

CELLULES SOUCHES SOMATIQUES ET HEMATOPOÏESE CHEZ LE MOLLUSQUE

Patricia CAVELIER^{1,3}, Julien CAU^{1,4}, Jean Marc STRUB^{5,6},
Mohamed JEMAA^{1,2}, Nathalie MORIN^{1,2}, Claude DELSERT^{1,2,7,*}

*claudedelsert@crbm.cnrs.fr

1. Université de Montpellier, 34095 MONTPELLIER, France
2. CRBM CNRS UMR5237, 34293 MONTPELLIER, France
3. IGMM CNRS UMR 5535, 34293 MONTPELLIER, France
4. IGH CNRS UPR 1142, 34396 MONTPELLIER, France
5. Université de Strasbourg, 67081 STRASBOURG, France
6. IPHC CNRS UMR7178, 67037 STRASBOURG, France
7. IFREMER, 34293 MONTPELLIER, France

RESUME

L'origine du renouvellement des tissus fait débat chez le mollusque car aucune évidence de cellules souches n'a été montrée à ce jour au sein de ce vaste phylum.

Cette question est d'autant plus fondamentale que la croissance se fait tout au long de la vie du mollusque et que ce groupe renferme les animaux vivants les plus vieux connus, tels ces spécimens du bivalve *Arctica islandica* âgés de plus de 500 ans. Par ailleurs, l'origine des hémocytes, les cellules sanguines qui participent à la défense immunitaire innée chez l'invertébré, reste inconnue chez le mollusque. Or l'hématopoïèse est le processus physiologique produisant le plus grand nombre de cellules somatiques chez l'animal adulte. Elle se déroule dans un tissu spécifique, appelé glande lymphatique, dans lequel on observe une prolifération de cellules précurseurs. La recherche de cellules souches somatiques chez le mollusque pourrait donc potentiellement se confondre avec la mise en évidence de l'hématopoïèse.

L'analyse histologique a initialement montré que certaines zones de la branchie relâchent dans l'hémolymphe des cellules petites d'une morphologie correspondant aux cellules souches ou précurseurs. Dans ces mêmes régions, le marquage à la bromodéoxycytidine (BrdU) a révélé une très intense réplication de l'ADN. Et en effet, un anticorps anti-phospho histone H3 montre une prolifération cellulaire dans la branchie. Par ailleurs, la détection de Sox2 dans de nombreuses cellules de petite taille prouve l'existence d'une forte population de cellules souches ou précurseurs dans la branchie.

Enfin, l'utilisation des marqueurs d'hémocytes, Superoxyde Dismutase (SOD) et Filamine, montre que des cellules qui prolifèrent dans la branchie, s'y différencient ensuite en hémocytes. L'ensemble de ces résultats démontre donc deux faits fondamentaux qui sont (i) l'existence des cellules souches chez le mollusque et (ii) le déroulement de l'hématopoïèse dans la branchie des bivalves.

INTRODUCTION

Les animaux à très longue durée de vie sont qualifiés de non sénescents (1) car ils ne montrent pas de déclin physiologique au cours de leur vie. Ainsi, les bivalves, groupe de mollusques qui renferme les animaux vivants les plus vieux connus (2), croissent et assurent leur défense immunitaire tout au long de leur vie (3). Chez les mollusques, la défense immunitaire est uniquement innée et elle est essentiellement assurée par les cellules sanguines, les hémocytes, qui assurent également d'autres fonctions (4). Les cellules immunitaires chez l'animal dérivent d'une population de cellules souches et de précurseurs qui se renouvellent constamment et qui sont hébergées dans un organe hématopoïétique (5) aussi appelé glande lymphatique. Chez le mollusque, l'origine des hémocytes et notamment l'existence de cellules souches ou précurseurs, ainsi que le lieu de l'hématopoïèse sont inconnus (6). Le fait que la génétique ne soit pas aisément utilisable chez ces espèces, que la génomique y soit encore peu développée et que la culture de lignées cellulaires stables n'existe pas chez les invertébrés marins, nous a conduit à rechercher des évidences de cellules souches ou précurseurs directement au niveau des tissus. Techniquement, afin d'obtenir des informations au niveau cellulaire, nous avons essentiellement utilisé la microscopie confocale sur des coupes transversales d'huîtres révélées par immunofluorescence.

L'analyse histologique de la branchie d'huître montre qu'en dehors d'une organisation en plis réguliers, connue depuis longtemps (7), il existe des structures d'organisation irrégulière jamais décrites auparavant. Ces structures moins denses ont permis d'observer le relargage de petites cellules arrondies dans l'hémolymphe, cellules qui présentent un fin cytoplasme entourant le noyau, une morphologie typique des cellules souches. Le marquage de coupes de tissus par le BrdU, un analogue du nucléotide thymidine, montre que ces petites cellules sont localisées dans l'épithélium de la branchie ou à sa proximité immédiate, répliquent intensément leur ADN. Ce résultat a été confirmé par la détection du marqueur de mitose H3P, l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10, dans ces cellules. La branchie est donc le lieu de mitoses abondantes chez l'adulte, un caractère fondamental de l'organe hématopoïétique, bien connu chez les vertébrés (5).

L'existence d'une population de cellules souches ou précurseurs a quant à elle, été établie grâce à la détection de Sox2, un facteur de transcription tissu-spécifique (8), dans les petites cellules épithéliales de la branchie.

La détection conjointe des marqueurs Sox2 et SOD, un marqueur spécifique des hémocytes (9), a révélé que les cellules souches ou précurseurs peuvent se différencier en hémocyte au niveau de la branchie.

Enfin, l'analyse de l'incorporation de BrdU dans les cellules d'un fragment de branchie isolé et la détection concomitante de Filamine, un nouveau marqueur d'hémocyte, a permis de montrer que des cellules ayant proliféré dans la branchie sont aussi capables de s'y différencier en hémocyte (10). La branchie est donc l'organe lymphoïde du bivalve.

MATERIELS ET METHODES

Histochimie et immunohistochimie

Les tissus ont été fixés dans le réactif de Davidson (pour 1 litre : 330 ml d'éthanol à 95 %, 220 ml de formaldéhyde à 37 %, 115 ml d'acide acétique glacial, 335 ml d'eau de mer filtrée) pendant 16 heures à 4 °C. Les tissus sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de 70 à 100 % puis clarifiés dans le xylène avant inclusion dans

la paraffine. Des sections de 5 μm d'épaisseur sont réalisées avec un microtome HSM355S (Microm) puis séchées à 37 °C. Les sections sont déparaffinées par traitement au xylène puis réhydratées par des bains successifs d'éthanol de 100 % à 70 % puis dans le tampon TBST (50 mmol/L1 Tris (pH 8,0), 150 mmol/L1 NaCl, 0,05 % Tween 20).

Pour l'histologie, les sections sont incubées dans l'hématoxyline pendant 2 minutes puis contrastées avec de l'éosine G pendant 4 mn puis déshydratées dans l'éthanol et le xylène avant montage dans le milieu Mountex (Histolab).

Pour l'immunohistologie, les sections sont perméabilisées pendant 1 heure dans du TBST contenant 0,2 % Triton X100 et 5 % de lait sans matière grasse. Les sections sont ensuite incubées pendant 16 heures à 4 °C en chambre humide avec une dilution d'anticorps primaire dans du TBST contenant 2 % de sérum albumine bovine.

La détection du BrdU nécessite après l'étape de perméabilisation, une dénaturation de l'ADN par incubation dans HCl 2M pendant 30 minutes à 37 °C puis neutralisation brutale dans le tampon Borax (0,1M, pH 9,0) et plusieurs rinçages dans le TBST avant incubation avec l'anticorps monoclonal anti BrdU.

La double détection d'une protéine et du BrdU nécessite que la dénaturation acide soit réalisée après que la protéine a été révélée par l'anticorps secondaire fluorescent.

Marquage des tissus au BrdU

Un volume de 100 μl de solution à 1,6 mM de BrdU (B5002, Sigma-Aldrich) est injecté dans le sinus du muscle adducteur d'une huître (1,8g de chair, n=3) puis l'animal est replacé dans l'eau de mer à température ambiante pendant 6 h avant fixation de l'animal entier. Alternativement, une section transversale de 10 mm d'épaisseur, du niveau du cœur en direction de la bouche, est incubée dans 50 mL de milieu de culture cellulaire L15 (Invitrogen, USA) ajusté à la pression osmotique de l'eau de mer (1100 mOsm). Le milieu contenant 25 μM de BrdU est agité doucement à 15 °C pendant l'incubation qui varie de 1 à 16 heures.

Anticorps

Les anticorps immunopurifiés commerciaux suivants ont été utilisés : anti-BrdU monoclonal (B8434, Sigma Aldrich) au 1/500 ; anti-H3P de lapin (06-570, Merck Millipore, Allemagne) au 1/1000; anti-Sox2 de lapin (ab97959, Abcam, USA) au 1/1000.

Les anticorps de lapin obtenus et immunopurifiés au laboratoire : anti-SOD d'huître (9) au 1/1000 ; anti-Filamine d'huître au 1/000 (10).

Microscopie et quantification

Les images ont été prises sur un Axioimager Z2 (Zeiss) avec des objectifs x20 (Plan Apo 0.8) et x40 (Plan Apo 1,3 huile) DIC (UV) VIS-IR. Les photos ont été enregistrées avec une caméra Coolsnap HQ2 CCD (Roper Scientific) sous le contrôle du logiciel Metamorph 7,1 (Molecular devices). La microscopie Confocale a été réalisée sur un LSM780 Confocal (Zeiss) avec un objectif 40X PLAN APO 1,3 huile DIC (UV) VIS-IR. Des séries de sections confocales ont été collectées. Les images d'histologie ont été prises au Nanozoomer (Hamamatsu, France) et analysées avec le logiciel NDP View (Hamamatsu).

Le comptage manuel des noyaux positifs pour H3P (Alexa555) versus les noyaux totaux (DAPI, bleu) a été réalisé sur des sections confocales acquises à l'objectif x20 et analysées grâce au logiciel ImageJ. La somme des cellules positives pour H3P et pour DAPI a été faite pour la branchie et pour le manteau de chaque animal (n=3).

RESULTATS

Relargage de cellules de type souche ou précurseur dans l'hémolymphe de la branchie

L'étude des sections colorées en hématoxyline – éosine montre des structures irrégulières dans la branchie (**Figure 1A**) à la différence de l'organisation en plissements réguliers connue jusqu'à présent (7). Ces structures moins denses

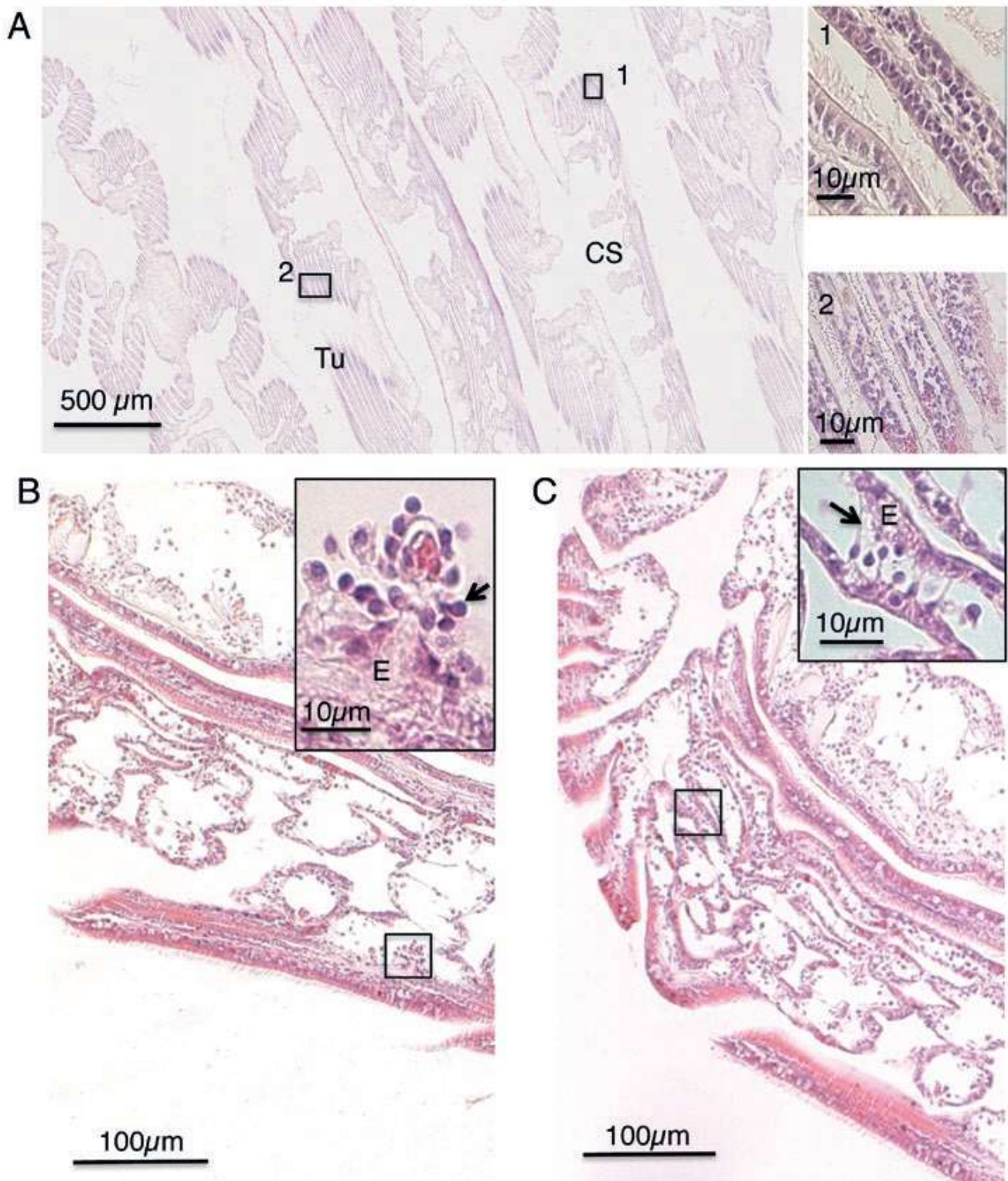


Figure 1 : Détail de la structure de la branchie d'huître. (A) Vue à faible grossissement de l'organisation en empilement de tubules (Tu) et structures irrégulières (Cs). A plus fort grossissement (encarts) des cellules à fin cytoplasme coloré à l'éosine (rose), sont entassées dans la matrice extracellulaire de l'épithélium branchial. (B, C) Détail des zones irrégulières de la branchie. (B) Petites cellules en forme de cil, qui se détachent de la matrice extracellulaire dans l'hémolymphe (encart). (C) Petites cellules à longues extensions cytoplasmiques (flèche, encart) dans l'hémolymphe d'un tubule.

permettent l'observation de petites cellules qui se détachent de l'épithélium de la branchie dans l'hémolymphe (**Figure 1B, encart**). Ailleurs, de longs prolongements cytoplasmiques reliant de petites cellules à la matrice extracellulaire (**Figure 1C, encart**) suggèrent que ces petites cellules sont en train de s'extraire de l'épithélium branchial avant de se détacher dans l'hémolymphe.

Ces cellules dont le cytoplasme est réduit à une mince couche péri-nucléaire possèdent ainsi une morphologie de cellule souche ou précurseur.

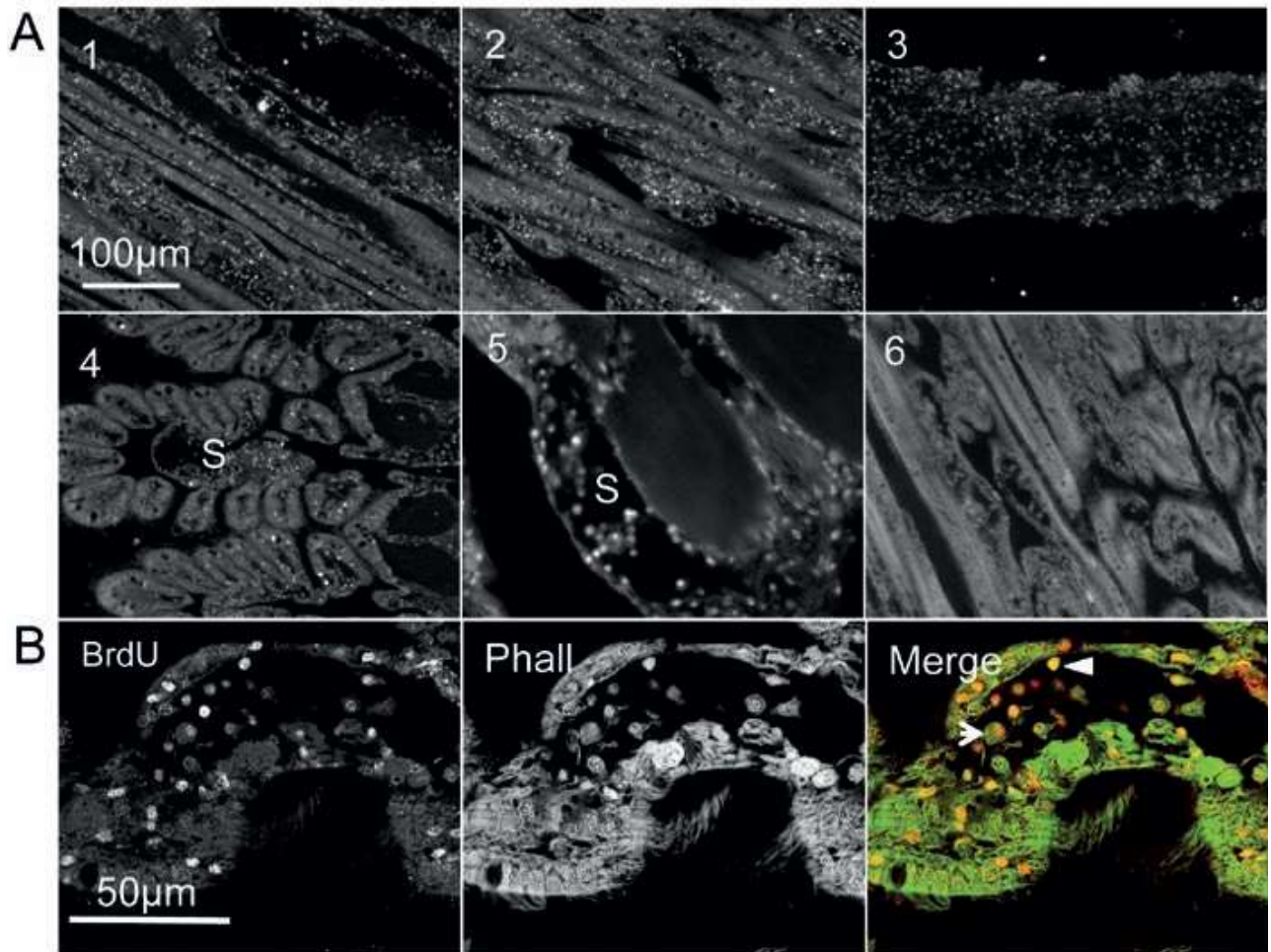


Figure 2 : Intense répliation d'ADN dans les structures irrégulières de la branchie. (A, B) Le tissu a été incubé dans un milieu de culture contenant du BrdU avant fixation et immunohisto-chimie. (A) Vue en fluorescence à faible grossissement de l'incorporation intense de BrdU dans les structures irrégulières de la branchie (1,2) et dans d'autres zones de la branchie (3,4). (5) Vue à plus fort grossissement d'un vaisseau (S) contenant des hémocytes marqués au BrdU. (6) Contrôle négatif de tissu sans BrdU. (B) Coupe de tissu traitée comme ci-dessus mais en présence d'une coloration du cytoplasme (vert, Phalloïdine-Alexa 488). Cette image confocale révèle de petites cellules à cytoplasme fin, une caractéristique des cellules souches, marquées au BrdU (pointe de flèche pleine) dans un vaisseau. Phall, phalloïdine.

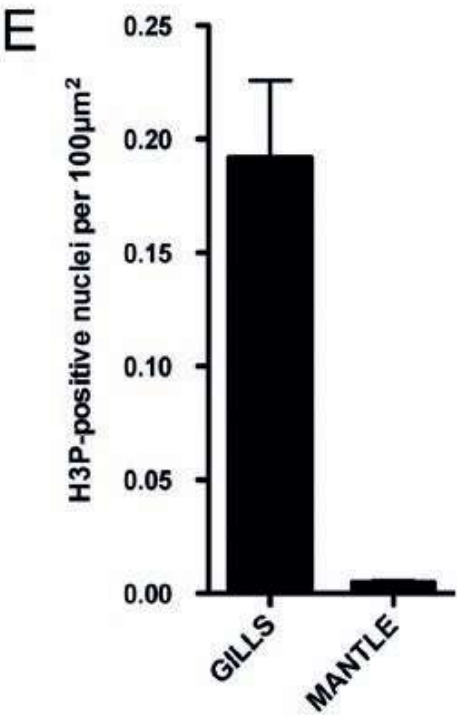
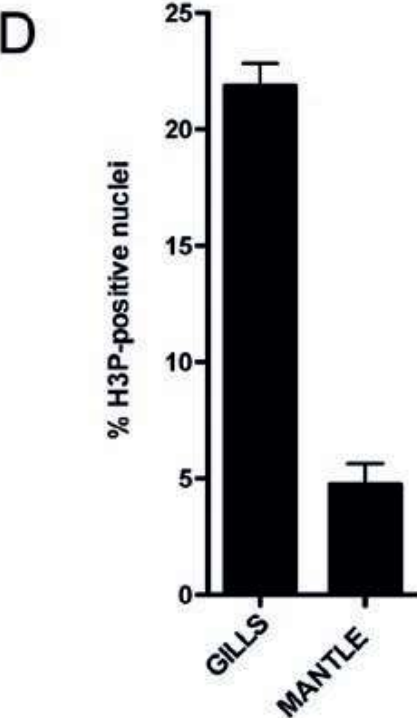
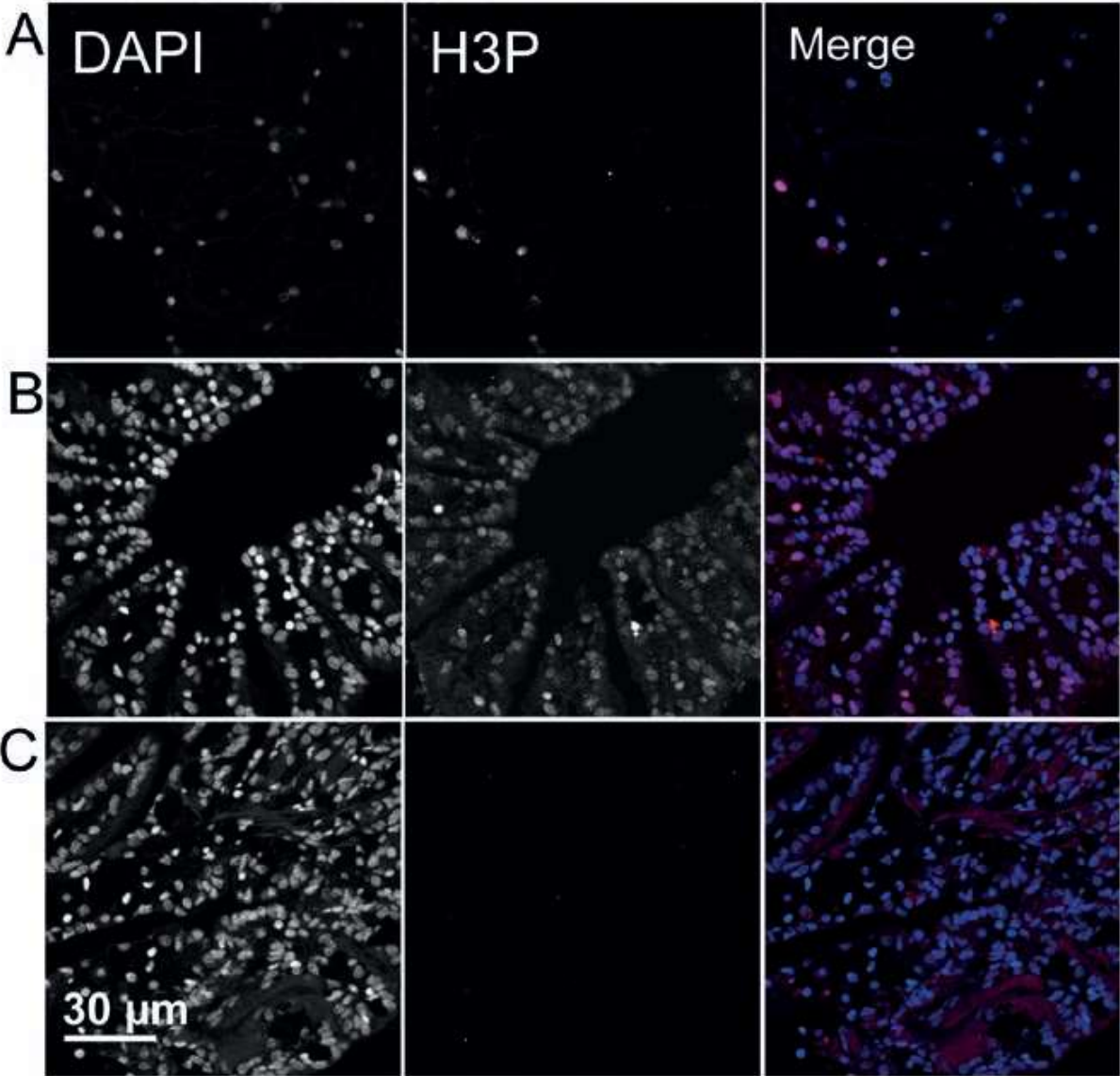
Intense répllication de l'ADN dans l'épithélium branchial

L'examen de sections d'huîtres préalablement injectées d'une solution de BrdU ou de tissus incubés dans un milieu de culture cellulaire contenant du BrdU, montre une fluorescence ponctuée, intense dans le tissu branchial (**Figure 2A**). Cette ponctuation est l'image typique d'une incorporation de BrdU dans l'ADN génomique, ce qui indique une forte répllication de l'ADN dans la branchie. Nos résultats montrent également que cette incorporation est détectable dans la branchie après seulement une heure d'incubation avec le BrdU. Et dans ces conditions, le marquage du cytoplasme avec la phalloïdine fluorescente révèle que seules les petites cellules à haut rapport nucléo-cytoplasmique ont répliqué leur ADN (**Figure 2B**). Ces résultats, confirmés par analyse en cytométrie de flux (voir 10), indiquent (i) une forte dynamique de la synthèse d'ADN dans la branchie, un caractère typique de l'organe hématopoïétique, (2i) une répllication qui se produit exclusivement dans des cellules de petite taille qui rappellent les précurseurs hématopoïétiques.

Prolifération cellulaire dans l'épithélium branchial

L'immunodétection de l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10, un marqueur de la mitose, en présence de DAPI montre de nombreuses mitoses dans la branchie (**Figure 3 B**). Des comptages réalisés sur des images confocales des 2 tissus les plus abondants de l'huître (n=3), la branchie et le manteau (**Figure 3A,B**), montrent que plus de 20 % des cellules de la branchie sont en mitose contre seulement 4 % dans le manteau (**Figure 3D**). La contribution de la branchie au nombre total de mitoses

Figure 3 : Mitoses dans la branchie et le manteau. Images confocales révélant le marqueur de mitose H3P (rouge) et l'ADN (DAPI, bleu). (A) Section du manteau qui révèle peu de cellules marquées H3P dans ce tissu lacunaire parsemé de grandes cellules. (B) Section de branchie montrant une forte proportion de cellules H3P. (C) Contrôle négatif. (D, E) Quantification des cellules marquées H3P dans des sections de manteau et de branchie. Plus de 1000 noyaux ont été comptés dans des zones représentatives pour chaque animal (n=3). (D) Le pourcentage de cellules mitotiques est de 21,7 % et 4,7 % pour la branchie et le manteau, respectivement. (E) Densité de cellules mitotiques par 100 μm^2 . La densité de cellules mitotiques est 38 fois supérieure dans la branchie (0.192 \pm 0.034 noyau 100 μm^2) par rapport au manteau (0.005 \pm 0.0009 noyau 100 μm^2).



est par ailleurs accentuée par sa forte densité cellulaire qui résulte en un nombre de mitoses par unité de surface environ 40 fois supérieur par rapport au manteau (**Figure 3E**). L'intense prolifération cellulaire observée dans la branchie, en accord avec un haut niveau de réplication de l'ADN génomique, suggère que la branchie puisse être l'organe hématopoïétique du bivalve.

Des cellules souches et/ou précurseurs dans la branchie

Sox2 est un facteur de transcription qui est spécifique des cellules souches et des précurseurs.

Le marquage de sections d'huître avec un anticorps anti-Sox2 en présence de DAPI révèle en microscopie confocale une abondance de cellules souches et/ou précurseurs dans l'épithélium branchial d'huître (**Figure 4A**). A plus fort grossissement, on peut observer de petites cellules avec une morphologie en virgule (**Figure 4B**) telle qu'habituellement décrite pour les cellules souches, ainsi que des amas d'où se dégagent ces petites cellules à l'intérieur de la lumière de tubules branchiaux (**Figure 4C**). Ces résultats indiquent clairement l'existence de cellules souches ou précurseurs chez un mollusque. De plus, l'abondance de ces cellules dans la branchie d'huître adulte et leur dispersion dans l'hémolymphe, suggèrent à nouveau l'hématopoïèse.

La branchie est l'organe hématopoïétique du bivalve

La Superoxyde dismutase, SOD, est une enzyme spécifique des hémocytes (9). L'utilisation conjointe des anticorps anti-SOD et anti-Sox2 montre au microscope confocal une répartition spatiale bien distincte avec d'une part, les cellules souches ou précurseurs (rouges) dans l'épithélium branchial et d'autre part, les hémocytes (verts) essentiellement localisés dans l'hémolymphe des vaisseaux. Il est important de noter la présence d'un petit nombre de cellules doublement marquées (jaunes), possédant à la fois des caractères de cellule souche et d'hémocyte, dans l'hémolymphe du vaisseau (**Figure 5A**). Ces cellules, également visibles dans la zone entre les épithéliums et les vaisseaux sur d'autres images (10), indiquent que la différenciation des cellules précurseurs en hémocytes se fait au sein de la branchie.

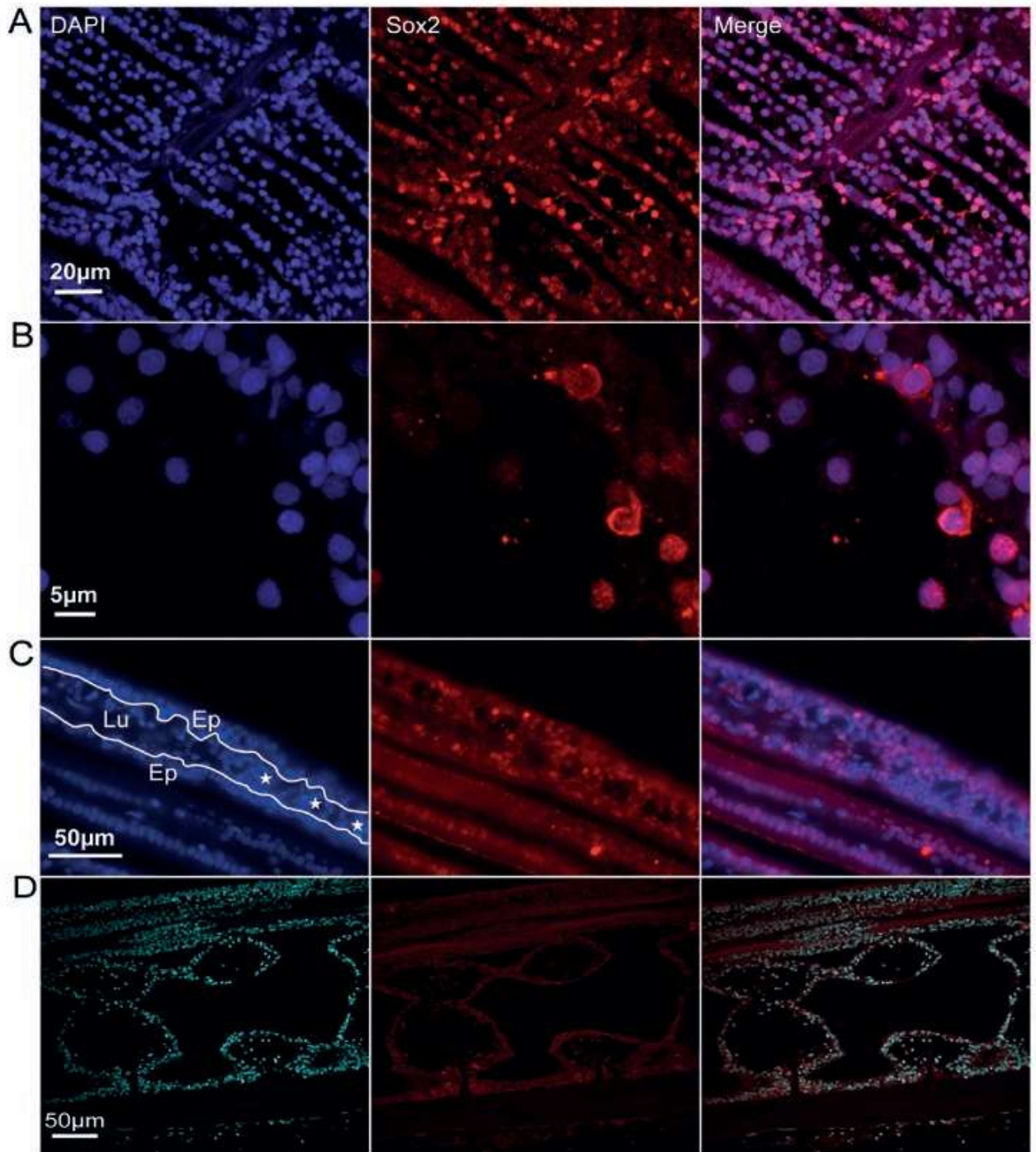


Figure 4 : Abondance de cellules précurseurs dans la branchie. Images de microscopie fluorescente (C) ou confocale (A, B, D) de sections révélées par le marqueur de cellule souche ou précurseur, Sox2 (rouge) et le DAPI (bleu). (A) Nombreuses cellules marquées par Sox2 dans les structures irrégulières de la branchie. Noter que de longues extensions cytoplasmiques marquées Sox2 sont parfois visibles. (B) Sox2 est observé dans le noyau des cellules épithéliales de la branchie mais aussi dans des cellules en virgule. (C) Groupe de cellules marquées par Sox2 (*), associées de manière lâche dans l'hémolymphe de la lumière d'un tubule (Lu). (D) Contrôle négatif sans sérum anti-Sox2. Ep, épithélium.

Par ailleurs, un anticorps anti-Filamine d'huître, une protéine spécifique des lamellocytes (une sous-classe d'hémocytes), a été utilisé sur des sections de branchies préalablement incubées avec du BrdU. On remarquera que la dénaturation acide nécessaire au démasquage du BrdU n'a pas altéré la fluorescence de l'anticorps secondaire révélant la Filamine, mais qu'elle a toutefois quelque peu changé la morphologie des cellules qui apparaissent plus arrondies (**Figure 5C**). Cette expérience montre clairement que de nombreux noyaux sont marqués au BrdU et que parmi ceux-ci, un fort pourcentage est entouré d'un cytoplasme marqué par la Filamine (**Figure 5B-C**). Le fragment de branchie utilisé dans cette expérience a donc été le lieu non seulement de la prolifération de cellules mais également de la différenciation de ces cellules en hémocytes, sans qu'il y ait eu d'interaction avec d'autres tissus.

Cette expérience montre donc que non seulement les cellules souches ou précurseurs sont capables de proliférer dans un fragment de branchie isolé mais qu'ils peuvent également s'y différencier en hémocyte.

DISCUSSION

Le but de ce travail était la mise en évidence de l'existence de cellules souches somatiques chez un mollusque. Le fait que chez l'animal adulte la principale source de cellules souches somatiques soit l'hématopoïèse, a orienté nos recherches dans cette direction. D'autant que les bivalves se sont révélés ces dernières années des modèles d'intérêt en gérontologie à cause de leur durée de vie exceptionnelle (11). Par ailleurs, l'étude des fonctions très variées des hémocytes a fait l'objet de nombreux travaux (revus dans 12) et notamment, l'étude de leur rôle dans la défense immunitaire du mollusque (4). Pourtant, la question fondamentale du renouvellement des tissus et en particulier des hémocytes, une question fondamentale et ancienne (13), est restée à ce jour sans réponse.

Etant donné les connaissances fragmentaires en biologie cellulaire et moléculaire chez le mollusque, il est apparu que l'analyse immunohistologique était l'approche la mieux à même de répondre à nos interrogations. D'un point de vue technique, la forte autofluorescence des tissus de mollusque (notamment à 488 nm) a nécessité l'utilisation d'anticorps primaires très réactifs contre des marqueurs abondants

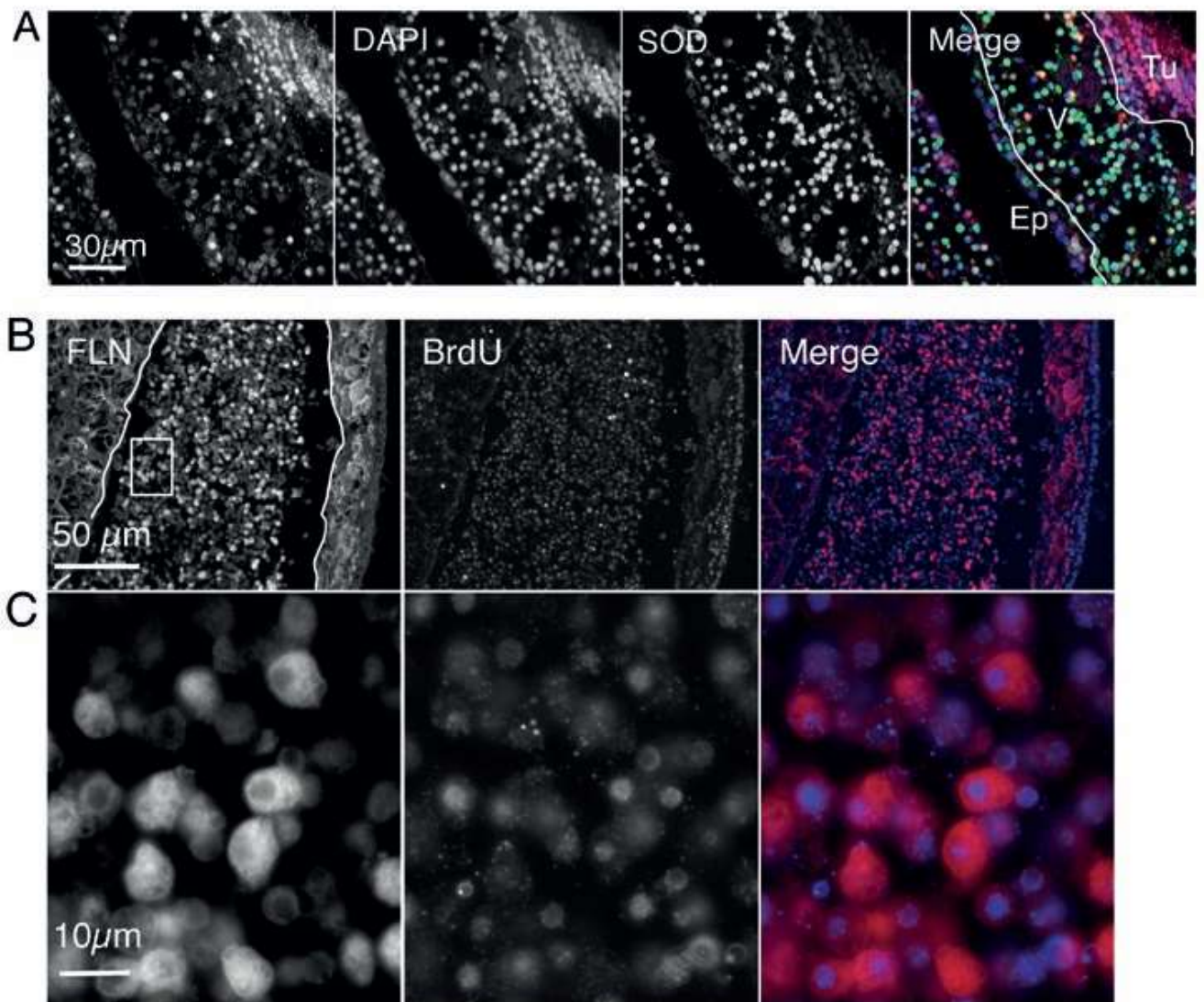


Figure 5 : Petites cellules de la branchie arborant des marqueurs de cellule souche ou de précurseur et d'hémocyte. (A) Progéniteurs d'hémocytes marqués conjointement par Sox2 (rouge), SOD (vert) et DAPI (bleu). La structure irrégulière est composée de plusieurs couches de cellules précurseurs marquées par Sox2 dans la zone des tubules (Tu) alors que les hémocytes, marquées par SOD sont essentiellement dans la zone du vaisseau (V). De façon similaire, les cellules comarquées par Sox2 et SOD sont localisées dans le vaisseau, ce qui suggère que les cellules précurseurs migrent vers le vaisseau dans lequel elles se différencient en hémocytes. Ep, épithélium. (B) Les cellules précurseurs répliquent leur ADN et se différencient en hémocyte dans la branchie. Un fragment isolé de branchie a été incubé dans 25 µM de BrdU pendant 16 h puis fixé et soumis à l'analyse immunohistochimique. Les noyaux marqués par le BrdU (bleu) et la Filamine (rouge) ont été révélés comme ci-dessus. L'analyse montre qu'une abondance de lamellocytes, une classe d'hémocytes arborant la Filamine, présents dans un vaisseau de la branchie ont incorporé du BrdU dans leur noyau, ce qui indique à la fois la répllication de leur ADN et leur différenciation au cours de cette expérience. (C) A plus fort grossissement, on note l'aspect typique de l'incorporation de BrdU dans l'ADN nucléaire d'hémocytes portant le marqueur Filamine.

(H3P, SOD, Sox2 et Filamine), afin d'obtenir un rapport signal/bruit de fond compatible avec l'analyse en microscopie.

La comparaison des images obtenues en histologie et en immunohistologie a été riche d'enseignements. Elle a mis en évidence des structures irrégulières, très différentes du plissement en unités répétitives décrit jusqu'à présent. Ces nouvelles structures ont à leur tour été instrumentales dans l'observation du relargage de petites cellules en forme de virgule, une morphologie de cellule souche ou précurseur, dans l'hémolymphe de l'huître. Les différents marqueurs utilisés en immunofluorescence ont permis d'établir (i) que la branchie est le lieu principal de prolifération de cellules dont la morphologie est semblable à celle des cellules souches ou précurseurs (2i) que ces cellules souches et/ou précurseurs sont très abondantes dans la branchie et (3i) qu'elles s'y différencient en hémocyte, (4i) montrant ainsi que l'hématopoïèse se déroule au sein même de la branchie et (5i) que la sous-classe des lamellocytes, des hémocytes spécialisés dans la lutte contre les parasites, existe chez les mollusques. L'ensemble de ces caractères permet notamment d'attribuer la fonction de glande lymphoïde à la branchie de mollusque.

En conclusion, l'analyse immunohistologique a permis de montrer pour la première fois l'existence de cellules souches chez le mollusque et le déroulement de l'hématopoïèse dans sa branchie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FINCH C. E. and AUSTAD S. N. History and prospects: symposium on organisms with slow aging. *Exp. Gerontol.*, 2001, **36**, 593-597.
2. BUTLER P. G., WANAMAKER A. D., SCOURSE J. D., RICHARDSON C. A., REYNOLDS D. J. Variability of marine climate on the North Icelandic Shelf in a 1357-year proxy archive based on growth increments in the bivalve *Arctica islandica*. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.*, 2013, **373**, 141-151.
3. BODNAR A. Marine invertebrates as models for aging research. *Exp. Gerontol.*, 2008, **44**, 477-484.
4. SCHMITT P., ROSA R. D., DUPERTHUY M., DE LORGERIL J., BACHÈR E. and DESTOUMIEUX-GARZÓN D. The Antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora, *Front. Microbiol.*, 2012, **3**, 160.

5. HARTENSTEIN V. Blood Cells and Blood Cell Development in the Animal Kingdom. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2006, **22**, 677–712.
6. VOGT G. Hidden treasures in stem cells of indeterminately growing bilaterian invertebrates. *Stem Cell Rev.*, 2012, **8**(2), 305-317.
7. GALTSOFF P. S. - The American oyster, ed Udall SL, (US Dept Interior, Washington), 1964.
8. LIU K., JIANG M., LU Y., CHEN H., SUN J., WU S., KU W. Y., NAKAGAWA H., KITA Y. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.*, 2013, **25**(5), 1264-1271.
9. GONZALEZ M., ROMESTAND B., FIEVET J., HUVET A., LEBART M. C., GUEGUEN Y., BACHER E. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2005, **338**(2), 1089–1097.
10. JEMAÀ M., MORIN N., CAVELIER P., CAU J., STRUB J.M., DELSERT C. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *J. Exp. Biol.*, 2014, **217**, 3067-3077.
11. PHILIPP E. and ABELE D. Masters of Longevity: Lessons from Long-Lived Bivalves – A Mini-Review. *Exp. Gerontol.*, 2010, **56**, 55-65.
12. CHENG, T. - The American oyster *Crassostrea virginica*, eds Kennedy VS, Newell R. I. E., Eble, A. F. (University of Maryland System, Trenton), pp 299-326, 1996.
13. CUÉNOT, L. Le sang et les glandes lymphatiques. In: Lacaze-Duthiers H, editor. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. Paris: Académie des Sciences, 1891.