantité de bactéries appartenant à la souche *Vibrio splendidus* impliquée dans le phénomène de mortalités estivales en Baie de Morlaix. Trois jours après infection, les huîtres ont été stressées par agitation pendant 15 minutes. Les résultats montrent que le stress augmente les mortalités et accélère la réplication du pathogène bactérien dans les huîtres infectées. Des injections de noradrénaline et d'ACTH à des huîtres infectées ont des effets similaires.

Publication n°10

Applied and Environmental Microbiology 67, 2304-2309

Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio splendidus*

ARNAUD LACOSTE, FABIENNE JALABERT, SHELAGH K. MALHAM, ANNE CUEFF, AND SERGE A. POULET*

Station Biologique de Roscoff, CNRS, Université Paris VI, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

*****Corresponding author. Mailing address: Station Biologique de Roscoff, CNRS, Université Paris VI, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France. Phone: +33 (0)2 98 29 23 23. Fax: +33 (0)2 98 29 23 24. E-mail: poulet@sb-roscoff.fr

Journal section: Invertebrate microbiology

Oysters are permanently exposed to various microbes and their defense system is continuously sollicited to prevent accumulation of invading and pathogenic organisms. Therefore, impairment of oyster defenses usually results in mass mortalities in cultured oyster stocks or higher numbers of bacteria in food products intended for human consumption. In the present study, experiments were conducted to examine the effects of stress on juvenile oyster's *Crassostrea gigas* resistence to the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. Oysters were challenged with a low dose of a pathogenic *V. splendidus* strain and submitted to a mechanical stress three days later. Both mortality and *V. splendidus* loads increased in stressed oysters whereas they remained low in unstressed animals. Injection of noradrenaline or adrenocorticotropic hormone, two key components of the oyster neuroendocrine stress-response system, also caused higher mortality and increased accumulation of *V. splendidus* in challenged oysters. These results suggest that the physiological changes imposed by stress, or stress-hormones, influenced host-pathogen interactions in oysters and increased juvenile *C. gigas* vulnerability to *Vibrio splendidus*.

SECTION III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Existence d'une réponse neuroendocrine au stress chez l'huître.

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse montrent qu'une forme de réponse neuroendocrine au stress existe chez l'huître. Cette réponse implique deux catécholamines, la noradrénaline et la dopamine. Une réponse neuroendocrine semblable existe probablement chez la plupart des mollusques puisque des expériences complémentaires montrent que les concentrations circulantes en noradrénaline et en dopamine augmentent aussi chez d'autres bivalves, tels que la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* ou la moule *Mytilus edulis*, chez le gastéropode *Haliotis tuberculata* et chez les céphalopodes *Eledone cirrhosa* et *Sepia officinalis* en réponse à des stress (Malham *et al.*, en préparation).

L'huître possède des cellules présentant des homologies morphologiques et fonctionnelles avec les cellules chromaffines de vertébrés. La libération de catécholamines par les cellules chromaffines d'huîtres présente cependant la particularité de ne pas être sous dépendance cholinergique. Des neuropeptides tels que l'ACTH semblent contrôler la sécrétion de noradrénaline et de dopamine chez l'huître (Figure 14). Dans la publication n°1, nous avons souligné que ce type de régulation présente d'étonnantes similitudes avec le système de contrôle de la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines des cyclostomes (Bernier et Perry, 1996; Reid *et al.*, 1998).

Un autre résultat important présenté dans la publication n°1 montre que les quantités de noradrénaline et de dopamine contenues dans les hémocytes des huîtres stressées ne sont pas significativement différentes de celles contenues dans les hémocytes des huîtres non-stressées. Ce résultat contredit l'hypothèse d'Ottaviani *et al.* (pour revues, voir Ottaviani et Franceschi, 1996, 1997) proposant que, chez les mollusques, les cascades hormonales de type

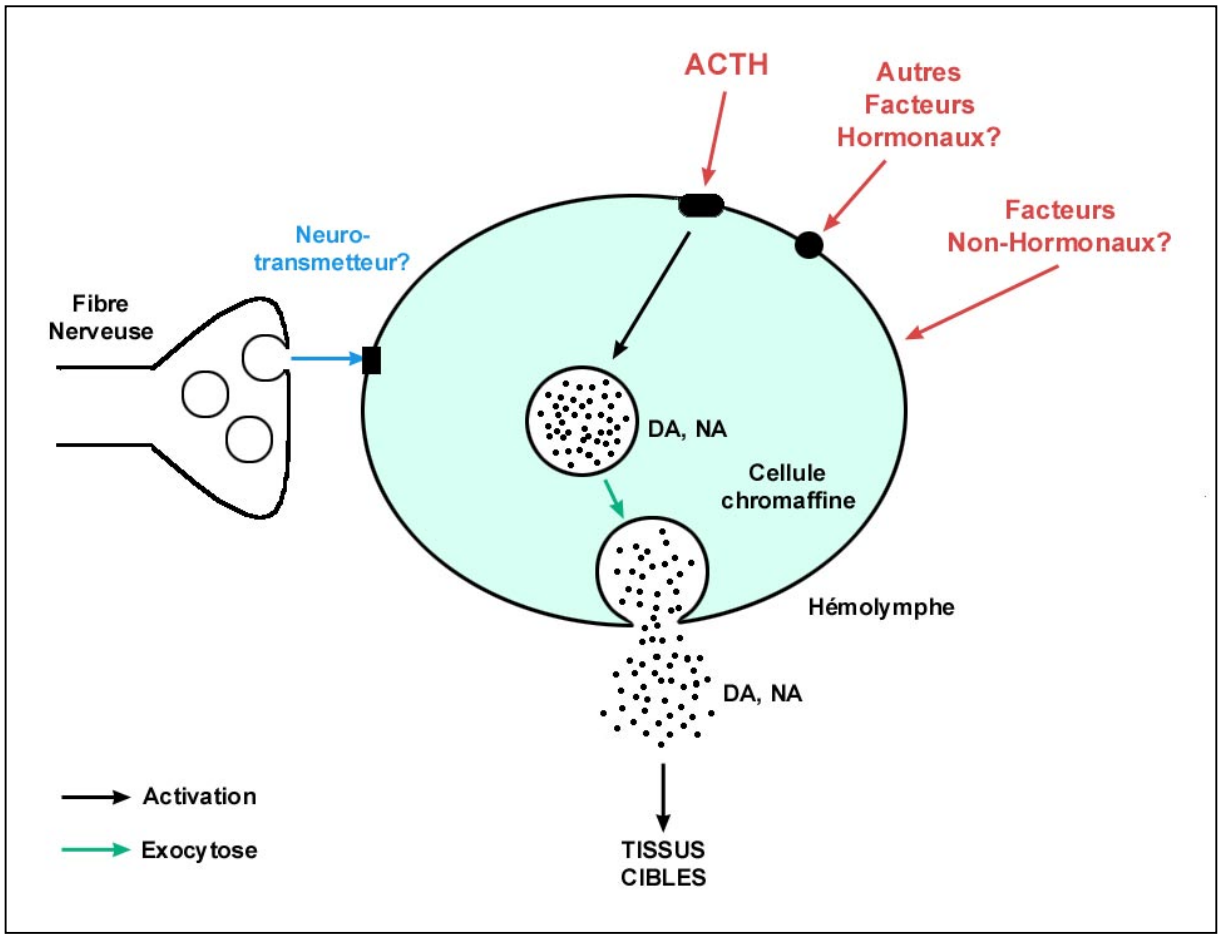

Figure 14. Représentation schématique des voies de contrôle de la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines d'huîtres.
Chez l'huître, deux catécholamines sont libérées dans l'hémolymphe au cours de la réponse au stress : la dopamine (DA) et la noradrénaline (NA). Ces catécholamines sont produites par des cellules chromaffines situées au niveau du coeur. La sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines d'huîtres n'est pas sous contrôle cholinergique comme chez les gnathostomes. Des neuropeptides tels que l'ACTH ("adrenocorticotropic hormone") sont capables de déclencher la libération de dopamine et de noradrénaline. L'influence d'autres facteurs nerveux ou sanguins ne peut être exclue.

CRH-ACTH-catécholamines ont lieu au niveau des hémocytes qui seraient les principaux responsables de la réponse au stress. Il est possible que ces cascades hormonales hémocytaires exercent des fonctions immunorégulatrices et/ou que les hémocytes prennent part à la réponse au stress (notamment à la réponse à des facteurs de stress non cognitifs) via des actions paracrines sur certains tissus. Cependant, d'après nos résultats, il semble que chez l'huître, la réponse catécholaminergique globale de l'organisme soit générée par les cellules chromaffines.

Les cellules chromaffines d'huîtres sont visiblement douées d'une plasticité étonnante. En effet, la publication n°3 suggère que ces cellules peuvent acquérir *in vitro* une morphologie et des caractéristiques biochimiques de neurones catécholaminergiques ou de cellules phagocytaires (cellules gliales probablement). Des marqueurs spécifiques de différents types cellulaires sont rares voire inexistants chez les mollusques; par conséquent, de nouveaux outils doivent être développés avant de pouvoir étudier en détail le potentiel de différentiation des cellules chromaffines d'huîtres.

2. Les catécholamines en tant qu'indicateurs de stress

Chez l'huître, la réponse catécholaminergique au stress est déclenchée par des facteurs de stress divers (perturbations mécaniques, variations de température, variations de salinité...). Cette réponse est mise en place rapidement (quelques minutes), son amplitude varie en fonction de l'intensité du stress considéré et elle a tendance à être maintenue pendant toute la durée de la perturbation (voir publication n°2). Il semble donc que les concentrations en noradrénaline et en dopamine hémolymphatiques constituent des indicateurs permettant d'évaluer l'état de stress des huîtres (et probablement d'autres bivalves) dans leur milieu naturel, en conchyliculture ou en laboratoire. Au cours de cette thèse, nous avons d'ailleurs utilisé ces indicateurs afin d'améliorer les conditions d'acclimatation et de conservation des

huîtres utilisées dans nos expériences. Il est apparu qu'en laboratoire, les concentrations en noradrénaline et en dopamine circulantes demeurent très variables chez l'huître. Par conséquent, il est difficile d'obtenir des lots homogènes d'animaux présentant un niveau de stress minimal et constant d'un individu à l'autre. Après le stress lié au transport et l'arrivée au laboratoire, une période d'acclimatation de 7 à 10 jours dans des containers en matériaux neutre (polyéthylène) dont la totalité du volume en eau de mer naturelle est renouvelé toutes les deux heures et abondamment aéré a généralement permis d'obtenir des lots d'huîtres homogènes et des résultats reproductibles lors des expériences portant sur la neuroendocrinologie du stress ou l'analyse des paramètres immunitaires.

D'autres indicateurs de stress sont actuellement à l'étude dans d'autres laboratoires. Les protéines de stress (hsp) sont par exemple utilisées depuis le début des années 90 pour estimer l'état de stress des mollusques et autres organismes aquatiques (Sanders, 1993). Plusieurs études ont montré que l'expression des hsp augmente ou diminue lorsque les animaux sont soumis à des augmentations de température ou à la présence de polluants chimiques (Tirard *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996; Clegg *et al.*, 1998). Récemment, Werner et Hinton (1999) ont cependant souligné que ces indicateurs de stress présentent des défauts importants. Par exemple, l'expression des hsp est différente selon les tissus considérés et, dans certains tissus, des variations détectables d'expression d'hsp nécessitent généralement des stress relativement intenses, par conséquent différents organes d'un même individu doivent souvent être considérés (Dyer *et al.*, 1990; Sanders, 1993; Chapple *et al.*, 1997; Werner et Nagel, 1999). De plus, Werner et Hinton (1999) soulignent que plusieurs types d'hsp existent et que les hsp les plus couramment étudiées ne sont pas toujours les protéines les plus exprimées en réponse à un stress. Par exemple, l'hsp70 est la principale protéine de stress étudiée, mais plusieurs études ont montré que l'hsp60 est un meilleur indicateur de certains stress chimiques chez divers invertébrés (Cochrane *et al.*, 1991; Werner et Nagel, 1998). Les métallothionéines et

les protéines de résistance aux xénobiotiques ("MXR-proteins" ou "multixenobiotic resistance-proteins") pourraient aussi représenter des indicateurs de stress intéressants. L'expression de ces protéines est en effet une réponse spécifique à certains stress chimiques (Minier *et al.*, 1999; 2000).

L'un des avantages des catécholamines est que leur concentration circulante augmente en réponse à des stress divers. L'utilisation combinée de ces indicateurs hormonaux, des indicateurs de l'état immunitaire, des hsp, des métallothionéines et des protéines MXR pourrait cependant permettre de déterminer de manière plus précise la nature des stress s'exerçant sur les mollusques. Une telle approche permettrait aussi d'examiner les effets d'un facteur de stress à plusieurs niveaux d'organisation (organisme, organe, cellule, molécule) et de mettre au point des protocoles de sélection de bivalves résistants au stress et mieux adaptés aux divers types de stress inhérents aux pratiques conchylicoles.

3. Mise en évidence de nouveaux mécanismes d'immunorégulation chez les mollusques

3.1. Récepteurs adrénergiques et voies de transduction du signal

Les résultats présentés dans la partie II de la section II montrent que la noradrénaline inhibe la phagocytose et la production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huîtres. De plus, une incubation de plusieurs heures en présence de cette catécholamine déclenche un processus d'apoptose et/ou l'expression du gène de l'hsp70. Il semble que la noradrénaline module les fonctions hémocytaires via des récepteurs adrénergiques de type α et β. Ces résultats s'ajoutent aux études antérieures montrant que des récepteurs d'hormones, de neuropeptides, de facteurs de croissance et de cytokines sont présents à la surface des cellules immunitaires de mollusques (Ottaviani et Franceschi, 1996; Stefano *et al.*, 1999; Stefano et Salzet, 1999). De plus, ils confirment que ces cellules sont soumises à des

mécanismes immuno-régulateurs complexes impliquant diverses substances à mode d'action endocrine, paracrine ou autocrine. Il est par exemple intéressant de noter que les hémocytes de mollusques produisent des catécholamines (voir publication n°1 et Ottaviani et Franceschi, 1996). Dans le micro-environnement des cellules immunitaires de mollusques, ces substances sont donc probablement présentes en concentrations supérieures aux concentrations mesurées dans l'hémolymphe et utilisées dans les expériences présentées dans la partie II.

Il semble que la modulation des fonctions hémocytaires par la noradrénaline implique des voies de transduction du signal et des messagers secondaires différents selon le type de récepteur adrénergique impliqué. Ces mécanismes ont été discutés dans la section II et sont résumés dans la figure 15.

3.2. Hypothèses concernant l'existence de sous-populations hémocytaires.

Les résultats présentés dans les publications 7 et 8 suggèrent que la noradrénaline déclenche l'apoptose des hémocytes d'huîtres via des récepteurs β-adrénergiques et stimule la transcription du gène *hsp70* via des récepteurs α-adrénergiques. Ces résultats sont inattendus et semblent assez paradoxaux. Il est en effet surprenant qu'un même messager puisse déclencher à la fois un programme d'auto-destruction et un mécanisme de protection au sein d'un même type cellulaire. Deux hypothèses peuvent permettre d'expliquer ces résultats: la première hypothèse est que les récepteurs α et β-adrénergiques ne sont pas exprimés en même temps par les hémocytes. Par exemple, l'expression des récepteurs adrénergiques d'hémocytes pourrait dépendre de l'âge des cellules ou de la présence de facteurs de croissance, de cytokines ou d'hormones autres que la noradrénaline. Ce type de régulation pourrait notamment permettre l'élimination de cellules sénescentes ou l'arrêt d'une réaction inflammatoire. Des mécanismes de régulation similaires existent chez les vertébrés (Goldstein *et al.*, 1991; Cazaux *et al.*, 1995; Cremaschi *et al.*, 2000).

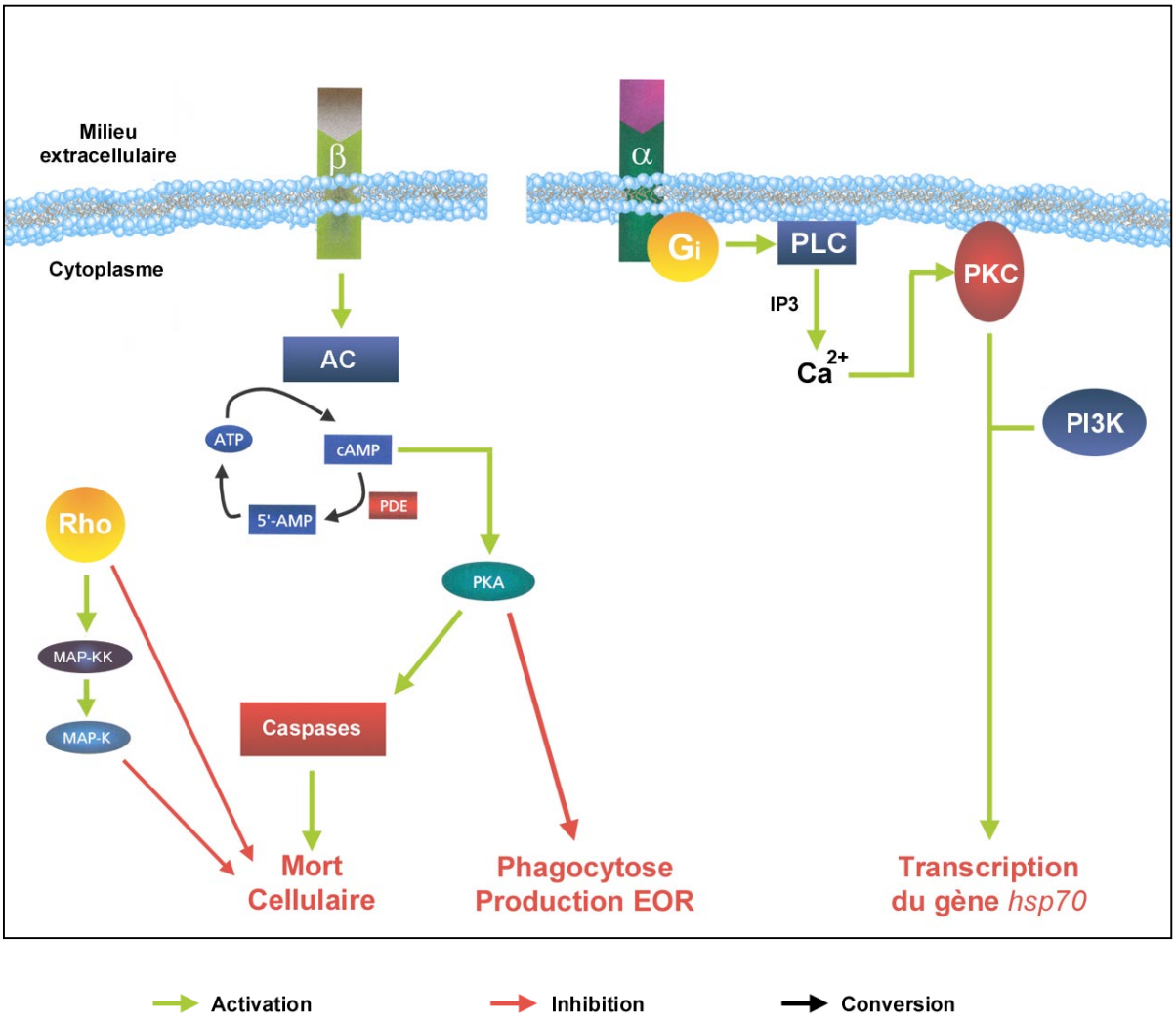

Figure 15. Modèle hypothétique décrivant certaines des voies de signalisation activées par les récepteurs adrénergiques au niveau des hémocytes d'huîtres.

Les résultats exposés dans la section II suggèrent que l'activation des récepteurs β-adrénergiques (β) active une adénylate cyclase (AC), ce qui permettrait la conversion de l'ATP en AMP cyclique (AMPc) et l'activation d'une protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Cette voie de signalisation entraînerait une diminution de l'activité de phagocytose et de la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) par les hémocytes. Des caspases seraient aussi activées, ce qui entraînerait une mort cellulaire par apoptose. Le processus d'apoptose semble pouvoir être inhibé par des mécanismes cellulaires impliquant la GTPase Rho et la cascade des "mitogen-activated protein kinases" (MAP-K).

L'activation des récepteurs α-adrénergiques (α) couplés à une protéine G sensible à la toxine pertussis (Gi) activerait une phospholipase C (PLC), une enzyme hydrolysant le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate en diacylglycérol et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), ce qui entraînerait la libération d'ions Ca^{2+} stockés au niveau du réticulum endoplasmique. Ces ions Ca^{2+} participeraient à l'activation d'une protéine kinase C (PKC) Ca^{2+}-dépendante. La PKC ainsi qu'une phosphatidylinositol triphosphate kinase (PI3K), une enzyme générant des seconds messagers lipidiques, activeraient la transcription du gène de la protéine de stress 70 (*hsp70*). Les récepteurs α et β-adrénergiques sont peut-être exprimés par des sous-populations hémocytaires distinctes. Ils pourraient aussi ne pas être exprimés en même temps au sein d'un même hémocyte. Par conséquent, ces deux voies de signalisation cellulaire n'ont peut-être pas lieu en même temps au sein d'une même cellule.

PDE, phosphodiestérase; MAP-KK, " mitogen-activated protein kinase kinase".

La deuxième hypothèse est que les récepteurs α et β-adrénergiques ne sont pas exprimés par les mêmes cellules. Des sous-populations hémocytaires pourraient exprimer des récepteurs adrénergiques de type α alors que d'autres sous-populations exprimeraient des récepteurs adrénergiques de type β. Ces deux sous-populations hémocytaires seraient donc soumises à des mécanismes de régulation différents.

Chez les bivalves, la classification des hémocytes se base essentiellement sur des critères morphologiques. La classification la plus utilisée distingue les hyalinocytes, une population d'hémocytes sans granules, et les granulocytes, une population qui se compose de granulocytes basophiles et de granulocytes éosinophiles (voir par exemple Auffret, 1985; Carballal *et al.*, 1997; Dyrynda *et al.*, 1997). Plusieurs études montrent que d'autres types de populations hémocytaires peuvent être distingués si l'on prend en compte des critères biochimiques ou fonctionnels. Par exemple, Ottaviani *et al.* (1991) montrent que seuls certains hémocytes expriment de l'ACTH. Plus récemment, Mitta *et al.* (2000a, b) ont pu établir que chez la moule, la mytiline et la myticine sont exprimées uniquement par certaines sous-populations hémocytaires. Ces peptides antimicrobiens sont aussi exprimés différemment selon le type de tissu dans lequel se trouvent les hémocytes.

De la même manière, les récepteurs α et β-adrénergiques pourraient donc être exprimés par des sous-populations hémocytaires différentes ou leur expression pourrait être déterminée par l'environnement trophique des hémocytes. Une meilleure connaissance des gènes codant les récepteurs adrénergiques d'huître et la fabrication d'anticorps spécifiques de ces récepteurs devraient permettre de tester ces hypothèses dans de futures expériences.

4. Stress, catécholamines et pathologie

Les résultats présentés dans la 3è partie de la section II montrent que l'amplitude de la réponse neuroendocrine au stress est moindre chez les huîtres juvéniles entrant dans une phase

précoce de la pathologie menant à l'apparition de mortalités estivales en Baie de Morlaix. Ce symptôme hormonal a été utilisé comme critère de sélection d'huîtres infectées, ce qui a permis d'isoler un pathogène bactérien apparemment responsable de mortalités estivales d'huîtres juvéniles en Baie de Morlaix. Ce pathogène a pu être identifié comme étant *Vibrio splendidus* mais il reste à déterminer pourquoi les huîtres infectées par cet agent bactérien présentent une réponse neuroendocrine anormale. Il est possible que l'infection provoque, chez l'huître, un état général d'épuisement qui la rend incapable de mettre en place une réponse normale au stress. Manger *et al.* (1996) ont montré que le trématode *Schistosoma mansoni* altère le métabolisme des catécholamines chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata* et cause une diminution de la concentration en dopamine dans l'hémolymphe. De la même manière, il est possible que chez l'huître, des toxines produites par *Vibrio splendidus* affectent certaines enzymes (telles que la tyrosine hydroxylase, par exemple, voir Figure 4) nécessaires à la mise en place de la réponse catécholaminergique au stress. Des recherches concernant la physiologie, les facteurs de virulence et le mode d'action de *Vibrio splendidus* sont mises en place au sein de l'équipe Invertébrés Marins et Zooplancton. Elles devraient permettre de mieux comprendre comment ce pathogène bactérien influe sur le système neuroendocrine de l'huître.

Les résultats présentés dans la publication n°10 suggèrent qu'un stress accélère la progression de la pathologie chez des huîtres juvéniles infectées par une faible dose de *V. splendidus*. Ce résultat est en accord avec d'autres études montrant que le stress et l'apparition de pathologies sont liées chez les bivalves (Bricelj *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1999). Nos résultats montrent aussi qu'une injection de noradrénaline ou d'ACTH accélère la réplication de *V. splendidus* et déclenche l'apparition de mortalités chez les huîtres juvéniles.

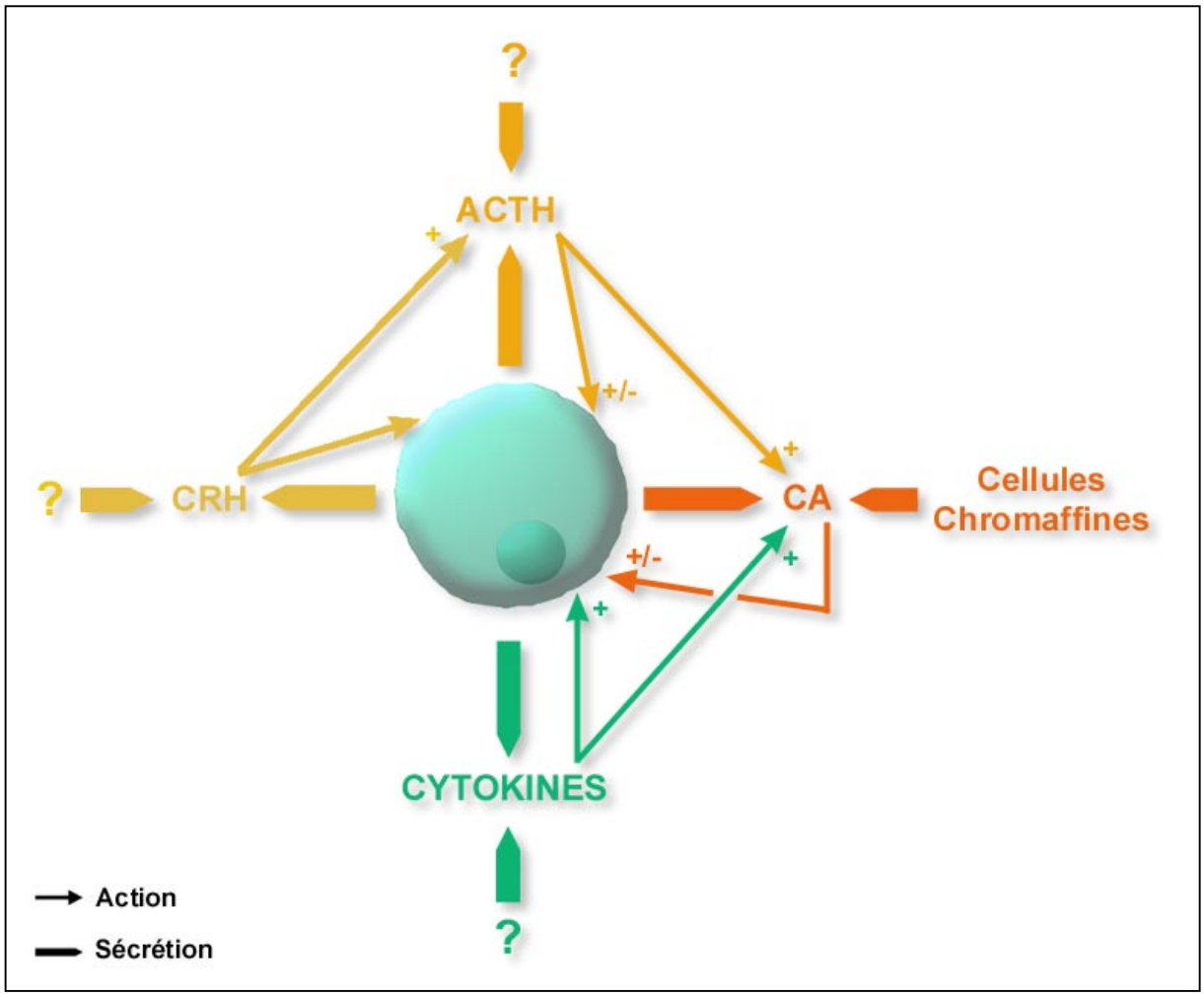

Figure 16. Modèle hypothétique représentant certaines des cascades hormonales et des mécanismes neuroendocrines au niveau de l'hémocyte de mollusque.
L'hémocyte produit de la CRH qui stimule la libération d'ACTH. L'ACTH exerce un effet stimulateur ou inhibiteur sur les fonctions hémocytaires et active la libération de catécholamines. Des cytokines réguleraient aussi les fonctions hémocytaires et stimuleraient la libération de catécholamines.
Les catécholamines sont aussi produites par des cellules chromaffines localisées au niveau du coeur. Il semble que la noradrénaline inhibe l'activité de phagocytose et la production d'espèces oxygénées réactives. De plus, cette catécholamine semble pouvoir déclencher un processus d'apoptose ou activer la transcription du gène *hsp70* des hémocytes.

CRH, "corticotropin releasing hormone"; ACTH, "adrenocorticotropic hormone", CA, catécholamines; (+), effet stimulateur; (+/-), effet stimulateur ou inhibiteur; (?), autres sources possibles (neurones par exemple).

Les travaux présentés dans la partie II suggèrent que la noradrénaline peut exercer des fonctions immuno-suppressives *in vitro* via des récepteurs β-adrénergiques. Il semble que cette catécholamine déclenche aussi des mécanismes de protection cellulaire via des récepteurs α-adrénergiques (Figure 16). Ces résultats soulèvent la question suivante : la noradrénaline stimule-t'elle ou inhibe-t'elle les systèmes de défense chez l'huître? Les résultats de la publication n°10 permettent de répondre partiellement à cette question. Il semble, en effet, que la noradrénaline augmente la vulnérabilité des huîtres juvéniles préalablement infectées par *V. splendidus*. Au cours d'une série d'expériences complémentaires, des agonistes et des antagonistes des récepteurs α ou β-adrénergiques ont été injectés à des huîtres infectées par *V. splendidus* de manière à déterminer lequel de ces types de récepteurs était impliqué dans l'action néfaste de la noradrénaline sur la résistance des animaux. Pour des raisons inconnues, ces expériences n'ont pas donné de résultats cohérents (résultats non reproductibles ou absence de différences significatives entre les mortalités des lots traités et les mortalités des lots contrôles). Ces expériences devraient donc être répétées.

Il est important de noter que la réponse au stress, et donc la sécrétion de noradrénaline, sont des mécanismes physiologiques adaptatifs chez les vertébrés (Chrousos et Gold, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997) et il en est vraisemblablement de même chez l'huître. Par conséquent, il est probable que chez l'huître, comme chez les vertébrés, les situations dans lesquelles la noradrénaline et l'ACTH conduisent à une augmentation des taux de mortalité représentent des situations particulières. Dans le cas présent, la situation particulière semble être l'existence préalable d'une infection par *V. splendidus*.

Les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence l'existence d'une réponse catécholaminergique au stress et confirment l'existence d'un axe neuro-immunitaire chez les mollusques. De futures recherches sont désormais nécessaires pour déterminer dans quelle

mesure la réponse au stress permet à l'huître de s'adapter à une perturbation et dans quelles situations le stress menace la survie de ces mollusques. Ces recherches pourraient s'intégrer à des programmes visant à sélectionner des animaux présentant une résistance accrue au stress et des défenses immunitaires particulièrement efficaces. Il est probable que l'industrie conchylicole devrait amplement bénéficier du développement des connaissances dans ces domaines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.

Akberali HB (1985) Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* **22**, 101-198.

Alaniz RC, Thomas SA, Perez-Melgosa M, Mueller K, Farr AG, Palmiter RD, Wilson CB (1999) Dopamine β-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2274-2278.

Aldrich TB (1901) A preliminary report on the active principle of the suprarenal gland. *Am. J. Physiol.* **5**, 125-129.

Allan IJ, Newgreen DF (1977) Catecholamine accumulation in neural crest cells and the primary sympathetic chain. *Am. J. Anat.* **149**, 413-421.

Alvarez-Mon M, Kehrl JH, Fauci AS (1985) A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions. *J. Immunol.* 135, 3823-3826.

Anctil M, De Waele J-P, Miron M-J, Pani AK (1990) Monoamines in the nervous system of the tube-worm *Chaetopterus variopedatus* (Polychaeta): Biochemical detection and serotonin immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* **259**, 81-92.

Anderson DJ (1993) Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 129-158.

Anderson RS (1994) Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* **18**, 89-96.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM (1990) Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 265, 4923-4928.

Auffret M (1985) Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. 153 pp.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286-290.

Bachère E, Hervio D, Mialhe E. (1991) Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **11**, 173-180.

Baggiolini M. (1982) Phagocytes and phagocytosis 100 years after Metchnikoff. A current picture of the neutrophil leukocyte. *Schweiz Med. Wochenschr.* **112**, 1403-1411.

Barcia RB, Arbeteta J, Ramos-Martinez JI (1999) The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Life* **48**, 419-423.

Barnes RD (1987) Invertebrate Zoology (5th ed.) Saunders, Philadelphia.

Bayne CJ (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioSci.* **40**, 723-731.

Beck G, Cardinale S, Wang L, Reiner M, Sugumaran M (1996) Characterization of a defense complex consisting of interleukin-1 and phenol oxidase from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **271**, 11035-11038

Beck G, Ellis T, Zhang H, Lin W, Beauregard K, Habicht GS, Truong N (2001) Nitric oxide production by coelomocytes of *Asterias forbesi*. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 1-10.

Beck G, Ellis TW, Truong N (2000) Characterization of an IL-1 receptor from *Asterias forbesi* coelomocytes. *Cell. Immunol.* **203**, 66-73.

Beck G, Habicht GS (1991) Purification and biochemical characterization of an invertebrate interleukin-1. *Mol. Immunol.* **28**, 577-584.

Beck G, O'Brien RF, Habicht GS, Stillman DL, Cooper EL, Raftos DA (1993) Invertebrate cytokines. III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. *Cell. Immunol.* **146**, 284-299.

Bernard C (1865) Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Ed. Baillère et Fils, Paris.

Bernier NJ, Perry SF (1996) Control of catecholamine and serotonin release from the chromaffin tissue of the atlantic hagfish. *J. Exp. Biol.* **199**, 2485-2497.

Beschin A, Bilej M, Brys L, Torreele E, Lucas R, Magez S, De Baetselier P (1999) Convergent evolution of cytokines. *Nature* **400**, 627-628.

Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H, Brys L, Gomez J, De Baetselier P, Timmermans M Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* **273**, 24948-24954.

Bidmon H-J, Stumpf WE (1991) Uptake, distribution and binding of vertebrate and invertebrate steroid hormones and time-dependence of ponasterone A binding in *Calliphora vicina*. Comparisons among cholesterol, corticosterone, cortisol, dexamethasone, 5α-dihydrotestosterone, 1,25-dihydroxyvitamin D_3, ecdysone, estradiol-17β, ponasterone and testosterone. *Histochemistry* **96**, 419-434.

Blalock JE (1984) The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.* **132**, 1067-1070.

Blalock JE (1994) The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* **15**, 504-511.

Bloc A, Lucas R, De Baetselier P, Bilej M, Beschin A (2000) Earthworm functional analog of TNF increases membrane conductance in mammalian cells. Abstracts of the 8th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. *Dev. Comp. Immunol.* **24**, S95.

Boer HH, Schot LP, Roubos EW, ter Maat A, Lodder JC, Reichelt D, Swaab DF (1979) ACTH-like immunoreactivity in two electronically coupled giant neurons in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res.* **202**, 231-240.

Boettcher KJ, Barber BJ, Singer JT (1999) Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an α-proteobacterium in JOD-affected animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2534-2539.

Bost KL, Clarke BL, Xu JC, Kiyono H, McGhee JR, Pascual D (1990) Modulation of IgM secretion and H chain mRNA expression in CH12.LX.C4.5F5 B cells by adrenocorticotropic hormone. *J. Immunol.* **145**, 4326-4331.

Bricelj VM, Ford SE, Borrero FJ, Perkins FO, Rivara G, Hillman RE, Elston RA, Chang J (1992) Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* **11**, 331-347.

Brown JA, Whitehead C (1995) Catecholamine release and interrenal response of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to aluminium in acidic water. *J. Fish Biol.* **46**, 524-535.

Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Vale W (1982) Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinol*. 1982 111, 928-931.

Brusca RC, Brusca GJ (1990) Invertebrates. Ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachussetts.

Cannon W (1935) Stresses and strains of homeostasis. *Am. J. Med Sci.* **189**, 1-14.

Carballal MJ, López MC, Azevedo C, Villalba A (1997) Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* **29***,* 127-135.

Carton Y, Nappi A (2000) Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. Immunogenetics (online first, december 2000).

Cazaux CA, Sterin-Borda L, Gorelik G, Cremaschi GA (1995) Down-regulation of β-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. *FEBS Lett.* **364**, 120-124.

Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetrut C, Hoffmann J, Bulet P (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.

Chapple JP, Smerdon GR, Hawkins AJS (1997) Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*, tissue specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **217**, 225-235.

Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA (2000a) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thurnberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish. Res.* **19**: 353-359.

Cheney D, Elston R, Cherr G, McDonald B, Hamdoun A, Jacobsen J (2000b) Mortality of the Pacific oyster on the U.S. West coast, *Crassostrea gigas*: health screening, environmental links and management options. The Annual International Conference and Exposition of the World Aquaculture Society. Book of Abstracts. p. 126.

Cheng TC, Rodrick GE, Foley DA, Koehler SA (1975) Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* **25**, 261-265.

Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.* **267**, 1244-1252.

Clarke BL, Bost KL (1989) Differential expression of functional adrenocorticotropic hormone receptors by subpopulations of lymphocytes. *J. Immunol.* **143**, 464-469.

Clatworthy AL (1996) A simple systems approach to neural-immune communication. *Comp. Biochem. Physiol.* **115A**, 1-10.

Clatworthy AL (1998) Neural-immune interactions: an evolutionary perspective. *Neuroimmunomodulation* **5**, 136-142.

Clegg JS, Uhlinger KR, Jackson SA, Cherr GN, Rifkin E, Friedman CS (1998) Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**, 21-30.

Clements JA, Funder JW, Tracy K, Morgan FJ, Campbell DJ, Lewis P, Hearn MTW (1982) Adrenocorticotropin, β-endorphin and b-lipoprotein in normal thyroid and lung: possible implications for ectopic hormone secretion. *Endocrinol*. **111**, 2097-2102.

Cochrane BJ, Irby RB, Snell TW (1991) Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **98**, 385-390.

Coon SL, Bonar DB (1987). Pharmacological evidence that α_1-adrenoceptors mediate metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Neurosci.* **23**, 1169-1174.

Cooper EL, Franchini A, Ottaviani E (1995) Earthworm coelomocytes possess immunoreactive cytokines and POMC-derived peptides. *Animal Biol.* **4**, 25-29.

Cotecchia S, Exum S, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Regions of the α_1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 2896-2900.

Crabtree GR, Munck A, Smith KA (1980) Glucocorticoids and lymphocytes. II. Cell cycle-dependent changes in glucocorticoid receptor content. *J. Immunol.* **125**, 13-17.

Cremaschi GA, Genaro AM, Cazaux CA, Anesini C, Wald M, Borda T, Sterin-Borda L (2000) Altered β-adrenoceptor function associated to protein kinase C activation in hyperproliferative T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* **110**, 57-65.

Cupps TR, Gerrard TL, Falkoff RJ, Whalen G, Fauci AS (1985) Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Clin. Invest.* **75**, 754-761.

David J-C, Coulon J-F (1985) Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Prog. Neurobiol.* **24**, 141-185.

Depelchin A, Letesson JJ (1981) Adrenaline influence on the immune response. I. Accelerating or suppressor effects according to the time of application. *Immunol. Lett.* **3**, 199-205.

Deslou-Paoli J-M, Heral M, Berthome JP, Razet D, Garnier J (1982) Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thumberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* **45**, 319-327.

Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachère E (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolates from the shrimp *Penaeus vannamei* (*Decapoda*). *J. Biol. Chem.* 272, 28398-28406.

Dhainaut-Courtois N, Dubois MP, Tramu G, Masson M (1985) Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Muller (*Annelida Polychaeta*) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell Tissue Res.* **242**, 97-108.

Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH (1985) Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* **5**, 2119-2142.

Duvaux-Miret O, Capron A (1992) Proopiomelanocortin in the helminth *Schistosoma mansoni*. Synthesis of β-endorphin, ACTH, and alpha-MSH. Existence of POMC-related sequences. *Ann. NY Acad. Sci.* **650**, 245-50.

Duvaux-Miret O, Stefano GB, Smith EM, Dissous C, Capron A (1992) Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 778-781.

Dyer SD, Dickson KL, Zimmermann EG, Sanders BM (1990) Tissue-specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.* **69**, 2021-2027.

Dyrynda, EA, Pipe RK, Ratcliffe NA (1997) Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* **289**, 527-536.

Elston RA, Beattie JH, Friedman C, Hedrick RP, Kent ML (1987) Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Fish. Dis.* 10, 121-132.

Elston RA (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annu. Rev. Fish Dis.* 259-276.

Emson PC, Corder R, Ratter SJ, Tomlin S, Lowry PJ, Rees LH, Arregui A, Rosser MN (1984) Regional distribution of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the human brain. *Neuroendocrinol*. **38**, 45-50.

Escoubas JM, Briant L, Montagnani C, Hez S, Devaux C, Roch P (1999) Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. FEB*S Lett.* 453, 293-298.

Eskay RL, Eiden LE (1992) Interleukin-1α and tumor necrosis factor-α differentially regulate enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, and substance P biosynthesis in chromaffin cells. *Endocrinology* **130**, 2252-2258.

Felten DL, Felten SY (1988) Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav. Immun.* **2**, 293-300.

Ferreira SH, Vane JR (1967) Half-lives of peptides and amines in the circulation. *Nature* **215**, 1237-1240.

Finotto S, Krieglstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Bruhl B, Beier K, Metz J, Garcia-Arraras JE, Roig-Lopez JL, Monaghan P, Schmid W, Cole TJ, Kellendonk C, Tronche F, Schutz G, Unsicker K (1999) Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* **126**, 2935-2944.

Forander P, Hoffer B, Stromberg I (1998) Nerve fiber formation and catecholamine content in adult rat adrenal medullary transplants after treatment with NGF, NT-3, NT-4/5, bFGF, CNTF, and GDNF. *Cell Tissue Res.* **292**, 503-512.

Franchini A, Miyan JA, Ottaviani E (1996) Induction of ACTH- and TNF-α-like molecules in the hemocytes of *Calliphora vomitora* (Insecta, Diptera). *Tissue Cell* **28**, 585-592.

Friedman CS, Beattie JH, Elston RA, Hedrick RP (1991) Investigation of the relationship between the presence of Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Thunberg. *Aquaculture* **94**, 1-15.

Friedman CS, Cherr GN, Clegg JS, Hamdoun AH, Jacobsen JL, Jackson SA, Uhlinger KR (1999) Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* **18**, 297 (abstract).

Furuya K, Harper MA, Schegg KM, Schooley DA (2000) Isolation and characterization of CRF-related diuretic hormones from the whitelined sphinx moth *Hyles lineata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 127-133.

Genedani S, Bernardi M, Ottaviani E, Franceschi C, Leung MK, Stefano GB (1994) Differential modulation of invertebrate hemocyte motility by CRF, ACTH, and its fragments. *Peptides* **15**, 203-206.

George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY, O'Dowd BF (1998) A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J. Biol. Chem.* **273**, 30244-30248.

Gillis S, Crabtree GR, Smith KA (1979) Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.* **123**, 1632-1638.

Goldstein P, Ojcius DM, Young D-E (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* **121**, 29-65.

Gorbman A (1995) Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**, 171-178.

Gourdon I, Guérin MC, Torreilles J (1998) Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins. *C. R. Soc. Biol.* **192**, 749-774.

Gross PS, Clow LA, Smith LC (2000) SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. *Immunogenetics* **51**, 1034-1044.

Gustafsson MKS, Eriksson K (1991) Localisation and identification of catecholamines in the nervous system of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Parasitol. Res.* **77**, 498-502.

Guyre PM, Girard MT, Morganelli PM, Manganiello PD (1988) Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. *J. Steroid Biochem.* **30**, 89-93.

Hansen BL, Hansen GN, Scharrer B (1986) Immunocytochemical demonstration of a material resembling vertebrate ACTH and MSH in the corpus cardiacum-corpus allatum complex of the insect *Leucophaea maderae*. In Handbook of Comparative Aspects of Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms. Volume 1. Ed. Stefano GB. CRC Press, Boca Raton. pp 213-222.

Hart BB, Stanford GG, Ziegler MG, Lake R, Chernow B (1989) Catecholamines: Study of interspecies variation. *Crit. Care Med.* **17**, 1203-1222.

Heifets L. (1982) Centennial of Metchnikoff's discovery. *J. Reticuloendothel. Soc.* **31**, 381-391.

Henderson IW (1997) Endocrinology of the vertebrates. *In* Handbook of Physiology. Section 13: Comparative Physiology, Volume I. Ed. Dantzler WH. Oxford University Press Inc., New York, USA. pp 623-749.

Hétru C, Hoffman D, Bulet P (1998) Antimicrobial peptides from insects. *In* Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Ed. Brey PT, Hultmark D. Chapman and Hall, Londres, Angleterre. pp. 40-66.

Hirschberg H, Hirschberg T, Nausieainen H, Braathen LR, Joffe E (1982) The effects of corticosteroid on the antigen presenting properties of human monocytes and endothelial cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **23**, 577-585.

Holden RJ, Pakula IS, Mooney PA (1998) An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma. *Med. Hypotheses* **51**, 309-314.

Hsu SC, DeFranco DB (1995) Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J. Biol. Chem.* **270**, 3359-3364.

Hughes AL (1998) Protein phylogenies provide evidence of a radical discontinuity between arthropod and vertebrate immune systems. *Immunogenetics* **47**, 283-296.

Imai TK, Numachi J, Oizumi J, Sato S (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiments (en Japonais avec résumé en Anglais). *Bull. Tohoku Regional Fish. Res. Lab.* **25**, 27-38.

Irwin M, Jones, L (1991) Life stress, depression and reduced natural toxicity: clinical findings and putative mechanisms. *In* Stress and Immunity. Ed Plotnikoff N, Murgo A, Faith R, Wybran J. CRC Press, Boca Raton, Floride, USA. pp 109-128.

Iwanaga S, Kawabata SI, Muta T (1998) New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structure and functions. *J. Biochem.* **123**, 1-15.

Jafarian-Tehrani M, Sternberg EM (1999) Animal models of neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *J. Neuroimmunol.* **100**, 13-20.

Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW (1992) Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Behav Rev.* **16**, 115-130.

Johnson EW, Blalock JE, Smith EM (1988) ACTH receptor induction of leukocyte cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1205-1211.

Johnson HM, Smith EM, Torres BA, Blalock JE (1982) Regulation of the *in vitro* antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4171-4174.

Kasahara M (1999) Genome dynamics of the major histocompatibility complex: insights from genome paralogy. *Immunogenetics* **50**, 134-45.

Kasahara M (2000) Genome paralogy: a new perspective on the organization and origin of the major histocompatibility complex. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **248**, 53-66.

Kelso A, Munck A (1984) Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.* **133**, 784-791.

Kohn (1902) Das chromaffin Gewebe. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch* **12**, 253-348.

Konfrol Z, Remick DG (2000) Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am. J. Psychiatry* **157**, 683-694.

Kroschinski J, Renwrantz L (1988) Determination of pH values inside the digestive vacuoles of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Invert. Pathol.* **51**, 73-79.

Kuby J (1994) Immunology. Second Edition. WH Freeman and Co, New York, USA. 660 pp.

Landau M, Biggers WJ, Laufer H (1997) Invertebrate endocrinology. *In* Handbook of Physiology. Section 13: Comparative Physiology, Volume II. Ed. Dantzler WH, Oxford University Press Inc., New York, USA. pp 1291-1390.

Landis SC, Patterson PH (1981) Neural crest cell lineages. *Trends Neurosci.* **4**, 172-175.

Leach L, Trudgill DL, Gahan PB (1987) Immunocytochemical localization of neurosecretory amines and peptides in the free-living nematode, *Goodeyus ulmi*. *Histochem J.* **19**, 471-475.

Lee M, Taylor GT, Bricelj M, Ford SE, Zahn S (1996) Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shell. Res.* **15**, 319-329.

LeRoith D, Liotta AS, Roth J, Shiloach J, Lewis ME, Pert CB, Krieger DT (1982). Corticotropin and β-endorphin-like materials are native to unicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **79**, 2086-2090.

Leung MK, Boer HH, van Minnen J, Lundy J, Stefano GB (1990) Evidence for an enkephalinergic system in the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res*. **531**, 66-71.

Livett BG, Marley PD (1993) Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion. *J Anat.* **183**, 277-289.

Madden KS, Felten DL (1995) Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* **75**, 77-106.

Mailhos C, Howard MK, Latchman DS (1993) Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* **55**, 621-627.

Malagoli D, Franchini A, Ottaviani E (2000) Synergistic role of cAMP and IP(3) in corticotropin-releasing hormone-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. *Peptides* **21**, 175-182.

Malham SK, Runham NW, Secombes CJ (1998) Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). *Dev. Comp. Immunol.* **22**, 27-37.

Manger P, Li J, Christensen BM, Yoshino TP (1996) Biogenic monoamines in the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: influence of infection by the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **114**, 227-234.

Margioris A, Liotta AS, Vaudry H, Bardin CW, Krieger DT (1983) Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin-related peptides in rat testes. *Endocrinol*. **113**, 663-671.

Martínez G, Rivera A (1994) Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* **25**, 167-174.

Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of nonspecificity in stress theory. *J. Psychiatr. Res.* **8**, 323-333.

Maule AG, Vanderkooi SP (1999) Stress-induced immune-endocrine interaction. *In:* Stress physiology in animals. Ed. Balm, PHM, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, Angleterre. pp. 205-245.

Mazeaud MM, Mazeaud F (1981) Adrenergic responses to stress in fish. *In* Stress and Fish. Ed. Pickering AD. Academic Press, Londres. pp. 49-75.

Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM (1977) Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fisheries Soc.* **106**, 201-212.

Mc Allister LB, Scheller RH, Kandel ER, Axel R (1983) *In situ* hybridization to study the origin and fate of identified neurons. *Science* **222**, 800-808.

McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* **83**, 387-395.

McHeyzer-Williams MG, Davis MM (1995) Antigen-specific development of primary and memory T cells *in vivo*. *Science* **268**, 106-111.

Metchnikoff EE (1901) Immunity In Infective Diseases. Cambridge University Press, Angleterre.

Meyer WJ 3d, Smith EM, Richards GE, Cavallo A, Morrill AC, Blalock JE (1987) *In vivo* immunoreactive adrenocorticotropin (ACTH) production by human mononuclear leukocytes from normal and ACTH-deficient individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**, 98-105.

Minier C, Eufemia N, Epel D (1999) The multixenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Ecotoxicol. Biomak.* **4**, 442-454.

Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicol.* **50**, 167-176.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* **78**, 189-225.

Mitta G, Vandenbulcke F, Noel T, Romestand B, Beauvillain JC, Salzet M, Roch P (2000b) Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* **113**, 2759-2769.

Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P (2000a) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* **486**, 185-190.

Moreno H, Nadal M, Leznik E, Sugimori M, Lax I, Schlessinger J, Llinas R (1998) Nerve growth factor acutely reduces chemical transmission by means of postsynaptic TrkA-like receptors in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14997-15002.

Mosser DD, Caron AW, Bourget I, Denis-Larose C, Massie B (1992) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5317-5327.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y (1995) Speroxyde anion generation in *Drosophila* during melanoti encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.* **68**, 450-456.

Nicolas JL, Comps M, Cochennec N (1992) Herpes-like virus infection of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **12**, 11-13.

Nikinmaa A (1992) Membrane transport and control of hemoglobin oxygen affinity in nucleated erythrocytes. *Physiol. Rev.* **72**, 301-321.

Nonaka M, Azumi K (1999) Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 421-427

O'Dowd BF, Lefkowitz RJ, Caron MG (1989) Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu Rev Neurosci*. **12**, 67-83.

Olivereau M, Moons L, Ollevier F, Vandesande F (1988) Coexistence of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and vasotocin in perikarya of the preoptic nucleus in the eel. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**, 41-48.

Olivereau M, Ollevier F, Vandesande F, Verdonk W (1984) Immunocytochemical identification of CRF-like and SRIF-like peptides in the brain and pituitary of cyprinid fish. *Cell Tissue Res.* **237**, 379-382.

Osada M, Nomura T (1989) Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93C**, 171-173.

Ottaviani E, Cossarizza A (1990) Immunocytochemical evidence of vertebrate bioactive peptide-like molecules in the immuno cell types of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (*Gastropoda*, *Pulmonata*). *FEBS Lett.* **267**, 250-252.

Ottaviani E, Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C (1991) ACTH-like molecules in gastropod molluscs: a possible role in ancestral immune response and stress. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **245**, 215-218.

Ottaviani E, Franchini A, Caselgrandi E, Cossarizza A, Franceschi C (1994) Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. *FEBS Lett*. **351**, 19-21.

Ottaviani E, Capriglione T, Franceschi C (1995) Invertebrate and vertebrate immune cells express pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA. *Brain Behav. Immun*. **9**, 1-8.

Ottaviani E, Franceschi C (1996) The neuroendocrinology of stress from invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* **48**, 421-440.

Ottaviani E, Franceschi C (1997) The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol. Today* **18**, 169-174.

Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C (1998) Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone and cortisol molecules in invertebrate haemocytes and lower and higher vertebrate thymus. *Histochem. J.* **30**, 61-67.

Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol.* **275**, R1247-R1255.

Pani AK, Anctil M (1994) Quantitative survey of biogenic amines, their precursors and metabolites in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *Biogenic Amines* **10**, 161-180.

Pani KA, Croll RP (1995) Distribution of catecholamines, indoleamines and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (*Bivalvia*, *Pectinidae*). *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**, 371-386.

Pani AK, Croll RP (1998) Pharmacological analysis of monoamine synthesis and catabolism in the scallop, *Placopecten magellanicus*. *Gen. Pharmacol*. **31**, 67-73.

Panzica GC, Viglieti-Panzica C, Fasolo A, Vandesande F (1986) CRF-like immunoreactive system in the quail brain. *J. Hirnforsch.* **27**, 539-545.

Perdue JA, Beattie JH, Chew KK (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*C. gigas*) in Washington state. *J. Shellfish Res.* **1**, 9-16.

Perry SF, Fritsche R, Thomas S (1993). Storage and release of catecholamines from the chromaffin tissue of the atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *J. Exp. Biol.* **183**, 165-184.

Perry SF, Gilmour KM (1999) Respiratory and cardiovascular systems during stress. *In:* Stress physiology in animals. Ed. Balm, PHM. Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, Angleterre. pp. 52-107.

Pertseva MN, Kuznetzova LA, Pestneva SA, Grishin AV (1992) β-agonist-induced inhibitory-guanine-nucleotide-binding regulatory protein coupling to adenylate cyclase in mollusc *Anodonta cygnea* foot muscle sarcolemma. *Eur. J. Biochem.* **210**, 279-286.

Pestarino M, De Anna E, Masini MA, Sturla M (1997) Localization of interleukin-1 beta mRNA in the cerebral ganglion of the protochordate, *Styela plicata*. *Neurosci. Lett.* **222**, 151-154.

Pestarino M, Facchinetti F (1995) Immunocytochemical localization and biochemical characterization of melanotropin-like peptides in the gonads of a protochordate. *Peptides*. **16**, 1269-1272.

Petrusz P, Merchenthaler I., Maderdrut JL, Vigh S, Schally AV (1983) Corticotrophin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the vertebrate endocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1721-1725.

Pickering AD, Pottinger TG (1995) Biochemical effects of stress. *In* Environmental and Ecological Biochemistry. Ed. Hodchachka PW, Mommsen TP. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas. pp 349-379.

Pipe RK, Farley SR, Coles JA (1997) The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* **289**, 537-545.

Pires A, Coon SL, Hadfield MG (1997) Catecholamines and dihydroxyphenyl-alanine in metamorphosing larvae of the nudibranch *Phestilla sibogae*, Bergh (Gastropoda, Opistobranchia). *J. Comp. Physiol.* **181A**, 187-194.

Pottinger TG (1999) Impact of stress on animal reproductive activities. *In:* Stress physiology in animals. Ed. Balm, PHM, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, Angleterre. pp. 205-245.Reid 1998

Raftos DA, Cooper EL, Habicht GS, Beck G (1991) Invertebrate cytokines: tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9518-9522.

Raftos DA, Cooper EL, Stillman DL, Habicht GS, Beck G (1992) Invertebrate cytokines II: release of interleukin-1-like molecules from tunicate hemocytes stimulated with zymosan. *Lymphokine Cytokine Res.* **11**, 235-240.

Reid SG, Bernier NJ, Perry SF (1998) The adrenergic response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.* **120C**, 1-27.

Remy C, Tramu G, Dubois MP (1982) Immunohistological demonstration of a CRF-like material in the central nervous system of the annelid *Dendrobaena*. *Cell Tissue Res.* **227**, 569-575.

Renault TN, Cochennec N, Le Deuff RM, Chollet B (1994) Herpes-like virus infection of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **14**, 64-66.

Renwrantz L (1990) Internal defense system of *Mytilus edulis*. *In* Neurobiology Of *Mytilus Edulis*. Ed. Stephano GB. Manchester University Press, Angleterre. pp. 256-275.

Ridway, R. L., Syed, N.I., Lubowiak, K. & Bulloch, A. G. M. (1991) Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurobiol.* **22**, 377-390.

Rinehart JJ, Wuest D, Ackerman GA (1982) Corticosteroid alteration of human monocyte to macrophage differentiation. *J. Immunol.* **129**, 1436-1440.

Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W (1982) *In vivo* corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β-endorphin and corticosterone. *Endocrinology* **110**, 272-278.

Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed invertebrates. *Aquaculture* **172**, 125-145.

Roitt I, Brostoff J, Male D (1998) Immunology. Fifth edition. Mosby International Ltd. London, Angleterre. 423 pp.

Rosza KS (1984) The pharmacology of molluscan neurons. *Prog. Neurobiol.* **23**, 79-150.

Sakharov DA, Salanski J (1982) Effects of dopamine antagonists on snail locomotion. *Experientia* **38**, 1090-1091.

Salzet B, Stefano GB, Verger-Bocquet M, Salzet M (1998) Putative leech dopamine1-like receptor molecular characterization: sequence homologies between dopamine and serotonin leech CNS receptors explain pharmacological cross-reactivities. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **58**, 47-58.

Salzet M, Salzet-Raveillon B, Cocquerelle C, Verger-Bocquet M, Pryor SC, Rialas CM, Laurent V, Stefano GB (1997) Leech immunocytes contain proopiomelanocortin: nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing. *J Immunol.* **159**, 5400-5411.

Samali A, Orrenius S (1998) Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* **3**, 228-236.

Sanchez-Franco F, Patel YC, Reichlin S (1981) Immunoreactive adrenocorticotropin in the gastrointestinal tract and pancreatic islets of the rat. *Endocrinol*. **108**, 2235-2238.

Sanders BM (1993) Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 49-75.

Sapolsky RM (1996) Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress* **1**, 1-19.

Scheiman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr (1995) Role of transcriptional activation of IκBα in the mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283-286.

Scheurink AJ, Steffens AB (1990) Central and peripheral control of sympathoadrenal activity and energy metabolism in rats. *Physiol Behav.* **48**, 909-920.

Schols D, Verhaert P, Huybrechts R, Vaudry H, Jegou S, De Loof A (1987) Immunocytochemical demonstration of proopiomelanocortin- and other opioid-related substances and a CRF-like peptide in the gut of the american cockroach, *Periplaneta americana* L. *Histochemistry* **86**, 345-351.

Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**, 32.

Seyle H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.* **1**, 1383-1392.

Seyle H (1973) The evolution of the stress concept. *Am. Scientist* **61**, 692-699.

Shepherd SP, Holzwarth MA (1998) Frog chromaffin and adrenocortical cell co-cultures: a model for the study of medullary control of corticosteroidogenesis. *J. Neuroendocrinol.* **10**, 539-549.

Shimizu T, Mihara M, Takeda N (1991) High-performance liquid chromatography of biogenic amines in the corpus cardiacum of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Chromatogr.* **539**, 193-197.

Shipp MA, Stefano GB, D'Adamio L, Switzer SN, Howard FD, Sinisterra J, Scharrer B, Reinherz EL (1990) Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature* **347**, 394-396.

Sindermann CJ (1990) Principal diseases of marine fish and shellfish, vol. 2. Academic Press, San Diego, Californie, USA. 521 pp.

Sloley BD, Juorio AV, Durden DA (1990) High-performance liquid chromatographic analysis of monoamines and some of their γ-glutamyl conjugates produced by the brain and other tissues of *Helix aspersa* (Gastropoda). *Cell. Mol. Neurobiol.* **10**, 175-191.

Smith EM, Meyer WJ, Blalock JE (1982) Virus-induced corticosterone in hypophysectomized mice: a possible lymphoid adrenal axis. *Science* **218**, 1311-1312.

Smith EM, Morrill AC, Meyer III, Blalock JE (1986) Corticotropin-releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature* **321**, 881-882.

Smith EM, Hughes TK, Scharrer B, Leung MK, Stefano GB (1990) The production and action of ACTH-related peptides in invertebrate hemocytes. *Adv. Neuroimmunol*. **1**, 7-18.

Smith EM, Hughes TK, Cadet P, Stefano GB (1992) Corticotropin-releasing factor induced immunosuppression in human and invertebrate immunocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **12**, 473-481.

Sneddon LU, Taylor AC, Huntingford FA, Watson DG (2000) Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.* **203**, 537-545.

Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23-28.

Sonetti D, Vacirca F, Fasolo A (1986) Localization of substance P (SP)-, neuropeptide Y (NPY)- and corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactive cells in the CNS of the freshwater *Planorbarius corneus. Neurosci. Lett Suppl.* **26**, 322.

Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6517-6521.

Stefano GB, Catapane EJ (1977) The effects of temperature acclimation on monoamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **203**, 449-456.

Stefano GB (1982) Comparative aspects of opioid-dopamine interaction. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2**, 167-178.

Stefano GB, Smith EM, Hughes TK (1991) Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes: an interleukin-1-like substance in invertebrate neural tissue. *J. Neuroimmunol.* **32**, 29-34.

Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN (1993) Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11099-11103.

Stefano GB, Smith EM (1996) Adrenocorticotropin, a central trigger in immune responsiveness: tonal inhibition of immune activation. *Med. Hypotheses* **46**, 471-478

Stefano GB, Salzet M (1999) Invertebrate opioid precursors: evolutionary conservation and the significance of enzymatic processing. *Int. Rev. Cytol.* **187**, 261-286.

Stefano GB, Salzet-Raveillon B, Salzet M (1999) *Mytilus edulis* hemolymph contains pro-opiomelanocortin: LPS and morphine stimulate differential processing. *Brain Res.* **63**, 340-350.

Steffens AB, de Boer SF (1999) Impact of stress on animal intermediate metabolism. *In:* Stress physiology in animals. Ed. Balm, PHM, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, Angleterre. pp. 205-245.

Sternberg EM (2000) Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Prog. Brain Res.* **122**, 35-42.

Stevenson PA, Hofmann HA, Schoch K, Schildberger K (2000) The fight and flight responses of crickets depleted of biogenic amines. *J. Neurobiol.* **43**, 107-120.

Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K (1984) Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**, 861-866.

Suryanarayana S, von Zastrow M, Kobilka BK (1992) Identification of intramolecular interactions in adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 21991-21994.

Syed NI, Winlow W (1991) Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator. *J. Comp. Physiol.* **169A**, 557-568.

Takamine J (1901) Adrenaline, the active principle of the suprarenal gland and its mode of preparation. *Am. J. Pharm.* **73**, 523-531.

Takeda N (1992) Biogenic monoamine levels in the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol.* **103C**, 511-519.

Tamate HK, Numachi K, Mori K, Itikawa O, Imai T (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay: pathological studies. (en Japonais avec résumé en Anglais). *Bull. Tohoku Regional Fish. Res. Lab.* **25**, 89-104.

Te Brugge VA, Miksys SM, Coast GM, Schooley DA, Orchard I (1999) The distribution of a CRF-like diuretic peptide in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol.* **202**, 2017-2027.

Tirard CT, Grossfeld RM, Levine JF, Kennedy-Stroskopf S (1995) Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **5**, 9-25.

Tonon MC, Burlet A, Lauber M, Cuet P, Jégou S, Gouteux L, Ling N, Vaudry H (1985) Immunohistochemical localization and radioimmunoassay of corticotropin-releasing factor in the forebrain and hypophysis of the frog *Rana ridibunda*. *Neuroendocrinol.* **40**, 109-119.

Torreilles J, Guérin MC, Roch P (1996) Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C. R. Acad. Sci.* **319**, 209-218.

Tuominen RK, McMillian MK, Ye H, Stachowiak MK, Hudson PM, Hong JS (1992) Long-term activation of protein kinase C by nicotine in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem.* **58**, 1652-1658.

Turnbull AV, Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* **79**, 1-71.

Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H (1978) Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3498-3502.

Unsicker K, Krieglstein K (1996) Growth factors in chromaffin cells. *Prog Neurobiol.* **48**, 307-324.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β-endorphin. *Science* **213**, 1394-1397.

Vallarino M, Fasolo A, Ottonello I, Perroteau I, Tonon MC, Vandessande F, Vaudry H (1989) Localization of corticotropin-releasing hormone (CRF)-like immunoreactivity in the central nervous system of the elasmobranch fish *Scyliorhynus canicula*. *Cell Tissue Res.* **258**, 541-546.

van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibanez CF, Geraerts WP, Bulloch AG (1998) Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J.* **17**, 2534-2542.

van Noorden S, Fritsch HAR, Grillo TAI, Polak JM, Pearse AGE (1980) Immunocytochemical staining for vertebrate peptides in the nervous system of a gastropod mollusc. *Gen. Comp. Endocrinol.* **40**, 375-376.

Vasta GR, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 401-420.

Verhaert P, Marivoet S, Vandesande F, De Loof A (1984) Localization of CRF immunoreactivity in the central nervous system of three vertebrate and one insect species. *Cell Tissue Res.* **238**, 49-53.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39-51.

Vogel KS, Weston JA (1990) The sympathoadrenal lineage in avian embryos. I. Adrenal chromaffin cells lose neuronal traits during embryogenesis. *Dev. Biol.* **139**, 1-12.

Wajeman-Chao SA, Lancaster SA, Graf LH Jr, Chambers DA (1998) Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. *J. Immunol.* **161**, 4825-4833.

Webster EL, de Souza EB (1988) Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification, autoradiographic localization and regulation by divalent cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* **122**, 609-617.

Weigent DA, Blalock JE (1997) Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Chem. Immunol.* **69**, 1-30.

Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591-625.

Werner I, Nagel R (1997) Stress proteins hsp60 and hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthrene. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2393-2403.

Werner I, Hinton DE (1999) Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers* **6**, 473-484.

Wilder RL (1995) Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 307-338.

Williams JH, Farag AM, Stansbury MA, Young PA, Bergman HL, Petersen NS (1996) Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. *Exp. Toxicol. Chem.* **15**, 1324-1328.

Wingfield JC, Ramenofsky M (1999) Hormones and the behavioral ecology of stress. *In:* Stress physiology in animals. Ed. Balm, PHM, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, Angleterre. pp. 205-245.

Yulis CR, Ledis K, Wong KL, Fischer AW (1986) Localization of urotensin I- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the central nervous system of *Catostomus commersoni*. *Peptides* **7**, 79-86.

Zatta (1987) Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* **96**, 479-481.