

## La phagocytose par les amœbocytes chez *Apostichopus japonicus*

Xing Kun,<sup>1,2</sup> Hongsheng Yang<sup>1</sup>

### Résumé

La présente étude porte sur l'analyse quantitative de la phagocytose opérée par les amœbocytes chez *Apostichopus japonicus*. Le zymosan A a été utilisé comme marqueur. Il a été mélangé *in vitro* aux cœlomocytes et le taux de phagocytose a été analysé en dénombrant les cellules à l'aide d'un microscope optique. Les taux de phagocytose (exprimés en pourcentage) du zymosan A ingérés par les amœbocytes ont été établis lorsque le marqueur a été mis en présence des amœbocytes à des températures différentes (4, 10, 15, 20 et 30 °C) et pendant des périodes d'incubation différentes (15, 45 et 60 min). Il s'est avéré que l'activité phagocytaire variait en fonction de la température et de la durée d'exposition. Les amœbocytes sont efficaces lorsqu'il s'agit d'absorber le zymosan A.

### Introduction

La plupart des réponses immunitaires sont assurées par les phagocytes (revu par Gross *et al.* 1999) qui peuvent également fonctionner dans l'encapsulation cellulaire de corps étrangers et de microbes par coagulation où ils s'imbriquent les uns dans les autres. (Hillier et Vacquier, 2003). Les caractéristiques des cœlomocytes d'*A. japonicus* ont été démontrées directement à l'aide d'un microscope optique et d'un microscope électronique (Eliseikina et Magarlamov 2002 ; Xing *et al.* 2008). Six types de cœlomocytes ont été identifiés : des lymphocytes, des cellules au stade morula, des amœbocytes, des cellules cristallines, des cellules fusiformes et des cellules vibratiles (Xing *et al.* 2008). Les phagocytes, chez les échinodermes, ont fait l'objet de plusieurs analyses quantitatives. Beck et Habicht (1993) ont démontré que la phagocytose *in vitro* chez l'étoile de mer *Asterias forbesi* était positivement corrélée avec la durée d'incubation. Xing et Chia (1998) ont eu recours à la cytométrie en flux afin d'étudier les caractéristiques quantitatives des amœbocytes chez *Holothuria leucospilota* ; la phagocytose était massive et positivement corrélée avec le rapport billes/cellule. L'objectif de la présente étude consistait à quantifier le taux de phagocytose opérée par les amœbocytes chez *A. japonicus* en utilisant du zymosan A.

### Matériaux et méthodes

#### Prélèvement de liquide cœlomique

Des holothuries *Apostichopus japonicus* en bonne santé (longueur du corps : 10 à 15 cm; poids : 100 à 150 g) ont été obtenues auprès de fermes aquacoles de Qingdao, dans la Province de Shandong (Chine). Elles ont été transférées au laboratoire dans une cuve en PVC de 500 l d'eau de mer à 10 °C, aérée, filtrée au sable et renouvelée quotidiennement. Elles ont eu la possibilité de s'acclimater à leur nouvel environnement pendant quatre semaines avant les expériences. Environ 5 à 10 ml

de liquide cœlomique ont été prélevés du flanc droit de l'animal (Santiago-Cardona *et al.* 2003) à l'aide d'une seringue de 25 et dilués dans une même quantité d'eau de mer artificielle (ASW, pH 7,4). Une solution de fixation à base d'EDTA [6 x 10<sup>-3</sup> M d'EDTA, 0,01 M de PBS (tampon phosphate salin), ASW, pH 6,0] (Noble 1970) a été utilisée comme agent de désagrégation. Le liquide cœlomique a été stocké dans des tubes de centrifugeuse stériles de 5 ml à une température de 4 °C.

#### Phagocytose du zymosan A

Le liquide cœlomique a été stocké dans des tubes de centrifugeuse stériles de 1,5 ml et centrifugé à une vitesse de 2 000 t/min pendant 10 min à température ambiante. Le zymosan A (BSA, Sigma – Aldrich, Steinheim, Allemagne) a ensuite été ajouté au sérum extrait, deux heures avant les essais de phagocytose, à une concentration de 0,1 g ml<sup>-1</sup> et à température ambiante. Afin d'étudier la phagocytose du zymosan A, 0,2 ml de liquide cœlomique filtré, dilué avec de l'ASW stérile (proportion 1:1), a été extrait et mélangé au zymosan A activé dilué. Les essais ont été effectués à des températures de 4, 10, 15, 20 et 30 °C pendant 15, 30 et 60 min dans des tubes de centrifugeuse stériles. Ensuite, le pourcentage de cellules phagocytantes a été estimé, après observation d'une centaine d'entre elles, sélectionnées au hasard, grâce au système Opton à un taux de grossissement de 400x.

### Résultats

#### Morphologie des amœbocytes

Les amœbocytes possèdent plusieurs pseudopodes rayonnant à partir du cytoplasme. Tous les amœbocytes possèdent des pseudopodes pétales ou filiformes (fig. 1 et 2) rayonnant dans différentes directions à partir de la masse de cellules endoplasmique centrale. Les amœbocytes sont parvenus à coaguler avec des pseudopodes filiformes (fig. 2).

1 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071 (Chine), Courriel: xingkun84@gmail.com – Auteur correspondant : hshyang@126.com

2 Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039 (Chine)



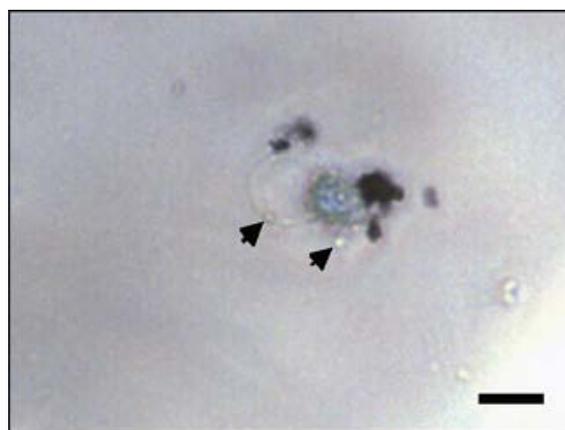
**Figure 1.** Micrographie optique d'amœbocytes pétaloïdes ; pseudopode (barre = 10µm)

### Phagocytose du zymosan A

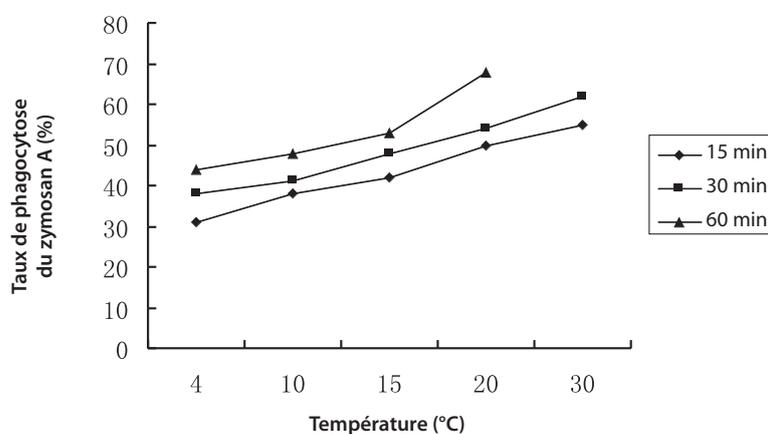
La microscopie optique a permis d'observer que les amœbocytes opposaient une réponse phagocytaire au zymosan A (figure 3) lors d'une incubation en suspension. Il est apparu que les amœbocytes étaient activement phagocytaires et que leur capacité phagocytaire était élevée : les cellules phagocytantes représentent entre 30 et 70 pour cent des cellules dénombrées. Le rapport entre la capacité phagocytaire et la température s'est révélé cohérent (figure 4). La capacité phagocytaire était élevée lorsque l'on ajoutait du zymosan A et immédiatement après l'extraction du liquide coelomique de l'holothurie ; en l'espace d'une heure, les coelomocytes avaient coagulé à 30 °C.



**Figure 2.** Micrographie optique d'amœbocytes filiformes ; pseudopode (barre = 10µm)



**Figure 3.** Micrographie optique montrant les réponses phagocytaires au zymosan A ; flèches : zymosan (barre = 5µm)



**Figure 4.** Analyse quantitative du taux de phagocytose du zymosan A par les amœbocytes dans *Apostichopus japonicus*

## Discussion

Sur les six types de coelomocytes d'*A. japonicus*, les amœbocytes étaient les deuxièmes cellules les plus abondantes après les lymphocytes (Xing *et al.* 2008). Les amœbocytes peuvent absorber des colorants et d'autres particules des viscères et les amœbocytes filiformes participent à la coagulation et à la cicatrisation des blessures. Globalement, les amœbocytes assurent l'immunité cellulaire de l'échinoderme puisqu'elles sont dotées de capacités de phagocytose et de nutrition, et jouent un rôle actif dans la réaction coagulante. On sait que les amœbocytes contiennent des matières hétérogènes de différentes dimensions. Les cellules présentent souvent d'importantes quantités de pseudopodes, et les amœbocytes chargés de pseudopodes ont souvent tendance à s'agglutiner. Chez l'espèce d'holothurie étudiée, ainsi que d'autres échinodermes, les pseudopodes des amœbocytes étaient pétales et filiformes (Edds, 1993). Les amœbocytes présentent des transformations morphologiques intervenant avant et pendant l'agrégation cellulaire. Les observations attentives de préparations fraîches indiquent que tous les amœbocytes possèdent des pseudopodes ectoplasmiques qui rayonnent dans différentes directions à partir du cytoplasme périnucléaire de la cellule. Des phagocytes pétales se sont directement transformés en amœbocytes avec des pseudopodes filiformes, mais la transformation de pseudopodes filiformes en pseudopodes pétales n'a jamais été observée (Hetzl 1963). Les amœbocytes se sont révélés être sensibles aux pressions induites. Elles ont connu une transition pétales-filiforme par pression sous l'effet de rayonnements UV-B (Matranga *et al.* 2006). Les transformations de pseudopodes pétales en pseudopodes filiformes se sont accélérées et l'agrégation des cellules était apparente après que celles-ci aient été mélangées au zymosan *A in vitro*.

L'étude quantitative de la phagocytose révèle l'existence d'un rapport cohérent entre la température et les capacités phagocytaires. Les amœbocytes pétales et filiformes ont tous deux réagi. À l'issue de la phagocytose, les amœbocytes sont passés de l'état pétales à l'état filiforme, d'autres types de coelomocytes ont fait preuve de capacités phagocytaires limitées. Les amœbocytes se sont révélés capables de s'agglutiner *in vitro*. Dans les préparations fraîches, les pseudopodes pétales semblent s'effondrer et une redistribution du cytoplasme produit des pseudopodes filiformes branchus particulièrement longs, souvent entrelacés avec les pseudopodes filiformes d'autres amœbocytes. Alors que la température augmentait et que le temps passait, les amœbocytes se coagulaient avec des cellules morula et des lymphocytes, ce qui entraînait une réduction de l'efficacité de la phagocytose.

## Remerciements

Cette recherche a été possible grâce au soutien de la *National Natural Science Foundation of China* (subvention n° 40576073) et du *National Key Technology Research and*

*Development Program* (subvention n° 2006BAD09A02/09). Le professeur Conand a formulé des suggestions et nous a aidés à rédiger ce document, et nous lui sommes très reconnaissants de son assistance et de ses informations.

## Bibliographie

- Beck G. and Habicht G.S. 1993. Invertebrate Cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. *Cellular Immunology* 146:284–299.
- Edds K.T. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:173–178.
- Eliseikina M.G. and Magarlamov T.Y. (2002) Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirotida: Cucumariidae). *Russian Journal of Marine Biology* 28:197–202.
- Gross P.S., Al-Sharif W.Z., Clow L.A. and Smith L.C. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Development and Comparative Immunology* 23:429–442.
- Hetzl H.R. 1963. Studies on holothurian coelomocytes. A survey of coelomocyte types. *Biological Bulletin* 125:289–301.
- Hillier B.J. and Vacquier V.D. 2003. Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. *Journal of Cell Biology* 160:597–600.
- Matranga V., Pinsino A., Celi M., Bella G. and Natoli A. 2006. Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes. *Marine Biology* 149:25–34.
- Noble P.B. 1970. Coelomocyte aggregation in *Cucumaria frondosa*: effect of ethylenediaminetetra-acetate, adenosine, and adenosine nucleotides. *Biological Bulletin* 139:549–556.
- Santiago-Cardona P.G., Berríos C.A., Ramírez F. and García-Arrarás J.E. 2003. Lipopolysaccharides induce intestinal serum amyloid A expression in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Developmental and Comparative Immunology* 27:105–110.
- Xing J. and Chia F.S. 1998. Phagocytosis of sea cucumber amœbocytes: a flow cytometric study. *Invertebrate Biology* 117:67–74.
- Xing K., Yang H.S. and Chen M.Y. 2008. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquatic Biology* 2:85–92.