

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
INTRODUCTION.....	1
1. Les étoiles de mer	1
a. L'étoile de mer : un échinoderme	1
i. Évolution et écologie.....	1
ii. Caractéristiques.....	3
b. L'immunité chez les échinodermes.....	6
i. Évolution de l'immunité.....	6
ii. Description et rôle des cellules du liquide cœlomique.....	8
iii. Immunité innée	10
iv. Molécules immunostimulantes	11
v. Immunité adaptative	12
vi. Reconnaissance du soi.....	12
2. Le TBT en milieu marin.....	13
a. Le TBT dans l'environnement.....	13
b. La toxicité du TBT	15
3. Les objectifs de cette étude	18
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	20
1. Entretien des astéries.....	20
2. Prélèvement du liquide cœlomique.....	20
3. Étape A –Tests en microplaque	22
a. Préparation des microplaques.....	22
b. Exposition cellulaire.....	25
c. Test de viabilité cellulaire (VB).....	26
i. Dosage des protéines.....	26
ii. Métabolisation du FDA	27
d. Test de phagocytose	27
i. Marquage des bactéries	28
ii. Phagocytose <i>in vitro</i>	28
4. Étape B- Test en cytométrie en flux	29
a. Exposition cellulaire.....	30
b. Test de viabilité cellulaire	30
c. Test de phagocytose	31
5. Étape C- Incorporation du TBT.....	35
6. Tests statistiques	35
RÉSULTATS	37
1. Observation de la condition des étoiles.....	37
2. Mise au point des méthodes	38
a. Adhérence cellulaire.....	39
i. Perte cellulaire	39
ii. Avec exposition au TBT.....	40

iii.	Concentration en EDTA	40
b.	Température d'incubation	41
c.	La récupération cellulaire	42
d.	Pré-test sur l'incorporation du TBT	46
3.	Résultats obtenus	48
a.	VB en microplaque	48
i.	Effets et statistiques.....	48
ii.	CE50.....	51
b.	Phagocytose en microplaque	52
c.	Phagocytose en cytométrie	54
i.	Viabilité des cellules	54
ii.	La fraction 1 des amœbocytes.....	55
iii.	La fraction 2 des amœbocytes.....	58
d.	Incorporation du TBT.....	60
i.	Temps d'exposition au TBT	61
ii.	Variation de la concentration d'exposition au Morin.....	62
iii.	Variation de la concentration en TBT	64
DISCUSSION		65
1.	La réponse au toxique	65
a.	La viabilité cellulaire.....	65
i.	Résistance des amœbocytes de l'étoile de mer polaire au TBT	65
ii.	L'évaluation de la viabilité de la cellule : une approche double pour une meilleure évaluation	66
b.	Le TBT ne semble pas immunotoxique pour <i>L. polaris</i>	67
c.	Toxicité du TBT : hypothèse d'une résistance membranaire	68
d.	La variabilité individuelle peut être induite par de multiples facteurs.....	71
e.	Le TBT ne semble pas perturber l'adhérence cellulaire	74
2.	Des sous- populations ou une différence mécanique ?	75
3.	La concentration cœlomique en amœbocytes pourrait suivre une tendance saisonnière	77
4.	Un retour sur les méthodes analytiques	79
a.	Le maintien des cellules s'effectue à basse température.....	79
b.	La phagocytose et les amœbocytes	80
CONCLUSION		82
BIBLIOGRAPHIE		84
ANNEXE A : préparation des solutions.....		95
ANNEXE B : mise au point des méthodes.....		97
1.	Mise au point du test de VB en microplaque	97
2.	Mise au point du test de PHAG en microplaque	98
a.	Arrêt de l'activité phagocytaire	98
b.	Extinction de la fluorescence extracellulaire.....	100
c.	Cinétique de la phagocytose	101
3.	Mise au point du test de la phagocytose en cytométrie.....	102
a.	Cinétique de la phagocytose	102
b.	Conditions d'incubation	103

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 Étoile de mer à la sortie de l'œuf. La photo est prise à travers l'objectif d'un binoculaire. (Photo : Émilie Doussantousse)	3
Figure 2 Les papulae et l'estomac d'une étoile de mer (<i>Marthasterias glacialis</i>)	3
Figure 3 Anatomie d'une étoile de mer (www.anselm.edu/.../33-38-SeaStarAnatomy-L.jpg) 5	5
Figure 4 Les étapes de la phagocytose (pedagogie.ac-montpellier.fr/.../biologie.html)	8
Figure 5 Les amœbocytes de l'étoile de mer (Chia et Xing 1996).	10

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 6 Schéma des expériences en microplaque.....	24
Figure 7 Schéma d'une microplaque pour les essais de phagocytose, de viabilité cellulaire. C1 correspond à la concentration d'exposition témoin (EMASCM), C2, C3 et C4 correspondent aux concentrations croissantes de TBT testées sur les cellules.	25

RÉSULTATS

Figure 8 Schéma du protocole de la phagocytose au Facscan® en tenant compte des 2 fractions récupérées.	34
Figure 9 Concentration des amœbocytes dans le liquide cœlomique prélevé entre septembre 2003 et août 2004. Le nombre de prélèvements oscille entre 6 et 35 par mois. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,001$).	38
Figure 10 Effet de la température selon le temps d'incubation sur la viabilité cellulaire des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . L'expérience est réalisée avec 3 organismes, 2 répliquas par organisme (1×10^6 cellules/ml dans 0,25 ml EMASCM).....	41
Figure 11 Phagocytose des cellules décollées mécaniquement (fraction 1) et décollées par la trypsine (fraction 2) d'un groupe de 6 étoiles de mer. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocytés au moins 1 bille. L'étoile indique une différence significative entre les deux groupes ($P=0,0005$).	43
Figure 12 Diagramme à point de la complexité relative des cellules (SSC-H) et de la taille relative (FSC-H) obtenu en cytométrie en flux lors d'une analyse de phagocytose pour des amœbocytes d'étoiles de mer. Les cellules font parties de la première fraction cellulaire de la suspension. Les ellipses représentent les différentes catégories de cellules.....	44
Figure 13 Histogramme de la phagocytose des amœbocytes de la fraction 1. Les cellules sont décollées mécaniquement. Les pics correspondent au nombre de billes d'ingérées, de gauche à droite.....	45
Figure 14 Histogramme la phagocytose des amœbocytes de la fraction 2. Les cellules sont décollées à la trypsine après le retrait de la première fraction.	45
Figure 15 Absence de l'effet du Morin sur la viabilité cellulaire des amœbocytes. L'expérience a été réalisée sur 4 étoiles de mer. Aucune différence significative entre les 2 groupes n'a été relevée ($P=0,08$).	47
Figure 16 Effet du TBT sur la viabilité cellulaire des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . La VB est calculée selon la métabolisation du FDA par rapport à la quantité intracellulaire de protéines. Les résultats sont calculés en fonction de 50 µg de protéines. Les lettres différentes indiquent des différences significatives.....	49
Figure 17 Test de viabilité cellulaire des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . La VB est calculée selon la métabolisation du FDA par rapport à la quantité intracellulaire de protéines. Les	

résultats sont calculés en fonction de 50 µg de protéines. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (n=3).....	50
Figure 18 Effet du TBT sur la viabilité cellulaire des amœbocytes de <i>L. polaris</i> exposées in vitro. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la réponse du témoin (P<0,0001, R ² =0,589). L'équation de la droite est VB = - 7,80 * [TBT] + 82,5.	51
Figure 19 Effet du TBT sur la phagocytose des amœbocytes de <i>L. polaris</i> exposées in vitro au TBTC _{l2} (3h) à 12°C à l'obscurité (n=6).....	53
Figure 20 Effet du TBT sur la VB des amœbocytes exposées in vitro. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes à la fin de l'expérience. Les lettres différentes indiquent une tendance (P=0.015) (n=6).	55
Figure 21 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 1 des amœbocytes exposées in vitro. La variation sur un même individu est inférieure à 10%. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes de <i>L. polaris</i> ayant phagocyté au moins 1 bille. Aucune différence significative ne ressort (n=6).....	56
Figure 22 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 1 des amœbocytes exposées in vitro. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes. Les lettres différentes indiquent des tendances significatives (n=6)	58
Figure 23 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 2 des amœbocytes exposées in vitro. La variation est inférieure à 20%. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes ayant phagocyté au moins 1 bille. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (n = 4).....	59
Figure 24 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 2 des amœbocytes exposées in vitro. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes ayant phagocyté au moins 3 billes. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (n = 4).....	60
Figure 25 Effet du temps sur l'incorporation du TBT (0,5 µM) dans les amœbocytes de l'étoile de mer <i>L. polaris</i> (n=3). Les cellules sont préalablement traitées à une solution de Morin saturée (1/100). Les cellules sont par la suite exposées soit au TBT soit à l'EMASCM. Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.....	61
Figure 26 Effet de la concentration d'exposition au Morin (solution saturée) sur l'incorporation du TBT (0,5 µM, 3 heures) dans l'amœbocyte de l'étoile de mer <i>L. polaris</i> (n=2). Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.....	62
Figure 27 Histogramme de l'incorporation du TBT (0,5 µM pendant 3 h) dans la cellule amœbocyte de l'étoile de mer <i>L. polaris</i> . Les cellules sont préalablement exposées au Morin selon des concentrations différentes (gris = 0, turquoise = 1, rouge = 5, mauve = 10 et vert = 20).....	63
Figure 28 Effet de la concentration en TBT sur son incorporation dans la cellule amœbocyte de <i>L. polaris</i> (n=2). L'exposition au TBT est de 3h. Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.....	64

ANNEXE B

Figure 29 Détermination de la concentration optimale de NaOH pour le dosage des protéines intracellulaire des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . Les résultats sont exprimés en quantité de protéines (µg/ml).	98
--	----

Figure 30 Effet du formol sur la phagocytose in vitro en microplaque des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU). Les amœbocytes sont incubés en présence de différents ratio de bactéries fluorescentes / cellule.	99
Figure 31 Effet du bleu trypan sur l'extinction de la fluorescence des bactéries libres et/ou adsorbées sur les amœbocytes lors d'essai de phagocytose. Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU).	100
Figure 32 Effet du temps sur la phagocytose in vitro des amœbocytes de l'étoile de mer <i>L. polaris</i> . Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU).	101
Figure 33 Effet du temps sur la phagocytose des amœbocytes de l'étoile de mer <i>L. polaris</i> . Les résultats sont exprimés en canal moyen du cytomètre en flux (densité optique)....	103
Figure 34 Effet de la température d'incubation des cellules sur la phagocytose in vitro. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocytés au moins 1 bille $n = 12$. Aucune différence significative ($P = 0.07$).	104
Figure 35 Effet du mouvement lors de l'incubation sur la phagocytose des amœbocytes de <i>L. polaris</i> . Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant au moins ingéré une bille. L'étoile indique une différence significative différente entre les deux groupes ($n = 3$, $P = 0,00459$).	105

LISTE DES TABLEAUX

RÉSULTATS

Tableau I Perte cellulaire après 1 h d'incubation en microplaque (200 000 cellules) ou en tube (500 000 cellules). Aucune différence statistique n'est observée.	39
Tableau II Effet apparent du TBT sur l'adhérence cellulaire des amœbocytes exposées <i>in vitro</i> en tube. Les résultats sont exprimés en % de perte cellulaire. Aucune différence statistique n'est observée.	40

INTRODUCTION

1. Les étoiles de mer

a. L'étoile de mer : un échinoderme

i. Évolution et écologie

Les étoiles de mer, embranchement des échinodermes, forment un groupe très ancien dont les premières traces fossiles remontent à la période cambrienne (700 millions d'années). Ils dérivent de formes à symétrie bilatérale, les hétérostèles. Les formes les plus anciennes sont sessiles. Ils ont laissé d'abondantes traces, en particulier avec les groupes des crinoïdes (plumes de mer) et des échinoïdes (oursins), présents dès l'ordovicien. Au total 23 classes et 13 000 espèces ont été identifiées (7 classes et 7000 espèces aujourd'hui). L'embranchement comprend 5 classes : les Astéries (Étoiles de mer) et les Ophiurides ou Stelleroidea (Ophiures), les Echinides (Oursins), les Holothurides (Comcombre de mer), les Crinoïdes (Plume de mer).

Ce sont des animaux marins benthiques, présents à toutes les profondeurs océaniques. Ils possèdent un certain nombre de caractéristiques uniques parmi le monde animal. Les principales sont la symétrie radiale et le système aquifère. La forme adulte est organisée autour d'une symétrie pentaradiée. C'est leur forme embryonnaire bilatérale qui les range aux côtés des chordés dans le groupe des deutérostomiens. Les deutérostomiens regroupent les organismes dont la bouche apparaît en second lors de la gastrulation de l'embryon. De l'ancêtre marin deutérostomien a découlé les phylums hémichordés, échinodermes (phylums uniquement marins) et l'ancêtre des chordés.

Grâce à leur structure extérieure calcaire, les échinodermes ne sont en général la proie d'aucun autre animal sauf de certains autres échinodermes (Astéridés). Ils se nourrissent de mollusques, crustacés, et d'autres invertébrés. Ils peuvent également jouer un rôle écologique clé de prédation dans certain écosystème (Booolootian 1966). On les retrouve dans tous les océans, de la zone intertidale aux profondeurs abyssales. Il s'agit souvent du phylum le plus abondant dans les grandes profondeurs. La température est un facteur expliquant la distribution des Astéries. En effet, leur distribution verticale peut être expliquée par leur état sténotherme. La salinité a un rôle décisif dans la restriction de la zone de répartition de l'étoile de mer puisqu'elles sont également sténohalines. Il semblerait que seules les espèces du genre Astéries soient tolérantes aux eaux saumâtres (Booolootian 1966).

L'étoile de mer *Leptasterias polaris*, Müller et Troschel, 1842, est retrouvée le long des côtes américaines de l'Atlantique Nord et de l'Arctique (Chabot et Rossignol 2003). Elle évolue principalement dans les eaux froides, sombres mais riches du Saint-Laurent. Cette espèce à 6 branches est un prédateur féroce. Elles se nourrissent de préférence de moules bleues *Mytilus edulis* (Himmelman et Dutil 1991). En laboratoire depuis plusieurs années, la ponte s'effectue une fois à l'automne et une température d'environ 1,5°C semble la déclencher. Les étoiles s'enroulent alors pour couvrir leurs œufs jusqu'à la transformation (Himmelman *et al.* 1982). L'apparence de la nouvelle étoile de mer est semblable à l'adulte (figure 1).

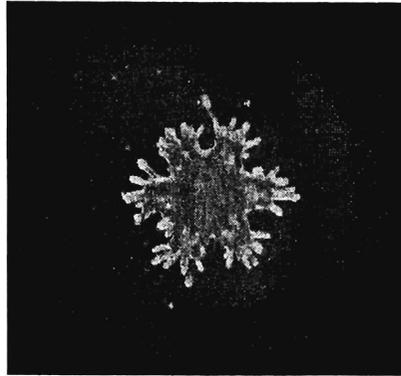


Figure 1 Étoile de mer à la sortie de l'œuf. La photo est prise à travers l'objectif d'un binoculaire. (Photo : Émilie Doussantousse)

ii. Caractéristiques

Le nom échinoderme vient des protubérances épineuses externes (*papulae*) (figure 2).



Figure 2 Les *papulae* et l'estomac d'une étoile de mer (*Marthasterias glacialis*)

Les caractéristiques ci-après regroupent l'ensemble des échinodermes :

- Un endosquelette dermique
- Un système vasculaire hydraulique ou aquifère composé de canaux dérivant de la cavité coelomique
- Un système coelomique
- Un système hémal
- Des pédicelles ou podia
- Des branchies dermiques
- Une symétrie radiale ou biradiale

L'endosquelette mésodermique calcifié est retrouvé chez l'ensemble du phylum que ce soit sous la forme de plaques ou de petits ossicules éparpillés. Sa fonction est protectrice. Trois systèmes distincts sont retrouvés chez les étoiles de mer : le système hydrovasculaire (ou aquifère), le système cœlomique et les systèmes hémal et périhémal (Bang 1982). Le système aquifère remplit la fonction de squelette hydraulique permettant le mouvement de l'organisme. Ce système est ouvert sur l'extérieur par le madréporite qui agit comme une soupape (Smith 1981). Parallèlement, le système cœlomique assure quelques unes des fonctions du sang et quelques autres comme les échanges gazeux, la locomotion et la nutrition. Le système digestif est complet et parfaitement fonctionnel. Les systèmes hémal et périhémal forment un réseau de communication à travers le tissu connectif et une analogie avec le sang des vertébrés est souvent effectuée (Booolootian 1966). Le système hémal, entouré par le système périhémal, semble également permettre le transport de molécules complexes et des gaz. Le système périhémal est absent chez les holothuries chez qui le système hémal est très bien développé (Smith 1981). Ces systèmes ne semblent pas pouvoir être dissociés de l'organe axial et seraient apparentés à la rate (Bang 1982). Mais le rôle de l'organe axial est encore méconnu.

Le système nerveux est constitué d'un anneau autour de l'orifice buccal duquel s'étendent des nerfs radiaires le long de chacun des bras (figure 3). Il n'y a pas de système nerveux central ou de cerveau. Les ramifications des nerfs radiaires forment un réseau aux multiples connexions qui assure la coordination des mouvements. Les organes des sens, tels qu'on les connaît, sont rares. On peut signaler toutefois un système olfactif assez développé : les échinodermes perçoivent la présence et la nature de substances chimiques dissoutes dans l'eau de mer (Hickman *et al.* 1996).

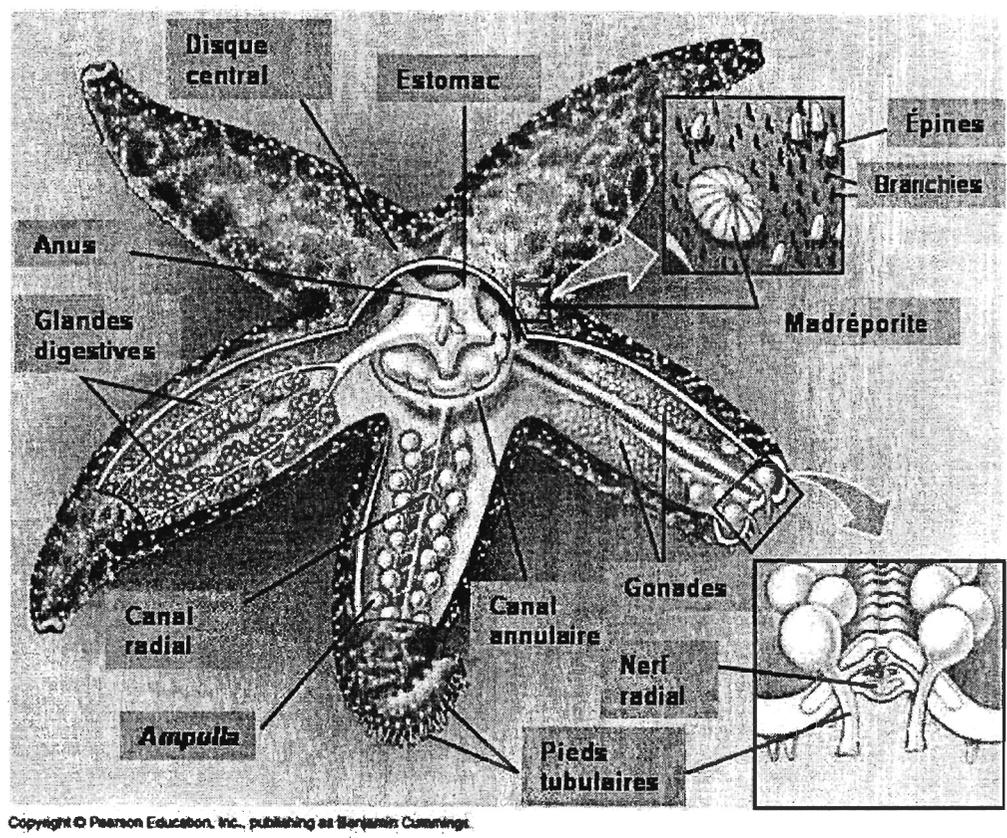


Figure 3 Anatomie d'une étoile de mer (www.anselm.edu/.../33-38-SeaStarAnatomy-L.jpg)

Les sexes sont séparés. Le sperme et les ovocytes sont libérés simultanément dans le milieu, la fécondation a lieu au hasard dans le milieu extérieur. Les échinodermes, et particulièrement les oursins ont été très utiles dans la compréhension du phénomène de fécondation, notamment en ce qui concerne les mouvements ioniques lors de la pénétration du spermatozoïde dans l'œuf (Hickman *et al.* 1996).

b. L'immunité chez les échinodermes

L'étude comparée des systèmes de défense des vertébrés met en évidence une évolution progressive vers le système immunitaire sophistiqué des mammifères. Les origines phylogéniques du système immunitaire des invertébrés restent obscures, surtout au niveau moléculaire. L'étude des réactions immunitaires non spécifiques peut être approchée par l'étude des invertébrés qui représentent 95 % des espèces animales. Le choix de modèles d'étude reste presque illimité, mais se tourne très souvent vers les arthropodes et les mollusques (protostomiens). Notre compréhension de l'immunité des échinodermes, plus proche d'un point de vue évolutif des vertébrés (deutérostomiens), reste encore limitée (Smith et Davidson, 1994) mais pourtant si importante.

i. Évolution de l'immunité

Les réponses immunitaires peuvent être de deux types : réponse innée (naturelle) et/ou réponse acquise (spécifique). La réponse innée sollicite les cellules phagocytaires tels les monocytes, les macrophages et les neutrophiles polynucléaires chez les vertébrés supérieurs. Il s'agit de la reconnaissance primitive. D'un autre côté il y a les réponses acquises, spécifiques au type de dommage (bactérien, viral) et plus efficace après une deuxième exposition. Les cellules impliquées sont les lymphocytes B et T chez les vertébrés supérieurs. Lorsque les deux types de réponses innées et acquises sont présents chez un organisme, il y a interaction entre ces deux types de réponses. En effet, certaines cellules-phagocytes présentent à leur surface un antigène pour stimuler la réponse acquise. Par la même occasion, des lymphocytes vont sécréter des cytokines stimulant la phagocytose (Roitt *et al.* 1997). Dans les paragraphes suivants, l'état des connaissances immunitaires sur les invertébrés et

particulièrement les échinodermes est présenté. On retrouve uniquement une activité immunitaire de type innée chez les échinodermes (Chia et Xing 1996).

Selon Smith et Davidson (1994), les caractéristiques du système immunitaire des échinodermes semblent être un héritage des deutérostomiens. Ainsi, à cause de leur affinité phylogénique, le système de défense des échinodermes est entrevu comme un précurseur du système de défense des Vertébrés. Tous les deutérostomiens présentent une similitude dans leur système de défense naturelle. C'est la réponse cellulaire non spécifique effectuée par une cellule immunitaire : phagocytose, encapsulation, chimiotaxie, cytotoxicité, dégranulation de composés bactéricides, de lectines, d'hémolysines, d'hémagglutinines et des réactions de cicatrisation. Tous les invertébrés multicellulaires ont cependant des cellules-phagocytes. La phagocytose est d'ailleurs une caractéristique de la réponse immunitaire présente dans tout le règne animal. Il s'agit de la première ligne de défense interne pour un organisme (Greenberg 1995). Son principe mécanique est resté intact à travers l'évolution. Elle s'effectue en quatre étapes : le chimiotactisme, l'adhésion, l'ingestion et la destruction (figure 4) (Ratcliffe *et al.* 1985).

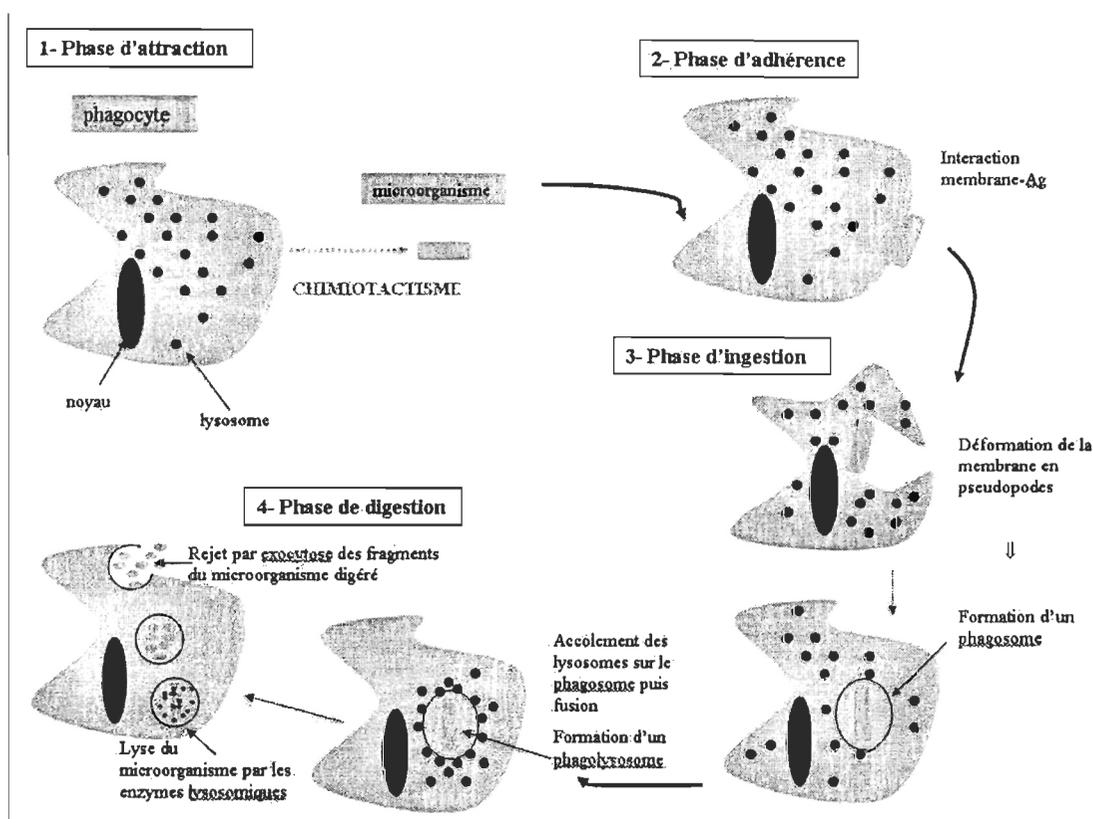


Figure 4 Les étapes de la phagocytose (pedagogie.ac-montpellier.fr/.../biologie.html)

ii. Description et rôle des cellules du liquide cœlomique

Les cœlomocytes sont les cellules présentes dans la cavité cœlomique. Ces cellules sont également retrouvées dans les tissus conjonctifs et les épithéliums ainsi que les lacunes hémales (Chia et Xing 1996). Plusieurs types cellulaires ont été identifiés dans le liquide cœlomique des échinodermes : les phagocytes (amœbocytes), les cellules sphérules, les cellules progénitrices, les hémocytes, les cellules vibratiles et les cellules cristales (Smith 1981). Une analogie peut être faite avec les quatre premiers types cellulaires, dans l'ordre : les macrophages, les mastocytes, les lymphocytes et les érythrocytes nucléés retrouvés chez les vertébrés inférieurs (Chia et Xing 1996).

Les cellules progénitrices, chez le concombre de mer, proviendraient du mésenchyme des vaisseaux hémaux et subiraient une différenciation subséquente en hémocytes, amœbocytes et cellules sphérules. Les cellules vibratiles génèrent une circulation coelomique dans la cavité corporelle, quand elles sont présentes (Smith 1981).

Tous les types cellulaires ne sont pas retrouvés chez tous les échinodermes et leurs proportions varient. Des six types cellulaires décrits, seuls les amœbocytes et les sphérulocytes ont été reconnus comme acteurs importants des réponses immunitaires. Les coelomocytes sécrètent des facteurs antibactériens comme les agglutinines et les lysines. Ces cellules peuvent aussi directement phagocyter ou encapsuler des particules étrangères (Chia et Xing 1996). La relation entre les différents types cellulaires est très floue et pour l'instant, aucun travail convaincant n'a pu apporter de réponses plausibles.

Chez les étoiles de mer, plus de 95% des coelomocytes sont des amœbocytes, qui sont responsables de la phagocytose (figure 5) (Kaneshiro et Karp 1980 ; Chia et Xing, 1996). Les phagocytes ou amœbocytes sont de taille variant entre 10 et 40 μm . Ces cellules sont également responsables de la formation du clou plaquettaire et de la formation d'un syncytium en cas de coupure tégumentaire. Une augmentation de la concentration d'amœbocytes a été observée lors d'une réaction d'inflammation ou d'un stress environnemental important induit par un choc de température ou de salinité (Pelletier, communication personnelle et observation personnelle).

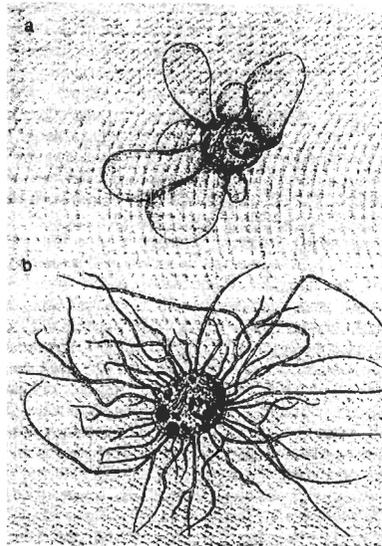


Figure 5 Les amœbocytes de l'étoile de mer (Chia et Xing 1996).

iii. Immunité innée

Une réponse humorale et cellulaire est engendrée chez les invertébrés sous la stimulation d'un antigène. L'immunité humorale est la neutralisation ou l'épuration de particules étrangères par la production et la sécrétion de facteurs humoraux (solubles) par les cellules. La réponse cellulaire est alors l'évacuation de matériel grâce à la phagocytose, l'encapsulation, la réponse cellulaire cytotoxique (Roitt *et al.* 1997).

Les échinodermes évoluent dans un milieu riche en bactéries et leur survie dépend des mécanismes naturels de défense, comme la phagocytose. Son initiation se fait par l'extension et la fusion d'un pseudopode autour de la cible, suivi par la fusion avec un lysosome et la formation du phagosome (vésicule extracellulaire). Ce mécanisme de défense est très efficace pour l'élimination des particules étrangères du liquide coelomique. Le matériel gobé par la cellule est digéré grâce à des enzymes lysosomales comme des phosphatases acides et

alcalines, β -glucuronidase, des protéases acides et des aminopeptidases et des lipases alcalines. La particule digérée peut servir à la nutrition de l'organisme. Par contre, lorsqu'une particule est indigeste, un voyage suicide du phagocyte est entrepris vers le milieu extérieur (Bayne 1990). Plusieurs voies de sorties sont suggérées par les auteurs comme les *papulae* chez l'étoile de mer (Smith 1981) ou le madréporite et le canal alimentaire (Endean 1966).

iv. Molécules immunostimulantes

Les Vertébrés possèdent un grand nombre de molécules ayant une action stimulatrice sur les cellules immunitaires. En fait, des molécules nommées opsonines lient la particule étrangère afin d'améliorer ou de permettre la reconnaissance par la cellule-phagocyte. Ce sont par exemple les molécules du système du complément et les anticorps. Plusieurs auteurs ont montré la présence de molécules à caractère opsonisante chez les invertébrés comme les concombres de mer (Xing et Chia 2000) et les étoiles de mer (Beck *et al.* 1993). En travaillant sur *Asteria forbesi*, Beck et Habicht (1986) ont caractérisé une protéine qu'ils ont nommé l'interleukine-1 (IL-1 *like*) des invertébrés à cause des caractéristiques fonctionnelles partagées avec l'IL-1 des Vertébrés. Cette molécule participe à la régulation de la phagocytose chez l'astérie. Non seulement, elle a une action opsonisante mais aussi une action directe sur l'activation des phagocytes. L'IL-1 *like* n'a cependant aucun effet direct sur les phagocytes des vertébrés et des tuniciers (Beck *et al.* 1993). Des molécules immunostimulantes, comme des hémagglutinines et des hémolysines, ont été retrouvées mais peu d'entre elles ont été caractérisés (Chia et Xing 1996). Un progrès dans leur identification représenterait un pas important dans la compréhension du système de défense des vertébrés mais aussi des invertébrés.

v. Immunité adaptative

Les échinodermes ne semblent pas avoir vraiment de mémoire immunitaire (immunité acquise) sauf peut être à court terme. Plusieurs travaux ont permis de démontrer une augmentation de la rapidité du rejet des allogreffes (Chia et Xing 1996). Mais comment ces invertébrés peuvent-ils survivre depuis tant d'années sans système acquis développé? Quelques auteurs ont tenté de répondre à cette énigme et plusieurs hypothèses ont été avancées. Même si les bactéries sont continuellement soumises à l'aléa des mutations, elles conservent toujours des protéines de structures comme les lipopolysaccharides (LPS) permettant leur reconnaissance (Loker *et al.* 2004). L'activité des cellules immunitaires des oursins est en effet stimulée par la présence des LPS (Courtney Smith *et al.* 1995). Les invertébrés reconnaîtraient d'ailleurs essentiellement ces structures (Loker *et al.* 2004). D'autres hypothèses sont cependant présentées pour pallier l'absence de système acquis. Il s'agit de la collaboration avec un symbiote, ou le mosaïsme, ou encore la production de molécules immunitaires d'une variété surprenante, et pour finir, le mutualisme. Ces systèmes immunitaires adaptés ne semblent cependant pas avoir d'effet significatif sur la défense immunitaire (Loker *et al.* 2004). L'évolution des échinodermes nous laisse encore beaucoup à découvrir.

vi. Reconnaissance du soi

Selon la revue de Loker *et al.* (2004), un système de reconnaissance du soi est présent chez les invertébrés, ou plutôt un système de reconnaissance de l'absence du soi. Ainsi, trois classes d'échinodermes rejettent les greffes venant d'autres individus de la même espèce (Chia et Xing 1996). Le transplant est infiltré par les cellules phagocytaires qui perturbent l'architecture des cellules. En 1972, Hidelman et Dix ont démontré le rejet d'allogreffes chez

l'étoile de mer et le concombre de mer ainsi que l'acceptation d'autogreffes. Cependant, les mécanismes exacts de ce système de reconnaissance sont encore méconnus (Loker *et al.* 2004). La découverte des molécules impliquées dans la reconnaissance du soi permettra de mieux comprendre la spécificité des pathogènes des invertébrés pour leurs hôtes.

2. Le TBT en milieu marin



En 1986, Goldberg déclarait que le tri(*n*-)butylétain (TBT) était le toxique le plus puissant rejeté délibérément dans l'océan. Aujourd'hui, 20 ans plus tard, le TBT est toujours un polluant d'actualité. Le TBT, de la classe des organoétains, fait parti de la formule toxique présente dans les peintures antisalissures des bateaux. C'est un biocide très efficace envers les espèces cibles et malheureusement, envers les espèces non ciblées également (de Mora 1996). Voici dans un premier temps, un survol de la présence mondiale du TBT, puis, l'état des connaissances sur sa toxicité, particulièrement son immunotoxicité et sa cytotoxicité.

a. Le TBT dans l'environnement

La peinture antisalissure des bateaux est de loin la principale source d'organoétains retrouvés dans le milieu marin (Hashimoto *et al.* 1998). Les divers compartiments environnementaux, biologiques ou non, sont contaminés par le TBT (Batley 1996). On en retrouve, par exemple, dans les sédiments (St.-Louis *et al.* 1997 ; Hashimoto *et al.* 1998 ; Viglino *et al.* 2004), la colonne d'eau (Viglino 2005), les amphipodes (Takeuchi *et al.* 2004), les moules et les myes (Barakat 2004), les poissons pélagiques et németaux (Kannan *et al.* 1995), les foies d'oiseaux marins (Guruge *et al.* 1997), et les mammifères marins (St-Louis *et al.* 2000). Le TBT a même été retrouvé dans les organes humains (Kannan *et al.* 1999 ; Gui-Bin *et al.* 2000 ;

Nielsen et Strand 2002), sans que les effets toxicologiques des concentrations retrouvées sur l'organisme soient connus (Kannan et al. 1999). Malgré la restriction sur l'utilisation des peintures antisalissures à base de TBT, une étude au Japon a montré que sa concentration dans les amphipodes n'avait que très peu diminué en 9 ans. En effet, le polluant était encore présent dans le biote le long des côtes non habitées et peu industrielles (Takeuchi *et al.* 2004). La législation sur l'utilisation du TBT est très épineuse à cause de la difficulté à démontrer les effets néfastes sur l'homme (Bosselmann 1996). De plus, l'efficacité du composé dans les peintures antisalissures permet l'économie de centaines de millions de dollars. Alors, malgré son impact important sur des organismes non ciblés, ayant même une valeur commerciale (Goldberg 1986), la réglementation sévère du TBT a tardé. En 1982, la France a été le premier pays à bannir ce toxique des peintures au TBT sur les bateaux de plaisance inférieur à 25 m. Ce bannissement a été suivi par la Grande-Bretagne dès 1987. Depuis, le Canada, les États-Unis, l'Australie, l'Afrique du Sud et la Nouvelle-Zélande ont adopté le même règlement (Bosselmann 1996). Une diminution de la concentration dans les eaux et les organismes cibles est observée dans les zones qui étaient très contaminées avant les mesures des années 80. Cette diminution n'est cependant pas présente dans les sédiments (Waite et al. 1991). L'Organisation Maritime Internationale (OMI) a adopté le bannissement des organoétains pour le 1^{er} janvier 2008. Déjà, depuis le 1^{er} janvier 2003, l'OMI a demandé le retrait du TBT des nouveaux composés antisalissures. Cette organisation a été mise en place par l'Organisation des Nations Unies en 1948 dans le but d'élaborer des dispositions relatives à la mer (IMO 2005). Cependant, le TBT continue d'inquiéter les scientifiques puisque, pour l'instant, son introduction dans l'environnement continue à partir des bateaux de plus de 25 m (de Mora 1996) puisque l'utilisation est toujours permise sur autorisation spéciale, jusqu'en 2008. Il existe évidemment des pays où aucune législation n'existe. De plus, la dégradation du

TBT est beaucoup plus faible dans les latitudes froides, où le compartiment sédimentaire est de plus en plus considéré comme une source importante de TBT pour le milieu océanique (Viglino *et al.* 2004).

b. La toxicité du TBT

Le comportement du TBT dans les divers compartiments biotiques et abiotiques est très bien documenté dans la littérature scientifique (Fent 1996 ; de Mora 1996 ; Dopp *et al.* 2004). Nous ne ferons que résumer les principaux effets biologiques du TBT qui portent atteintes à l'intégrité de l'organisme.

Le TBT est un perturbateur endocrinien (MacMaster 2001). Il perturbe la biotransformation des hormones mâles en hormones femelles (Baldwin et LeBlanc 1994, Oberdörster *et al.* 1998), provoquant la masculinisation des gastéropodes : l'imposex (Morcillo *et al.* 1998 ; Matthiessen et Gibbs 1998 ; Alzieu 2000). La présence de l'imposex chez les gastéropodes est, par ailleurs, un indicateur de la contamination au TBT en milieu naturel (Evans et Nicholson 2000).

Dans une revue exhaustive sur les organoétains, Fent (1996) résume que le TBT entre en interaction avec les mono-oxygénases des microsomes du foie, induisant l'inactivation de leur principale composante, les cytochromes P-450, et l'inhibition de l'activité du cytochrome c réductase NAD(P)H. C'est-à-dire que le TBT atteint les enzymes responsables de la détoxification des polluants environnementaux ainsi que le métabolisme des substances endogènes. Les mêmes conclusions ont été rapportées lors d'études *in vivo* (Fent 1996).

De plus en plus d'études suggèrent une neurotoxicité du TBT, peu soupçonnée il y 10 ans (Fent 1996). L'effet néfaste du TBT sur le système nerveux est maintenant évident. En effet,

il agit sur la neurotransmission chez le rat (Kishimoto *et al.* 2001), traverse la barrière hémato-encéphalique chez un poisson (Rouleau *et al.* 2003). Une exposition à ce polluant engendre également une dépression des neurotransmetteurs et de l'activité des ATPases dans le cerveau chez le rat (Elsabbagh *et al.* 2002). Et enfin, l'inhibition même de l'aromatase du système enzymatique des P-450, en cas d'exposition au TBT, ne serait pas le facteur primordial de l'induction de l'imposex. Le TBT agirait comme neurotoxique en induisant la sécrétion d'un neuropeptide responsable de l'apparition des organes accessoires mâles directement tandis que l'effet inhibiteur de l'aromatase agirait dans le maintien de l'imposex (Oberdörster et McClellan-Green 2002).

Le TBT est également un génotoxique. En effet, il génère une perturbation du matériel génétique chez les larves de deux espèces marines, *Mytilus edulis* et *Platynereis dumerilli* (Jha *et al.* 2000). Cette génotoxicité aurait une conséquence néfaste sur le développement de ces espèces (Jha *et al.* 2000). Le TBT provoque directement une erreur sur le brin de l'ADN chez les hémocytes de moules lors d'une exposition *in vivo* (Micié *et al.* 2001).

Le TBT a également un effet sur les différents stades de développement des larves de plusieurs invertébrés marins (Cima *et al.* 1996 ; Girard *et al.* 2000 ; Jha *et al.* 2000). La gastrulation est le stade de développement le plus sensible chez les tuniciers (Cima *et al.* 1996). Chez *M. edulis*, il agit directement sur le matériel génétique des larves, ce qui perturbe leur développement (Jha *et al.* 2000). De plus, chez les oursins, quelques nM de TBT sont suffisants pour induire une perturbation du développement des larves, et ce, indépendamment de la bioaccumulation de l'animal (Girard *et al.* 2000).

Finalement, le TBT est un immunotoxique bien connu (Chia et Xing 1996 ; Fent 1996). Chez les vertébrés, cet agent supprime les réactions immunitaires dépendantes du thymus sur lequel il semble avoir une action directe au niveau de la prolifération cellulaire (Snoeij *et al.* 1987). La résistance spécifique de l'animal est également atteinte (Vos *et al.* 1984). Lorsque des rats sont exposés à de faibles doses de TBT lors de leur développement intra-utérin, une diminution du poids de la rate et du thymus est observée (Cooke *et al.* 2004). Un effet immunosupresseur a également été observé chez les poissons (O'Halloran *et al.* 1998). Chez les invertébrés, l'effet du TBT a beaucoup été étudié sur la phagocytose puisque celle-ci est leur principale fonction immunitaire (Galloway et Depledge 2001). Il a un effet inhibiteur sur la phagocytose des invertébrés marins comme les huîtres (Rice et Weeks 1990 ; Fisher *et al.* 1990), les tuniciers (Cooper *et al.* 1995) ou encore les bivalves (Cima *et al.* 1999 ; St.-Jean *et al.* 2002). L'étoile de mer polaire, *L. polaris*, semble moins sensible au TBT lors d'exposition *in vivo* (Békri et Pelletier 2003). Aucune étude de la toxicité du TBT sur les cellules immunitaires, mises à part celles réalisées dans notre laboratoire, n'a été effectuée sur les échinodermes.

Le mécanisme d'entrée du TBT dans la cellule reste encore flou puisque certaines études indiquent qu'il pénètre la cellule (Guolan et Yong 1995) et d'autres qu'il s'insère dans la membrane cellulaire (Gray *et al.* 1987). Par contre, sa cytotoxicité se dessine parfaitement. Il stimule très clairement l'apoptose chez les vertébrés (Nakata *et al.* 1999 ; Umebayashi *et al.* 2004) mais aussi chez les invertébrés marins (Micié *et al.* 2001). Une induction du système enzymatique des caspases, conduisant à l'apoptose, est observée après une exposition à de faibles concentrations de TBT (Stridh *et al.* 1999). De plus, en perturbant l'homéostasie du calcium, le TBT altère le cytosquelette (Cima *et al.* 1998). De manière générale, le TBT porte

donc atteinte à l'intégrité cellulaire d'espèces aussi différentes que les tuniciers (Cima et al. 1998), la moule (Micié et al. 2001) et l'homme (Stridh et al. 1999). Peu d'organismes restent apparemment insensibles à sa toxicité mais *L. polaris* fait partie de ceux là.

3. Les objectifs de cette étude

De plus en plus d'études démontrent que les divers polluants environnementaux, seuls ou en interaction, perturbent le système immunitaire des animaux (Galloway et Depledge 2001). Beaucoup de travaux sont effectués sur les mammifères et des populations entières, comme les bélugas du St.-Laurent (Martineau et al. 2002 ; St.-Louis *et al.* 2000). Les invertébrés représentent plus de 95% du royaume animal et beaucoup, comme les étoiles de mer, sont des espèces clés de leurs écosystèmes (Booolootian 1966). Ce sont également des espèces très utiles lors d'études environnementales à cause de leur système immunitaire simplifié. En effet, une perturbation comme la présence d'un produit toxique peut directement affecter leur capacité de résistance aux pathogènes (Galloway et Depledge 2001). D'après une étude précédente effectuée dans notre laboratoire, *L. polaris* semble peu sensible au TBT, polluant environnemental ubiquiste (Békri 2001).

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le comportement des amœbocytes de *L. polaris*, en présence de TBT. Pour cela, nous avons évalué la cytotoxicité et l'immunotoxicité du TBT après exposition *in vitro* des amœbocytes de *L. polaris*. Nous avons comparé deux méthodes de mesure pour chaque fonction cellulaire évaluée. La viabilité de la cellule a été vérifiée selon la méthode classique de la coloration au bleu trypan et selon la métabolisation de la fluorescéine diacétate (FDA). La phagocytose, a été évaluée en microplaque et en

cytométrie de flux. Nous avons également tenté de mieux comprendre les mécanismes de toxicité du TBT, par une méthode indirecte de la mesure de l'incorporation du TBT dans la cellule. Enfin, nous avons examiné le rôle des facteurs environnementaux et biologiques pouvant influencer la variabilité des réponses.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Entretien des astéries

Les étoiles de mer, *L. polaris*, sont maintenues en aquarium (1500 litres) à la station de Pointe-au-Père (Rimouski, Québec) depuis plusieurs années. En effet, elles sont originaires de l'estuaire du Saint-Laurent et sont soumises aux conditions qu'on y retrouve en temps réel car la circulation dans l'aquarium s'effectue de façon continue. L'eau de mer est puisée à 5 m de profondeur au large de la station et filtrée à travers un lit de gravier. En fonction de la saison, la salinité fluctue entre 20 et 30 ‰ et la température, entre 0 et 15° C. Les astéries ont été nourries à satiété de moules bleues, *Mytilus edulis*, récoltées sur un site non contaminé à proximité de la station de pompage.

2. Prélèvement du liquide cœlomique

L'astérie est d'abord épongée avec un papier absorbant, puis le prélèvement du liquide cœlomique de 2 ml est effectué avec une seringue stérile de 3 ml, surmontée d'une aiguille de calibre 23. Pour minimiser l'agrégation cellulaire, la seringue est préalablement rincée et remplie au tiers de son volume de milieu anti-agrégatif (AG) froid (4°C). L'AG se compose d'eau de mer artificielle sans calcium, ni magnésium (EMASCM) et d'acide éthylènediamine tetra-acétique (EDTA). La composition de l'AG et de l'EMASCM est présentée en détail à l'annexe A. L'étoile de mer est piquée à la base au dernier tiers de son bras afin que la piqûre soit réellement faite dans le cœlome. Puisque cela ne semble pas l'affecter, un seul ml par bras est prélevé (Békri 2001 et Le Breton 2002). De plus, en prélevant ainsi 1 ml dans 2 des 6 bras, il nous apparaissait que le milieu cœlomique ponctionné serait plus homogène. Le liquide cœlomique est alors transféré dans des tubes *Eppendorf*, rincés préalablement avec du

milieu AG froid. Lors du transfert de liquide, l'aiguille est retirée afin de conserver les cellules intactes. Les échantillons sont placés sur glace à l'obscurité, en attendant les traitements.

La concentration en amœbocytes est déterminée à l'hémacymètre (Bright-Line de Neubauer), en microscopie à contraste de phase, au grossissement 20X, afin d'obtenir de $1 \cdot 10^6$ ou de $2 \cdot 10^6$ cellules par ml, dépendamment des expériences. Les cellules agrégées sont exclues du compte puisque nous estimons qu'elles seront lessivées dès la période d'adhérence. La distribution cellulaire est très clairement dominée par les amœbocytes comme décrit par de nombreux auteurs (Kaneshiro et Karp 1980 ; Chia et Xing, 1996).

L'étude comporte trois étapes :

- A- Dans un premier temps, afin de vérifier la condition cellulaire, des essais de viabilité cellulaire (VB) et de phagocytose (PHAG) sont réalisés après l'exposition au TBT en microplaque.
- B- Dans un deuxième temps, afin de comparer les différentes méthodes d'évaluation de la condition cellulaire, des tests de phagocytose au cytomètre en flux et de viabilité cellulaire au microscope sont effectués après une exposition au TBT en tube.
- C- Enfin, pour connaître le comportement fondamental des amœbocytes, un essai sur l'incorporation du TBT est réalisé au cytomètre en flux.

Plusieurs améliorations ont été apportées au protocole de base. Une section *Mise au point* est présenté dans le chapitre des Résultats. D'autres mises au point sont présentées à l'annexe B.

3. Étape A – Tests en microplaque

Le travail en microplaque se déroule en plusieurs étapes. Il faut dans l'ordre : préparer les microplaques (i) ; procéder à l'exposition des cellules (ii) et enfin choisir l'un des deux tests de condition cellulaire (iii, iv) (figure 6).

a. Préparation des microplaques

Pour chaque expérience en microplaque, le liquide cœlomique de 3 à 6 étoiles de mer est ponctionné séparément, ce qui correspond respectivement à l'utilisation de 2 à 4 microplaques de 96 puits, compte tenu du nombre de répliquas. La concentration cellulaire, pour chaque étoile de mer, est ajustée à $2 \cdot 10^6$ d'amœbocytes par ml grâce à une dilution avec du milieu AG. Afin de distribuer $2 \cdot 10^5$ cellules, un volume 100 μ l de liquide cœlomique est déposé au centre de chaque puit. Plusieurs concentrations toxiques sont testées sur les cellules (voir section suivante). Pour chaque concentration, 6 répliquas par organisme (pseudo-répliquas) sont effectués et répartis en 6 puits (Figure 7). Une fois les $2 \cdot 10^5$ cellules déposées au fond de chaque puit, la microplaque est maintenue à l'obscurité à 12°C afin de laisser du temps pour l'adhérence des cellules. Cette période est importante car nous devons changer le milieu pour éliminer au maximum la présence de l'EDTA. En effet, l'EDTA, présent dans l'AG, est essentiel lors du prélèvement du liquide cœlomique pour éviter l'agrégation des cellules dès la ponction. Cependant, il a un effet inhibiteur sur la phagocytose des leucocytes bovins (Ducusin *et al.* 2001) et donc, afin de diminuer son effet potentiel, le milieu antiagrégant est retiré une fois les cellules réparties dans les puits.

Afin de s'assurer qu'elles adhéraient réellement dans le fond des puits, la quantité de cellules perdues a été vérifiée dans les tests préliminaires (chapitre Résultats section *Mise au point* 2a). L'adhérence est calculée selon la perte de cellules dans le milieu de rejet des puits. Le

comptage des cellules perdues est fait à l'hémacymètre en microscopie. Une période d'adhérence d'1 h est suffisante puisqu'une très forte proportion de cellules est ainsi maintenue, comme le mentionnait d'autres études (Smith 1981 ; Békri 2001 ; Le Breton 2002). Donc, après 1 h d'incubation, 90 μ l de milieu est retiré avant de passer à l'étape d'exposition au TBT. La perte cellulaire a également été vérifiée après l'exposition au TBT et les résultats sont présentés dans le chapitre des Résultats à la section 2a. Le protocole d'exposition est le même qu'expliqué dans la section suivante.

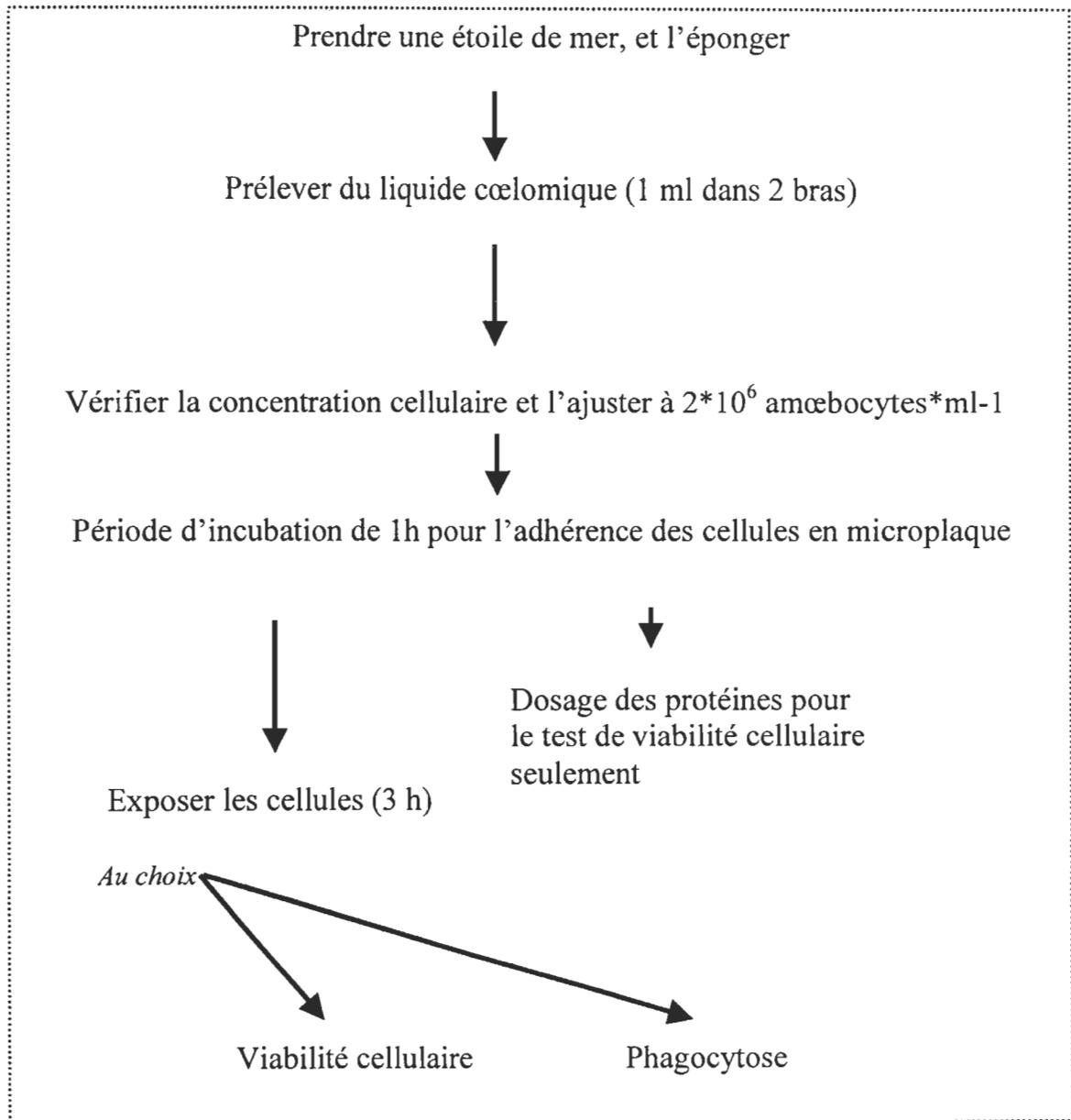


Figure 6 Schéma des expériences en microplaque

Étoile 1			Étoile 2			Étoile 3			Standard		
C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	STD	STD	STD
C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	STD	STD	STD
C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	STD	STD	STD
C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	C 2	STD	STD	STD
C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	STD	STD	STD
C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	C 3	STD	STD	STD
C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	STD	STD	STD
C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	C 4	STD	STD	STD

Figure 7 Schéma d'une microplaque pour les essais de phagocytose, de viabilité cellulaire. C1 correspond à la concentration d'exposition témoin (EMASCM), C2, C3 et C4 correspondent aux concentrations croissantes de TBT testées sur les cellules.

b. Exposition cellulaire

Les cellules sont exposées au chlorure de tributylétain (TBT-Cl) à différentes concentrations de 0 à 6,9 μ M de TBT. La solution mère de TBT-Cl est faite dans l'éthanol (2.59 mg/ml). Les solutions filles sont préparées dans l'eau de mer artificielle sans calcium ni magnésium (EMASCM).

Après avoir retiré 90 μ l de milieu (liquide cœlomique et AG), une solution tampon saline (20 μ l), le tampon moule-étoile (TME), est ajouté dans chaque puit avant la distribution de 100 μ l de la solution toxique (C2 à C4). Dans les puits témoins (C1), les cellules sont exposées à 100 μ l d'EMASCM. La température d'exposition de 12°C a été déterminée par des essais (voir partie Résultats section *mise au point*). Après 3 h d'incubation, 125 μ l sont retirés et les cellules sont rincées une fois avec 100 μ l de EMASCM avant de procéder à 1 des 2 tests de fonctionnement cellulaire suivant : viabilité cellulaire (VB) (c) ou phagocytose (PHAG) (d).

c. Test de viabilité cellulaire (VB)

Le test de VB permet de savoir si les concentrations de TBT testées sont cytotoxiques. Nous pourrions ainsi calculer une EC50, c'est-à-dire une concentration de TBT qui tue 50% des cellules. La fluorescence est lue grâce à un lecteur de microplaque en fluorescence de Spectra Gemini[®]. La VB est exprimée en fonction de la quantité de protéines intracellulaires. C'est pourquoi le test de VB comporte 2 étapes : (a) le dosage des protéines et (b) la métabolisation du diacétate de fluorescéine (FDA).

i. Dosage des protéines

La méthode de dosage des protéines par la fluorescamine a été développée par Udenfriend *et al.* (1972) afin de doser de petits volumes d'échantillons. La réaction est rapide en solution aqueuse, à température ambiante. La fluorescamine et ses produits issus de l'hydrolyse ne sont pas fluorescents, donc ne biaisent pas les résultats. La fluorescamine réagit avec des radicaux amines primaires (R-NH₂) des molécules pour former un composé fluorescent (ou fluorophore).

La fluorescamine est préparée dans une solution d'acétonitrile et sa stabilité est d'environ 12 semaines à 4°C. Cette solution est conservée et utilisée selon les conditions décrites dans le protocole initial (de Bernardo 1974). Le dosage de protéines par la fluorescamine en microplaque est une méthode adaptée par Lorenzen et Kennedy (1993) pour les cellules hépatiques de mammifères puis par Blaise *et al.* (2002) pour les cellules d'invertébrés marins. Le dosage des protéines est donc effectué en fluorescence dans une microplaque noire 96 puits indépendamment des autres tests. Une fois l'ajustement cellulaire effectué à $2 \cdot 10^6$ cellules / ml, un volume de 100 µl est déposé par puits, 6 puits pour une astérie. Après 1 h d'incubation à température ambiante, ce volume de 100 µl est remplacé par 130 µl de NaOH

(0,02 M). Après une incubation de 30 min sur glace et à l'obscurité, un volume de 70 µl de fluorescamine (0,2 mg.ml⁻¹) est ajouté. La lecture a lieu après 10 min (Excitation 390 nm, émission 475 nm, cutoff 420 nm). Le calcul des protéines se fait par une courbe standard effectuée selon le même protocole avec du sérum d'albumine bovin (BSA), de la solution tampon, du NaOH et de la fluorescamine. La composition de la solution de BSA et de fluorescamine est présenté en détail à l'annexe A.

ii. Métabolisation du FDA

La viabilité de la cellule est déterminée grâce à un colorant supravital (ou d'inclusion) qui utilise la métabolisation de la FDA (non fluorescente) par les estérases des cellules viables en fluorescéine (fluorescent vert) (Rotman et Papermaster 1966). La viabilité est évaluée chez les cellules exposées par la méthode du diacétate de carboxyfluorescéine (Altman *et al.* 1993) adaptée pour le dosage en microplaque par Blaise *et al.* (2002).

Après la période d'exposition au TBT (voir section précédente), les cellules sont lavées avec de l'EMASCM deux fois. Puis, un volume de 100µl de FDA (15 µM) est ajouté dans chaque puits pour une période de 15 min, à température ambiante. Le FDA est retiré et un volume de 100 µl de TME est ajouté dans chaque puits, pour la lecture en fluorescence (Spectra Gemini excitation : 485 nm et émission : 535 cutoff : 515 nm). Une courbe standard est effectuée avec de la fluorescéine dans la solution TME.

d. Test de phagocytose

La méthode d'évaluation de la phagocytose a été développée par Vray *et al.* (1980) pour des fins médicales. Les cellules sont extraites directement des mammifères ou proviennent de lignées cellulaires établies. La méthode a été adaptée en microplaque, toujours pour des fins

médicales avec des cellules de mammifères, par Uff *et al.* (1993) et Wan *et al.* (1993). Avec l'augmentation des études écotoxicologiques, le test de la phagocytose s'effectue également sur des invertébrés afin de connaître l'état de santé de l'animal et de son écosystème (Grundy *et al.* 1996, Blaise *et al.* 2002, St-Jean *et al.* 2002, Békri et Pelletier 2004). Il consiste à stimuler les phagocytes des étoiles de mer par des bactéries mortes (*Micrococcus lysodeikticus*) marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). L'intensité de la fluorescence est ensuite mesurée. L'immunotoxicité du TBT sur les amœbocytes est ainsi évaluée.

i. Marquage des bactéries

Les bactéries mortes et congelées *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemical Co) sont d'abord réhydratées avec de l'eau de mer stérile (EMS, filtrée 0.2 µm). Puis, elles sont marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La solution bactérienne est mélangée à la solution de marquage, volume pour volume, (NaHCO₃ 0.1M, FITC 0.5 mg.ml⁻¹) et maintenue à l'obscurité, à température ambiante et sous une agitation douce pendant 24 h. Puis, la solution est centrifugée et rincée deux fois avec de l'EMS (15 min, 2700 g). À chaque fois, le culot (bactéries marquées) est remis en suspension dans l'EMS. Les bactéries marquées sont comptées au microscope en épifluorescence et la concentration est ajustée à un ordre de 10⁸ bactéries par ml. La solution est fractionnée dans des tubes *Eppendorfs* qui sont congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Plusieurs auteurs ont confirmé la stabilité et l'efficacité du marquage (Vray *et al.*, 1980 ; Békri 2001).

ii. Phagocytose *in vitro*

Ce test nous permet d'évaluer l'effet du TBT sur la phagocytose, une fonction primordiale de l'amœbocyte. Les cellules doivent être viables après l'exposition car nous voulons vérifier si

la cellule est toujours fonctionnelle. Il est donc important d'avoir exposé les cellules à des concentrations de TBT inférieures à la EC50 déterminée avec le test de VB. Quelques résultats ayant permis l'élaboration du test sont présentés dans la section *Mise au point* de la partie Résultats. Cette méthode est l'adaptation de la méthode de Blaise *et al.* (2002).

Après l'exposition aux contaminants, les cellules sont lavées une fois avec de l'EMASCM et le milieu est remplacé par un volume de 100 µl de EMASCM. Les bactéries sont sonifiées au bain à ultrasons pendant 8 min. Afin de fournir aux amœbocytes les ions nécessaires à la phagocytose (Ca^{++} et Mg^{++}), la solution de bactéries marquées est diluée à 300 millions de bactéries par ml avec de l'EMS. Un volume de 100 µl de cette solution est déposé dans chaque puit ce qui correspond à un rapport de 150 bactéries par cellule. Après 18 h d'incubation à 12°C, le milieu est retiré. Les cellules sont une première fois rincées 2 min au bleu trypan (0.125mg/ml filtré sur 0.2 µm) puis rincées 2 fois à l'EMS. Avant la lecture en fluorescence (excitation : 485nm, émission : 535nm, cutoff : 515nm) dans l'EMS, la plaque est agitée 15 s par le lecteur.

4. Étape B- Test en cytométrie en flux

Parallèlement aux tests en microplaque, des tests de phagocytose par cytométrie en flux ont été effectués. Le principe de ce test est d'exposer les amœbocytes *in vitro* au TBT (i) puis de vérifier la viabilité des cellules (ii) et la capacité de phagocytose (iii). Les concentrations de TBT ont été choisies en fonction de la cytotoxicité du TBT déterminée par le test de viabilité des cellules au bleu trypan. Afin de s'assurer que la cellule reste fonctionnelle après un traitement au TBT, nous avons utilisé des concentrations d'exposition non létales pour les cellules. La EC50 ne peut pas être calculée par cette méthode car nous n'avons pas pu exposer les cellules à plus de 2 concentrations de TBT différentes. En effet, cette méthode au

cytomètre en flux requiert davantage de cellules par concentration d'exposition. Or, nous ne pouvons pas ponctionner un volume plus élevé de coelome chez les étoiles de mer, donc augmenter le nombre de cellules disponibles, sans risquer d'ajouter un facteur de perturbation physiologique pour la suite des expériences.

a. Exposition cellulaire

L'exposition des amœbocytes au TBT s'effectue dans des tubes en polypropylène (Sarsted). Les solutions de TBT sont préparées de façon identique aux essais en microplaques. Pour les raisons mentionnées ci-haut de volume de liquide coelomique ponctionné, nous avons choisi de faire des duplicata pour le test de viabilité cellulaire. Pour le test de phagocytose, par contre, nous avons décidé de maintenir 3 répliquas afin de vérifier la variabilité intra individuelle par une moyenne et son erreur type.

Un volume de 500 μl de liquide coelomique (1×10^6 cellules. ml^{-1} , ajustée avec l'AG) est déposé dans chaque tube pour une période d'adhérence d'une heure. Pour éviter une forte mortalité, les cellules sont maintenues à 12°C. Le surnageant est ensuite retiré délicatement et les cellules sont exposées pendant 3h, à l'obscurité, à 2 concentrations de TBT (2,3 μM et 4,6 μM dans l'EMASCM) et à une concentration témoin (EMASCM seulement). Tout comme les essais de phagocytose en microplaque, l'EDTA présent dans l'AG, est retiré du milieu.

b. Test de viabilité cellulaire

Tout comme le test en fluorescence, le test de viabilité cellulaire au bleu trypan permet de savoir si les concentrations de TBT testées sont cytotoxiques. Ce test d'exclusion (colorant non fluorescent) est le test de détermination de la viabilité cellulaire le plus utilisé.

La viabilité cellulaire est vérifiée en début et fin d'expérience. Le bleu trypan (0,2M filtrée à 0,2 μm) est dilué 10 fois dans l'échantillon cellulaire où la viabilité cellulaire doit être

déterminée. Le comptage (hémacymètre Bright-Line de Neubauer) au microscope est effectué immédiatement après l'exposition au colorant comme suggéré par Altman *et al.* (1993).

c. Test de phagocytose

Tout comme celui avec la microplaque, ce test nous permet d'évaluer l'effet du TBT sur la phagocytose. Nous pourrions également comparer les 2 techniques de mesures de la phagocytose. Brièvement, le fonctionnement du cytomètre en flux est le suivant. Les particules en suspension monodispersées sont entraînées à grande vitesse (environ 1 m.s^{-1}) dans une veine liquide. Par focalisation hydrodynamique, chaque cellule défile une à une devant une source et génère différents signaux optiques (réflexion, réfraction, diffraction, fluorescence). Ceux-ci sont sélectionnés à l'aide de miroirs et de filtres appropriés avant d'être recueillis par des détecteurs (photomultiplicateur ou photodiode) puis convertis en impulsions électriques. Après enregistrement, le programme informatique restitue les données par combinaison des paramètres (granulosité relative, taille relative et intensité de fluorescence relative) sous la forme de distributions monoparamétriques (histogramme) ou biparamétriques (cytogramme).

Le Facscan® de Becton Dickinson utilise le programme CellQuest® sur Machintosh pour quantifier la fluorescence. La source lumineuse est un laser à l'argon (488nm). Trois canaux de détection mesurent simultanément les fluorescences verte (FL-1), jaune orange (FL-2) et rouge (FL-3).

Le principe du test au Facscan® pour évaluer la phagocytose est d'exposer les cellules à des billes fluorescentes pendant un temps donné. Pour déterminer le temps d'incubation, il faut tenir compte de l'espèce animale utilisée puisque leurs cellules n'ont pas toutes les mêmes vitesses de phagocytose. Après un traitement visant à séparer les billes non-ingérées de la

suspension cellulaire, l'échantillon, dans lequel les cellules sont exposées aux billes, est injecté au cytomètre. L'appareil permet de quantifier le pourcentage de cellules ayant phagocyté 1, 2, 3 billes *etc.*, selon les informations désirées sur un nombre total d'évènements (cellules) prédéterminés.

La méthode de cytométrie en flux a été adaptée de Brousseau *et al.* (1998) par les laboratoires du Dr. M. Fournier et du Dr. J. Pellerin et mise au point pour les bivalves. Le ratio cellules / billes est de 100. Le volume de billes ajouté à l'échantillon cellulaire est calculé selon la formule suivante (Brousseau *et al.* 1998) :

$$\text{Quantité de billes /ml} = 6.\omega.10^{12} / \pi.\delta.\beta^3$$

ω = 0.025 g (pour une solution de latex de 2.5%)

δ =densité du polymère en g/ml (latex = 1.05 g/ml)

β = diamètre des billes en μm

Afin d'éviter les agrégats, les billes fluorescentes (Molecular Probes) sont sonifiées 10 min à 10 °C avant d'être mises en contact avec les cellules. Après l'incubation, de 16 à 18 h à 12°C et à l'obscurité, la solution cellules-billes est mélangée et le liquide est récupéré afin de séparer les billes non-ingérées. Le fait de les retirer du milieu permet une meilleure définition de la lecture au cytomètre. Cependant, les amœbocytes étant des cellules très adhérentes, nous avons des interrogations sur la quantité et la qualité des cellules récupérées dans le liquide. Nous avons alors voulu vérifier si les cellules adhérentes au fond du tube faisait également de la phagocytose et surtout dans quelle proportion. C'est pourquoi le liquide a été séparé en deux fractions : la première est récupérée mécaniquement en agitant le tube et la deuxième est

ensuite récupérée chimiquement avec la trypsine (0,25% dans l'EMASCM). La trypsine est fréquemment utilisée pour décoller les cellules adhérentes. Elle brise les peptides du côté C-terminal des acides aminés lysine et arginine. Elle s'utilise de façon optimale entre pH 7 et 9 (Fiche signalétique, SIGMA), ce qui correspond à notre milieu. La figure 10 résume la manipulation de la phagocytose en cytométrie.

Donc, à la fin de l'incubation, pour enlever les billes non-ingérées de la solution, la première fraction est déposée sur un gradient isotonique de BSA (30 ‰, Sigma Chemical Co). Après centrifugation (8 min, 4°C, 800 rpm), le culot est remis en suspension dans 0,5 ml de solution fixatrice (0,5 % formaldéhyde, 0,2 % azide de sodium dans la solution de facsflow). Le même traitement de centrifugation est répété avec la deuxième fraction cellulaire. Même si la trypsine n'est en contact avec les cellules que quelques minutes, à la fin de la période de phagocytose, elle se retrouve supprimée du milieu puisque seul le culot est conservé. Son effet néfaste sur la phagocytose reste ainsi très limité.

Les échantillons sont maintenus le plus possible à l'obscurité et sur glace en attendant l'injection des échantillons au Facscan®. La lecture de la phagocytose se fait en FL-1. Il est demandé au cytomètre de calculer les pourcentages d'ingestion (1 bille et plus et 3 billes et plus) sur 10 000 cellules.

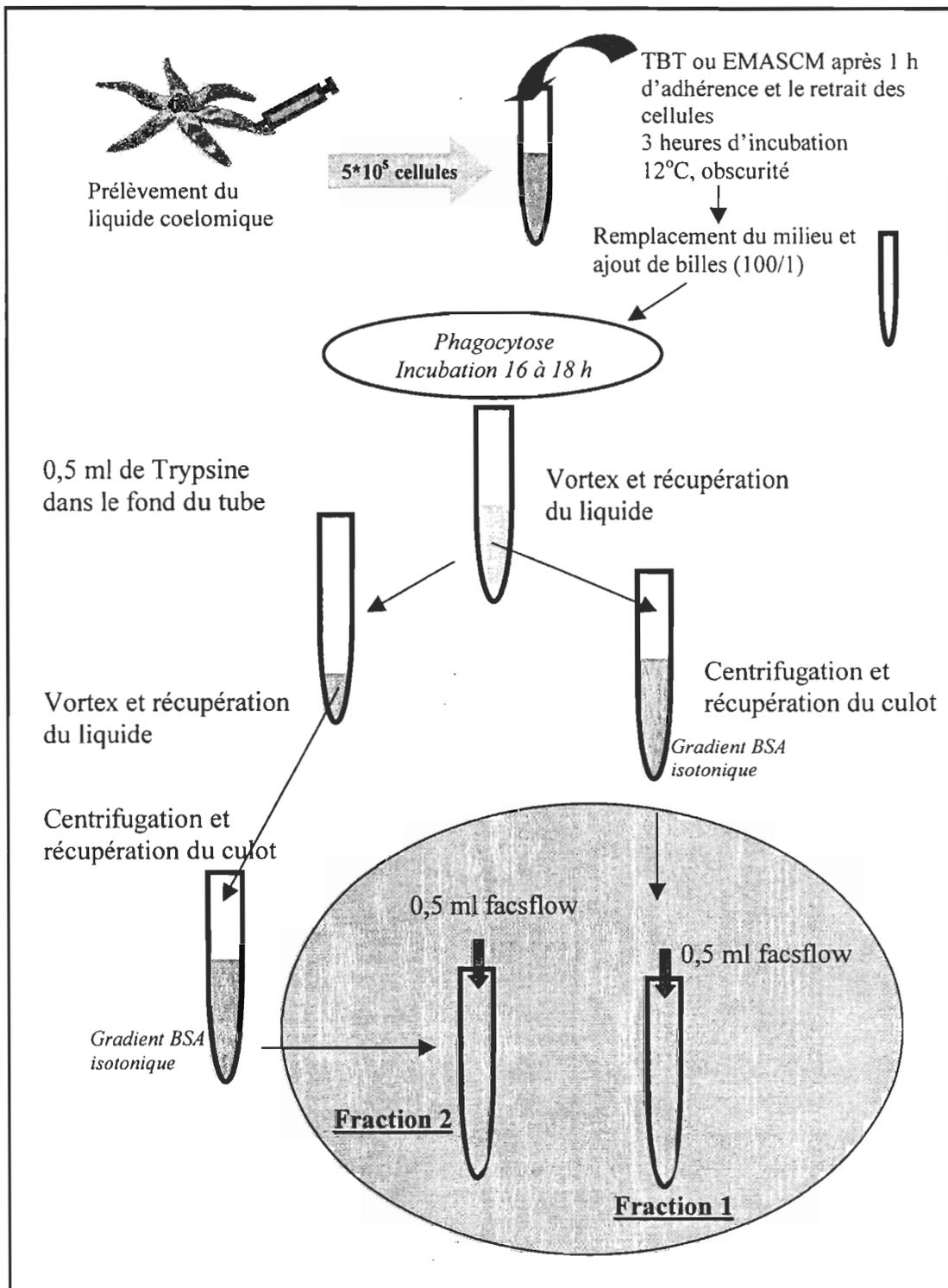


Figure 8 Schéma du protocole de la phagocytose au Facscan® en tenant compte des 2 fractions récupérées.

5. Étape C- Incorporation du TBT

Afin de répondre à l'objectif visant à mieux comprendre le comportement des cellules exposées au TBT, l'idée d'observer par méthode indirecte l'incorporation du TBT a été proposée par Pelletier et Provost (communication personnelle). Le pentahydroxyflavone (Morin) est préparé dans l'EMASCM à saturation. Le Morin seul est un composé peu fluorescent. Cependant, lorsque le Morin réagit avec un organoétain dissous dans un solvant organique, il forme un complexe très fluorescent (Arakawa *et al.* 1983). L'idée est d'exposer les cellules au Morin puisqu'il diffuse naturellement dans le cytosol. Ainsi, en exposant dans un deuxième temps les cellules au TBT, nous pouvons observer de façon indirecte son incorporation. Le liquide coelomique est utilisé à la concentration de $1 \cdot 10^6$ cellules/ml, comme pour les expériences de phagocytose en cytométrie. L'expérience s'effectue entre 10°C et 15°C . Après un temps d'adhérence d'une heure puis le retrait du surnageant, les cellules sont exposées 30 min à la solution de Morin saturée. Puis, les cellules sont lavées avec l'EMASCM (suspension et centrifugation) et exposées un temps pré-déterminé au TBT ($0.5 \mu\text{M}$). Au terme de l'exposition, elles sont une dernière fois lavées (suspension et centrifugation), puis décollées par la trypsine (0,25% en milieu isotonique).

6. Tests statistiques

Les données statistiques sont traitées avec le logiciel SYSTAT 10 pour les ANOVA et les comparaisons multiples et le logiciel SIGMASTAT 1.01 pour les tests de T et les régressions linéaires. Les graphiques et les calculs sont faits avec le logiciel EXCEL ou le logiciel SIGMAPLOT 1.01. Les analyses statistiques des données obtenues avec les expériences en microplaque et en tubes sont semblables. Les répliquas d'une même étoile pour une même concentration ne sont pas considérés comme de vrais répliquas. Il est également important de

considérer la différence immunitaire de base entre les individus. C'est pourquoi une analyse de variance à deux facteurs indépendants croisés avec réplication est choisie, dans la mesure du possible. Les 2 facteurs indépendants sont le TBT et l'individu. L'individu est considéré comme un facteur indépendant à cause du nombre de répliquas et de la forte variation observées entre les individus. Pour faire une ANOVA 2 facteurs, il ne doit pas y avoir des données manquantes. Dans le cas contraire, les étoiles de mer dont certaines données manquent seront éliminées des tests statistiques. Le nombre de répliquas se retrouve ainsi diminué. La normalité et l'homogénéité des résidus seront les conditions d'applications de l'ANOVA. Si les conditions ne sont pas respectées, l'analyse de variance est effectuée selon l'approche de Conover (1980). La probabilité présentée est celle de l'ANOVA sur les rangs si elle ne contredit pas celle de l'ANOVA sur les données brutes. Le test de comparaison multiple est le test de Tukey pour le logiciel SYSTAT et Student Newman Keuls pour le logiciel SIGMASTAT. Pour indiquer une différence significative, une probabilité doit être $<0,05$. Une probabilité entre 0.05 et 0.1 est définie comme une tendance.

RÉSULTATS

1. Observation de la condition des étoiles

Les données ont été récoltées (figure 9), pendant un an, sur des étoiles de mer choisies au hasard dans le lot qui ne s'alimentaient pas au moment du prélèvement. La concentration moyenne en amœbocytes est de 4 millions de cellules par ml sur 1 an. Il y a cependant beaucoup de variation entre les individus.

Des différences significatives sont observées entre les mois ($P < 0,001$). L'analyse *a posteriori* nous dévoile que le mois où la concentration est la plus forte (janvier 04) est différente des mois où les concentrations sont les plus basses (octobre 03, mars, mai et juillet 04). La concentration cellulaire du mois de février (deuxième concentration la plus forte) est également significativement différente du mois de juillet où la concentration cellulaire est la plus basse. Il faut cependant prendre en considération que l'analyse de variance et la comparaison des moyennes est faite sur les données exprimées en rangs alors que le graphique présente les moyennes et les écartypes sur les données brutes. La vision des données que l'on a avec le graphique ne reflète pas forcément l'analyse statistique. L'important est de constater qu'il y a des différences entre les mois. La tendance semble montrer une augmentation l'automne jusqu'à un maximum en hiver. La concentration redescendrait par la suite pour atteindre un minimum au printemps. Il se pourrait qu'une légère augmentation ait lieu en début d'été avant de diminuer pour le début de l'automne et ainsi de suite.

Il est intéressant d'ajouter une remarque descriptive : la concentration cellulaire est très variable d'une journée à l'autre pour un même organisme. Lorsqu'une étoile de mer

ponctionnée est en état d'autotomie ou fait une réaction inflammatoire, la concentration cellulaire est plus élevée. Par contre, la cause de l'augmentation de la concentration cellulaire est d'autres fois restée inconnue puisque aucun changement d'état visible n'a été observé.

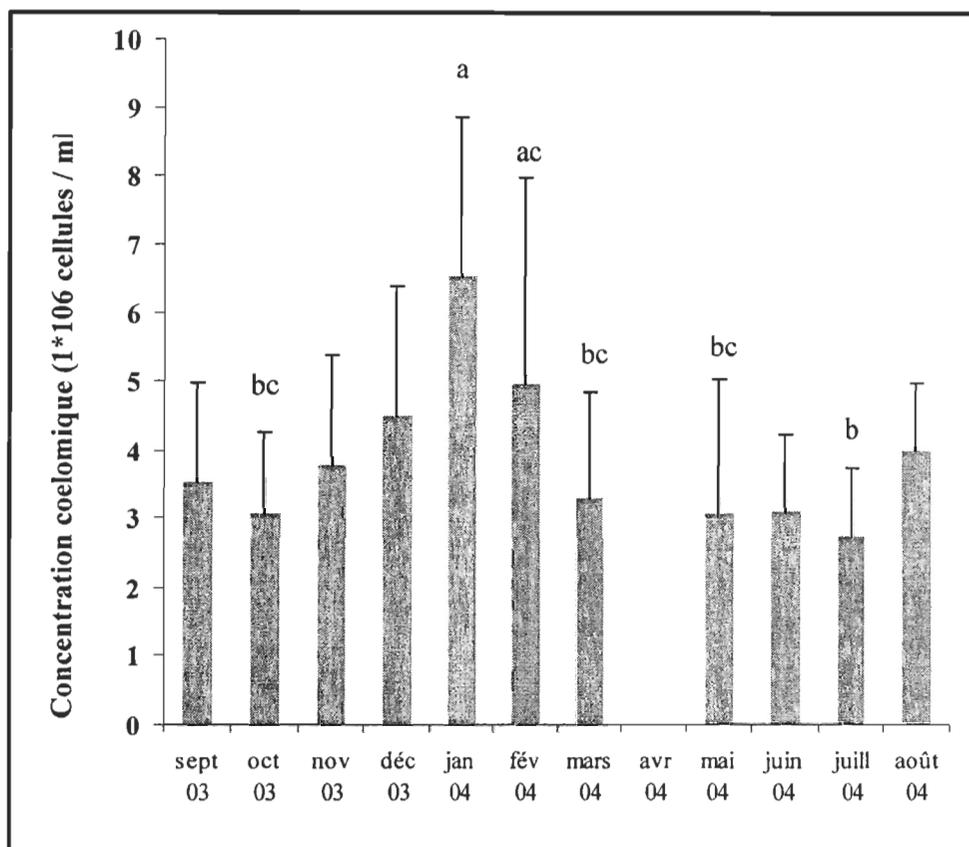


Figure 9 Concentration des amœbocytes dans le liquide cœlomique prélevé entre septembre 2003 et août 2004. Le nombre de prélèvements oscille entre 6 et 35 par mois. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,001$).

2. Mise au point des méthodes

Toutes les mises au point qui ont été jugées pertinentes et/ou importantes à l'interprétation des résultats seront présentées dans cette section. Les mises au point du dosage des protéines, du

test de VB et de PHAG en microplaque ainsi que la PHAG en cytométrie sont présentés en annexe B.

a. Adhérence cellulaire

Cette étape dans les manipulations est importante car elle permet de donner le temps aux cellules d'adhérer au fond des puits. Nous avons évalué la quantité de cellules perdues lors du retrait du milieu sans (i) et avec (ii) exposition au TBT. L'EDTA étant un inhibiteur de la phagocytose, nous avons aussi regardé différentes concentrations dans l'AG (iii) afin d'utiliser le minimum possible comme agent anti-agrégation.

i. Perte cellulaire

Après la période d'adhérence (1 h), la perte de cellules varie entre 9 et 31,5 % de la concentration initiale selon les individus lors du retrait du milieu (tableau I). Il n'y a pas de différences statistiques entre les 2 méthodes soit la microplaque ou le tube.

Étoile	Perte (%) Microplaque	Perte (%) Tube
1	16,5	22,5
2	19	21,5
3	14,5	23
4	27,5	24,5
5	8,8	19
6	31,5	16,5
Moyenne	19,6	21,2
Erreur standard	8,4	2,9

Tableau I Perte cellulaire après 1 h d'incubation en microplaque (200 000 cellules) ou en tube (500 000 cellules). Aucune différence statistique n'est observée.

ii. Avec exposition au TBT

La qualité de l'adhérence a été observée après une exposition au TBT (tableau ci-après). Il semble que la perte cellulaire augmente avec la concentration d'exposition, c'est-à-dire que l'adhérence diminue. Mais aucune différence statistique n'est observée ($P=0.08$) et seulement 3 répliquas ont été effectués.

[TBT] μM	Étoile 1 (%)	Étoile 2 (%)	Étoile 3 (%)	Moyenne	Erreur standard
0	6	4	6	4	2
0,008	6	5	2	4	2
0,08	10	7	2	6	4
0,8	10	15	2	9	7
4,2	15	13	2	10	7
8,4	13	15	19	15	3

Tableau II Effet apparent du TBT sur l'adhérence cellulaire des amœbocytes exposées *in vitro* en tube. Les résultats sont exprimés en % de perte cellulaire. Aucune différence statistique n'est observée.

iii. Concentration en EDTA

Afin de mieux comprendre le rôle de l'EDTA présent dans l'AG, plusieurs concentrations ont été essayées. Sans EDTA, l'agrégation cellulaire est immédiate et se voit à l'œil nu. Dès que la concentration en EDTA est inférieure à $2,2 \cdot 10^{-3}$ g/mL, l'agrégation cellulaire est observée au microscope. Cette concentration minimum a donc été choisie. Puisque l'EDTA est un agent perturbateur de la phagocytose (Ducusin *et al.* 2001), le milieu AG est retiré immédiatement après la période d'adhérence.

b. Température d'incubation

L'étoile de mer *L. polaris* est un organisme qui vit à des températures froides de -1°C à 12 °C. La température d'incubation de leurs amœbocytes a suscité des interrogations pour le bon fonctionnement des tests. La viabilité des cellules a donc été suivie sur une période de 24 h à 5°C et 20°C (figure 10). La VB est déterminée par une coloration au bleu trypan et un comptage à l'hémacymètre en microscopie. Les données sur l'incubation à 12°C proviennent d'une autre expérience comparant la viabilité des cellules pour une incubation à 5°C et à 12°C. Le protocole expérimental est cependant exactement le même.

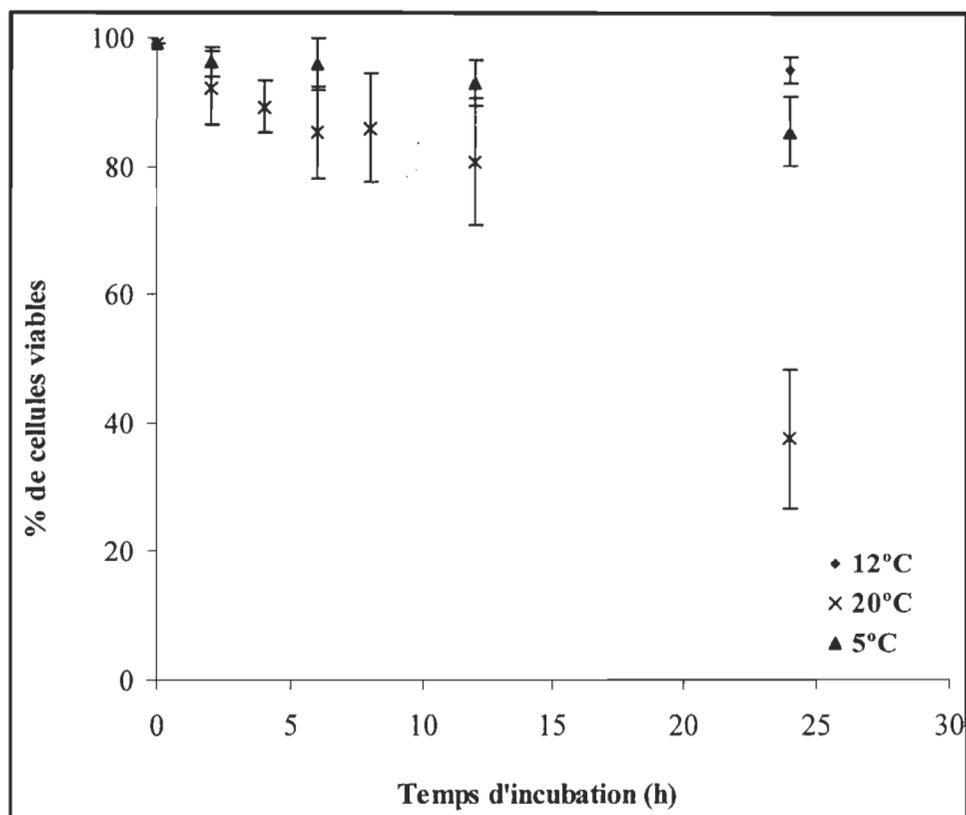


Figure 10 Effet de la température selon le temps d'incubation sur la viabilité cellulaire des amœbocytes de *L. polaris*. L'expérience est réalisée avec 3 organismes, 2 répliquas par organisme (1×10^6 cellules/ml dans 0,25 ml EMASCM).

Pour une température d'incubation de 20°C, la mortalité augmente fortement après 12h (perte de 20%). Alors qu'elle reste stable pour une température de 5°C et de 12°C même après 24h. La variabilité (écartype) semble même plus faible à 5°C et 12°C qu'à 20°C. Pour la suite des expériences, la température d'incubation choisie est 12°C afin de faciliter les manipulations. D'une part, Chia et Xing (1996) et Bertheussen (1981a et b) mentionnent que l'activité des cellules immunitaires des échinodermes est optimale entre 10°C et 15°C. D'autre part, les manipulations sont plus faciles à 12°C car même en travaillant sur glace, il est difficile de maintenir la température d'incubation stable à 4°C lors des changements de milieu pour la phagocytose.

c. La récupération cellulaire

L'adhérence cellulaire est une caractéristique intéressante permettant de changer de milieu extracellulaire sans perdre de cellules. Par contre, cela suscite des interrogations sur les résultats de phagocytose que nous observons. Les cellules très adhérentes participent-elles à la phagocytose et à quel point ? Nous avons donc voulu comprendre en séparant les cellules en deux fractions. La première est décollée mécaniquement en agitant le tube à la main. La deuxième fraction est la fraction de cellules récupérées grâce à la trypsine (0,25 %) (Figure 11).

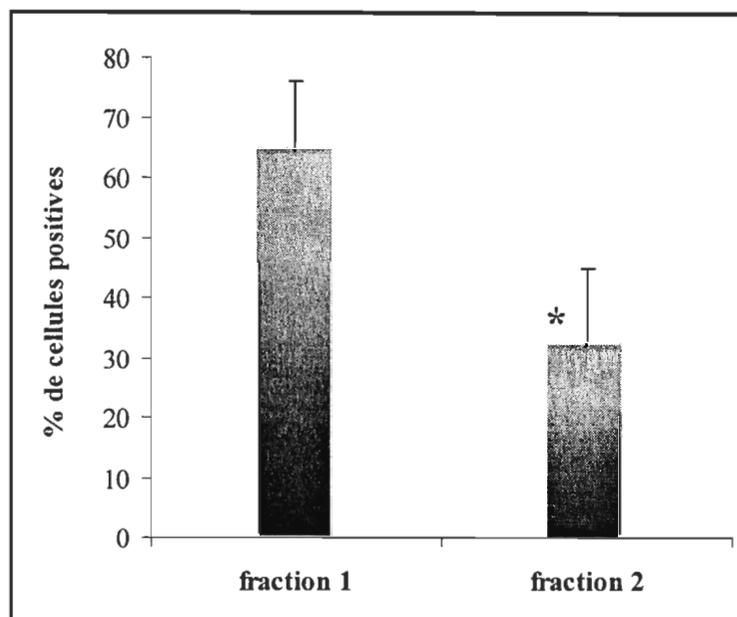


Figure 11 Phagocytose des cellules décollées mécaniquement (fraction 1) et décollées par la trypsine (fraction 2) d'un groupe de 6 étoiles de mer. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocytés au moins 1 bille. L'étoile indique une différence significative entre les deux groupes ($P=0,0005$).

Les cellules récupérées dans la fraction 2 participent significativement moins à la phagocytose que les cellules récupérées en premier ($P=0,0005$). Dans le protocole final, la trypsine est utilisée pour décoller les cellules et obtenir la fraction de cellules très adhérentes afin d'obtenir une information supplémentaire sur l'effet du TBT.

Pour mieux représenter les types de résultats obtenus avec les deux fractions de cellules, les diagrammes et les histogrammes correspondants sont présentés aux figures 12, 13 et 14. Le diagramme à la figure 12 présente les différents types cellulaires retrouvés dans le liquide cœlomique de *L. polaris* lors de la lecture de la phagocytose. Ce genre de diagramme permet de choisir la catégorie de cellules dont on veut obtenir les résultats de phagocytose (figure 13). Ainsi, une seule population cellulaire est présente dans le liquide cœlomique (ellipse de droite à la figure 12). L'ellipse de gauche de cette même figure représente probablement des

débris cellulaires et ont une fluorescence minimale. La fluorescence des débris a été retirée des graphiques en histogramme de la phagocytose (figures 13 et 14).

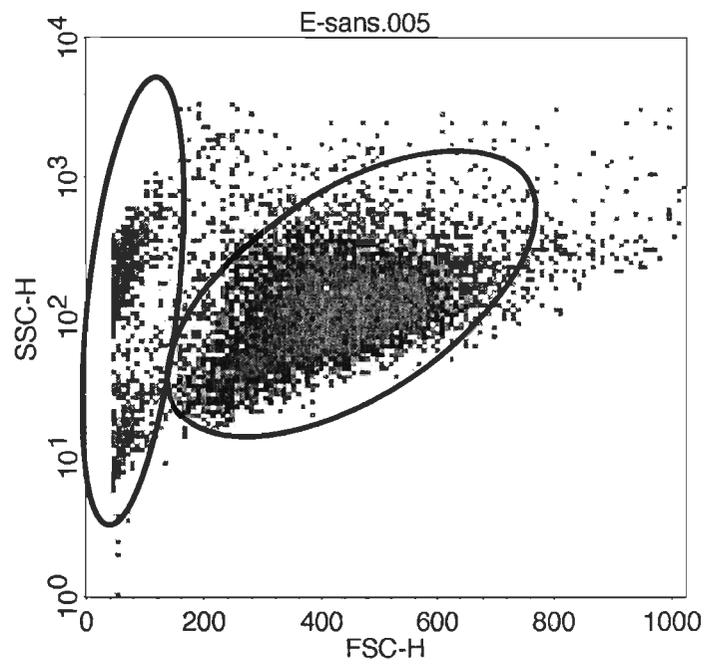


Figure 12 Diagramme à point de la complexité relative des cellules (SSC-H) et de la taille relative (FSC-H) obtenu en cytométrie en flux lors d'une analyse de phagocytose pour des amœbocytes d'étoiles de mer. Les cellules font parties de la première fraction cellulaire de la suspension. Les ellipses représentent les différentes catégories de cellules.

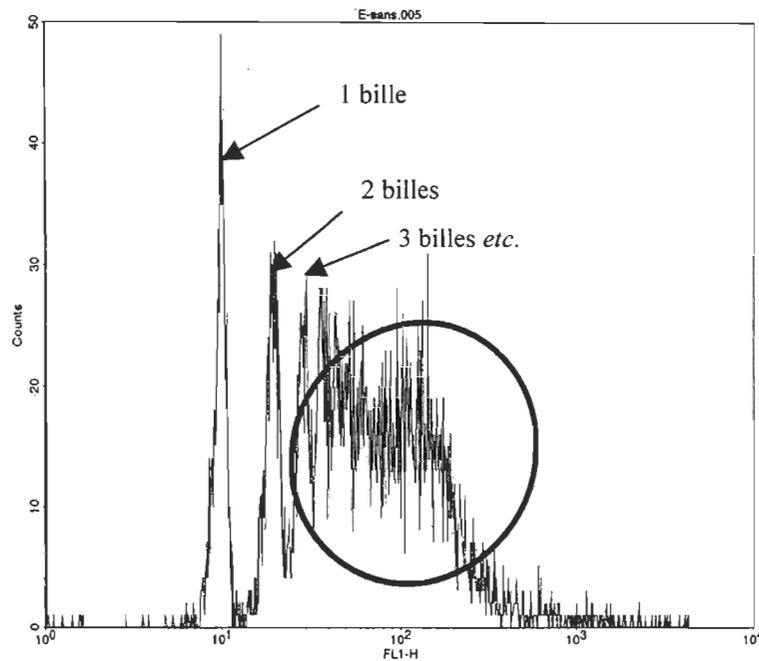


Figure 13 Histogramme de la phagocytose des amœbocytes de la fraction 1. Les cellules sont décollées mécaniquement. Les pics correspondent au nombre de billes d'ingérées, de gauche à droite.

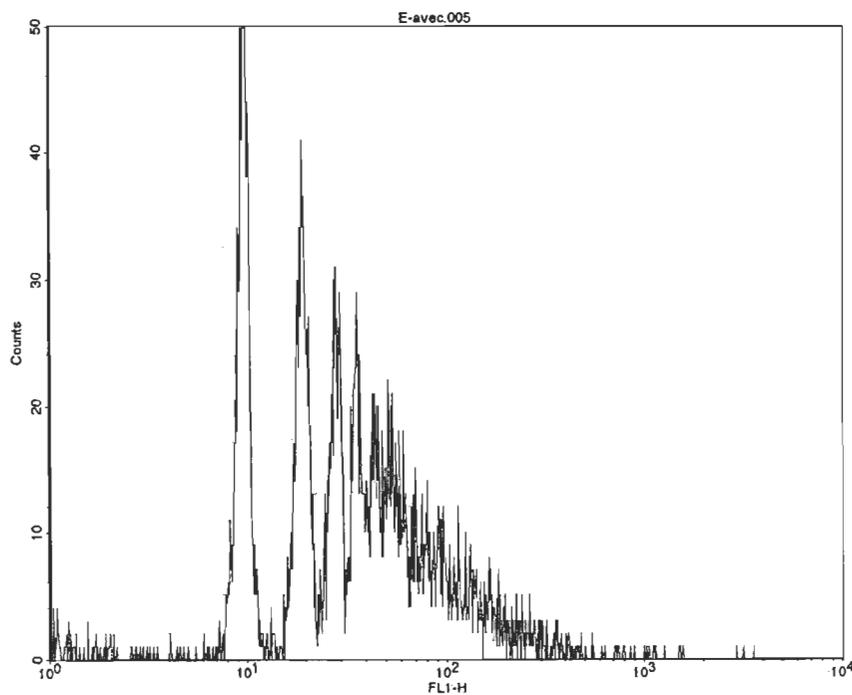


Figure 14 Histogramme la phagocytose des amœbocytes de la fraction 2. Les cellules sont décollées à la trypsine après le retrait de la première fraction.

Cependant, une agglomération est toujours présente dans l'histogramme présentant la phagocytose des cellules de la fraction 1 à la figure 13 (cercle noir). L'observation microscopique de la suspension cellules-billes permet de constater que les billes ont formé des paquets et que beaucoup sont adsorbées aux parois cellulaires. Réduire le ratio de billes n'améliore pas la qualité des résultats obtenus. De plus, la fraction deux s'observe difficilement lorsque le ratio de billes est plus bas.

L'histogramme de la phagocytose des cellules de la fraction 2 présente des pics très nets (figure 14), contrairement aux résultats obtenus avec la fraction 1 (figure 13).

d. Pré-test sur l'incorporation du TBT

Afin de s'assurer que le Morin n'est pas toxique pour les amœbocytes de *L. polaris*, la viabilité cellulaire a été mesurée par exclusion au bleu trypan. Pour ce faire, 5×10^5 amœbocytes ont été exposés *in vitro* au Morin (20% de solution saturée) dans des tubes à Facscan pendant 1 h à 12°C, à l'obscurité (figure 15).

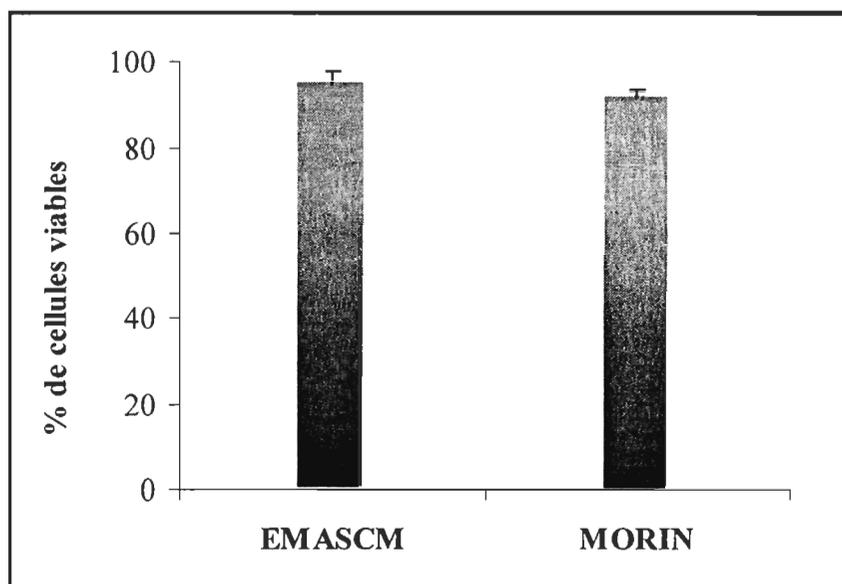


Figure 15 Absence de l'effet du Morin sur la viabilité cellulaire des amœbocytes. L'expérience a été réalisée sur 4 étoiles de mer. Aucune différence significative entre les 2 groupes n'a été relevée ($P=0,08$).

Le Morin en solution dans l'eau de mer n'est significativement pas toxique ($P=0,08$) pour une concentration de 20% ou moins. Bien que les résultats du test statistique soient à utiliser avec précaution (pouvoir du test 0,3/0,8), nous pouvons considérer que le Morin est non toxique dans la gamme de concentration ($<20\%$) et la durée d'exposition (30 min) choisies pour la suite des expériences.

3. Résultats obtenus

a. VB en microplaque

i. Effets et statistiques

Les résultats de la viabilité cellulaire après l'exposition au TBT sont présentés à la figure 16. L'expérience a été répétée 2 fois afin de vérifier la reproductibilité des méthodes.

Les résultats de viabilité cellulaire de l'expérience 1 et de l'expérience 2 ont un ordre de grandeur de différence. Pour l'expérience 1, le TBT a un effet inversement proportionnel sur la viabilité des cellules ($P=0.000$, $R^2=0,814$). L'effet de l'individu est significatif sur la viabilité des cellules ($P=0.000$) et il y a interaction entre les 2 facteurs, soit l'individu et le TBT, sur la viabilité de la cellule ($P=0.000$). Pour l'expérience 2, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les groupes. Pourtant, le seul écart entre les 2 expériences est un décalage temporel. L'expérience 2 a été effectuée 3 jours plus tard, avec des concentrations d'exposition différentes afin de pouvoir calculer une EC50 avec un intervalle de concentration d'exposition plus grand. Aucune différence de température, de problème avec l'eau, de turbidité excessive dans les aquariums n'a été notée entre ces 2 journées. De plus, l'étoile 1 de l'expérience 1 ne correspond pas à l'étoile 1 de l'expérience 2. Les résultats doivent donc être interprétés en fonction du groupe d'individus et non en fonction d'un échantillonnage répété sur les mêmes astéries puisque les étoiles de mer sont choisies au hasard.

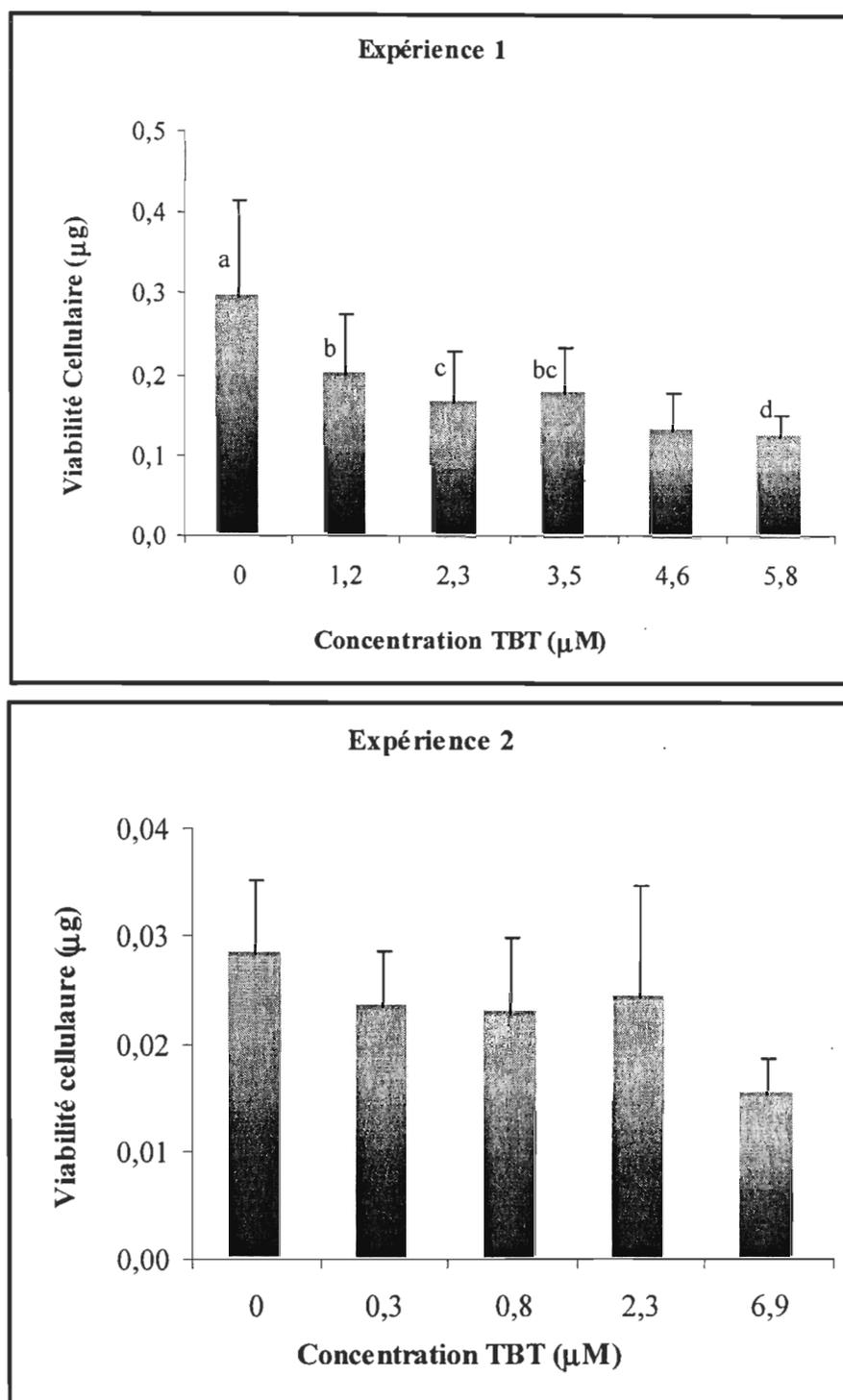


Figure 16 Effet du TBT sur la viabilité cellulaire des amoebocytes de *L. polaris*. La VB est calculée selon la métabolisation du FDA par rapport à la quantité intracellulaire de protéines. Les résultats sont calculés en fonction de 50 μg de protéines. Les lettres différentes indiquent des différences significatives.

La figure 17 illustre la variabilité de la méthode d'une journée à l'autre. Il s'agit des données du témoin pour 3 expériences espacées de 48 h chacune. Le protocole est exactement le même.

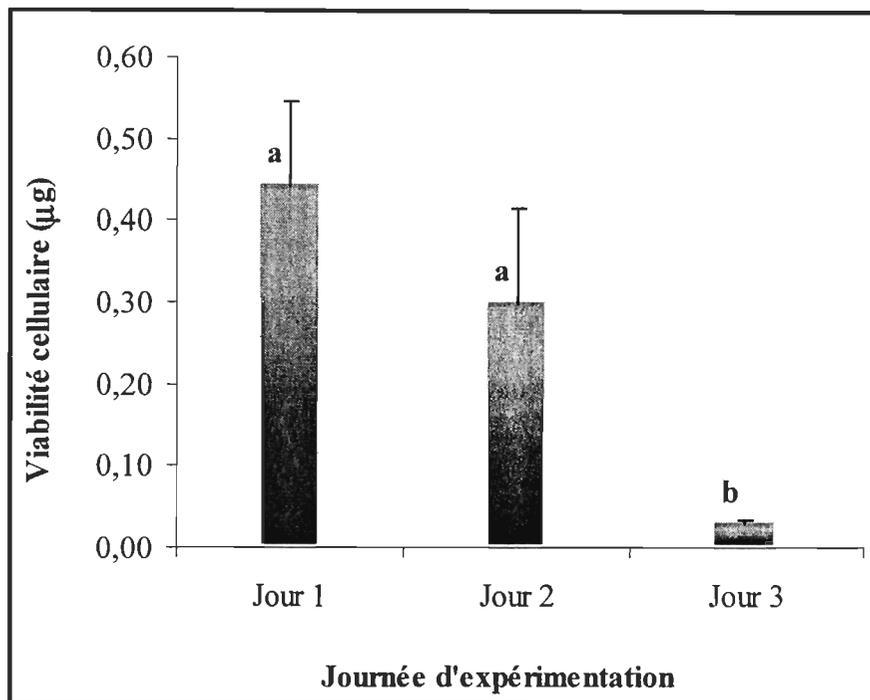


Figure 17 Test de viabilité cellulaire des amœbocytes de *L. polaris*. La VB est calculée selon la métabolisation du FDA par rapport à la quantité intracellulaire de protéines. Les résultats sont calculés en fonction de 50 µg de protéines. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (n=3).

La reproductibilité de la méthode n'est pas démontrée et nous observons des différences significatives sur la viabilité de base des amœbocytes ($P=0.0034$). C'est directement la donnée de fluorescence (RFU) en microplaque qui est différente. Les valeurs de la fluorescence correspondant à la courbe standard ne diffèrent pas entre ces 3 journées.

ii. CE50

Les résultats sont aussi présentés en pourcentage de VB par rapport au témoin. Les données des 2 expériences (figure 16) ont été compilées et présentées à la figure 18. Une régression linéaire permet de montrer une relation inversement proportionnelle entre le TBT (entre 0 et 5 μM) et la viabilité cellulaire.

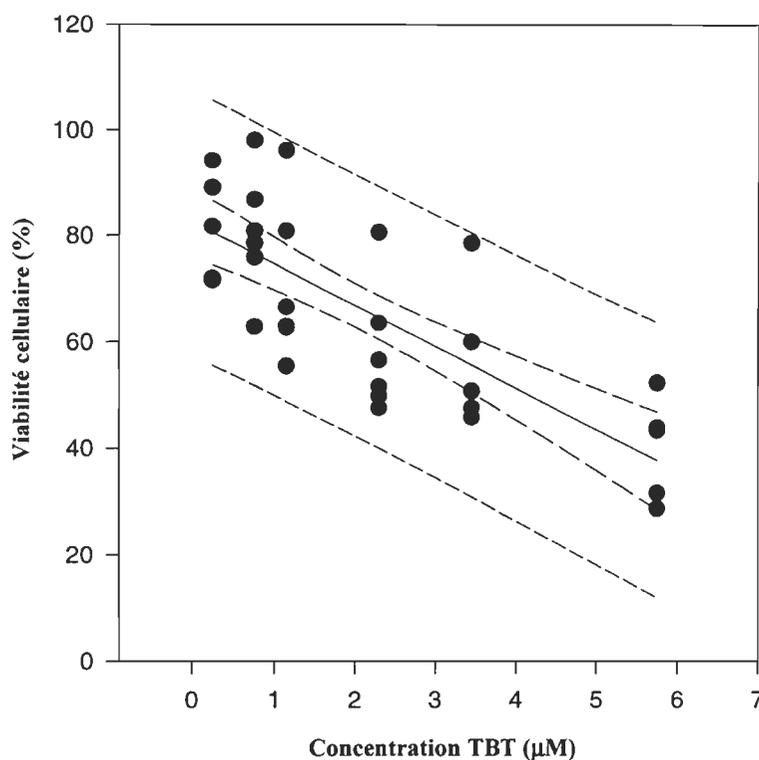


Figure 18 Effet du TBT sur la viabilité cellulaire des amœbocytes de *L. polaris* exposées *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la réponse du témoin ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,589$). L'équation de la droite est $VB = - 7,80 * [TBT] + 82,5$.

L'équation de la droite issue de la régression linéaire est utilisée pour le calcul de la CE50. Cette valeur est la concentration de TBT pour laquelle une perte cellulaire de 50 %

est engendrée, selon les conditions d'expériences que nous avons définies. Cette valeur, 4,2 μM , permet de se rendre compte de la toxicité du TBT et ainsi de pouvoir comparer les résultats avec d'autres études.

b. Phagocytose en microplaque

Pour l'étude de la phagocytose en microplaque, nous tenons à faire le rapport sur le témoin afin d'éliminer un maximum d'artefacts dues aux manipulations ou aux conditions expérimentales. C'est pourquoi, pour obtenir la valeur témoin, la moyenne des puits témoins est effectuée (6 pseudo répliquas) et le rapport pour chaque puit est fait sur cette moyenne. Pour les autres traitements, chaque valeur par puits est également rapportée sur la valeur témoin moyenne des puits correspondants. Les résultats sont présentés à la figure 19.

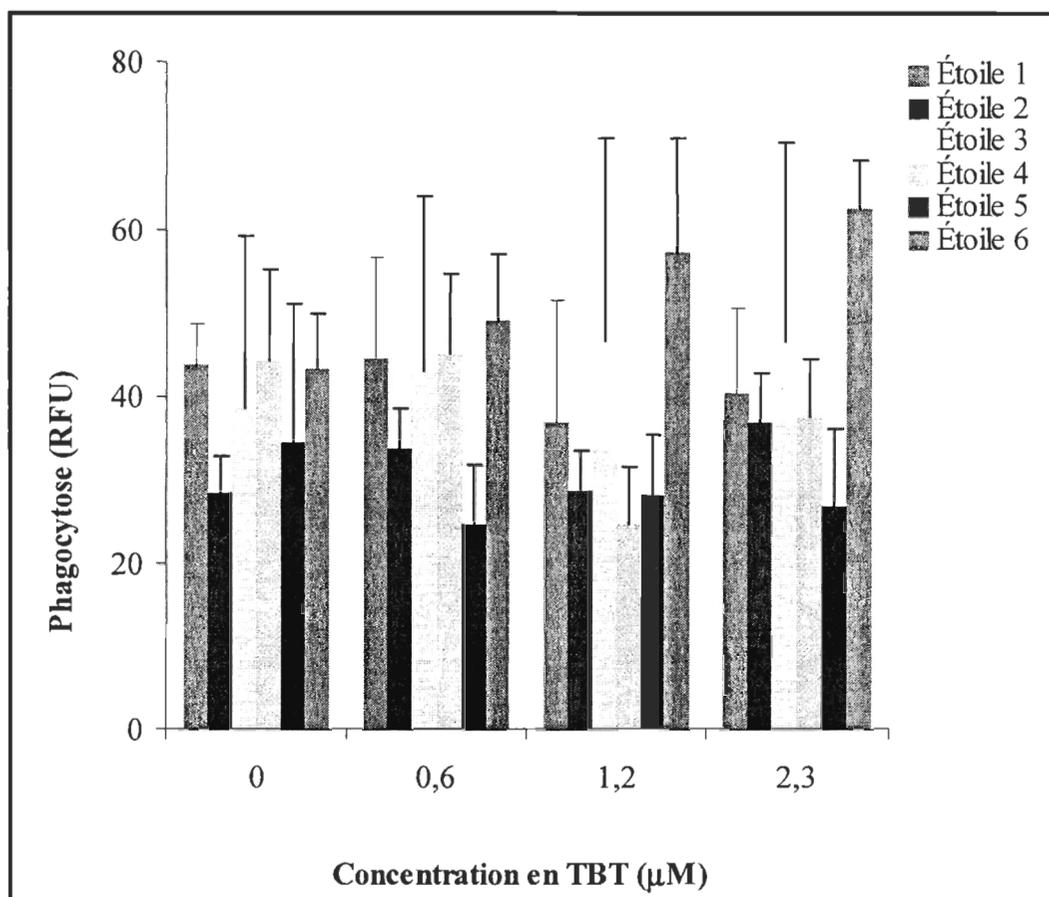


Figure 19 Effet du TBT sur la phagocytose des amœbocytes de *L. polaris* exposées *in vitro* au $TBTCl_2$ (3h) à 12°C à l'obscurité (n=6).

Les données par étoile de mer sont présentées ici. Cela permet de montrer la grande variation de réponses par individu. Aucune tendance n'est observée et la réaction au TBT est différente d'une astérie à l'autre. L'expérience a été répétée plusieurs fois par la suite et les mêmes résultats ont alors été obtenus.

c. Phagocytose en cytométrie

Dans cette section, les résultats de la viabilité cellulaire et la phagocytose des amœbocytes exposées au TBT sont présentés selon les méthodes de détermination au bleu trypan et en cytométrie en flux, respectivement. Ainsi, les résultats présentés dans toute cette section sont obtenus à partir des mêmes 6 étoiles de mer.

i. Viabilité des cellules

La viabilité des cellules est très élevée pour les catégories témoins et 2 μM de TBT (>90%) (figure 20). L'analyse statistique démontre une tendance entre les groupes d'exposition grâce à l'ANOVA ($P=0,015$). Si l'on pousse une analyse *a posteriori* de Student-Newman-Keul, la différence se situe entre le témoin et le groupe de cellules exposées à 4,6 μM . Malgré cette légère diminution pour l'exposition à 4,6 μM , les valeurs de viabilité cellulaire restent très fortes (>80%). Donc, selon le test au bleu trypan, nous sommes assurés d'avoir assez de cellules pour la suite des expériences.

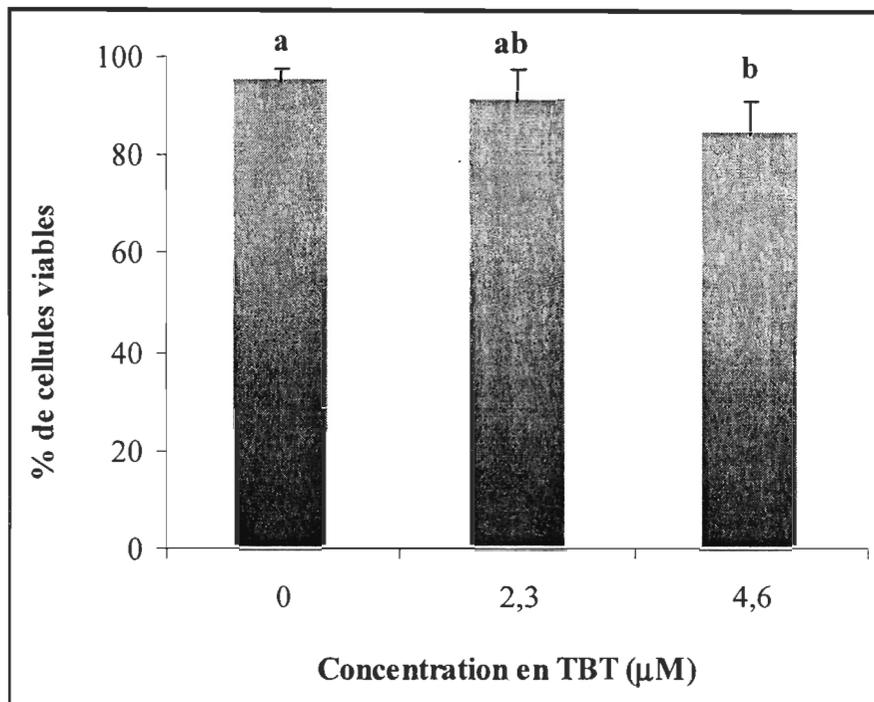


Figure 20 Effet du TBT sur la VB des amœbocytes exposées *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes à la fin de l'expérience. Les lettres différentes indiquent une tendance ($P=0.015$) ($n=6$).

ii. La fraction 1 des amœbocytes

✓ Cellules ayant ingéré plus d'une bille

L'effet du TBT sur la première fraction cellulaire récupérée est présenté à la figure 21.

Pour la catégorie témoin, une variabilité entre les individus est observée : les étoiles de mer ont un niveau de phagocytose de base différent les unes des autres.

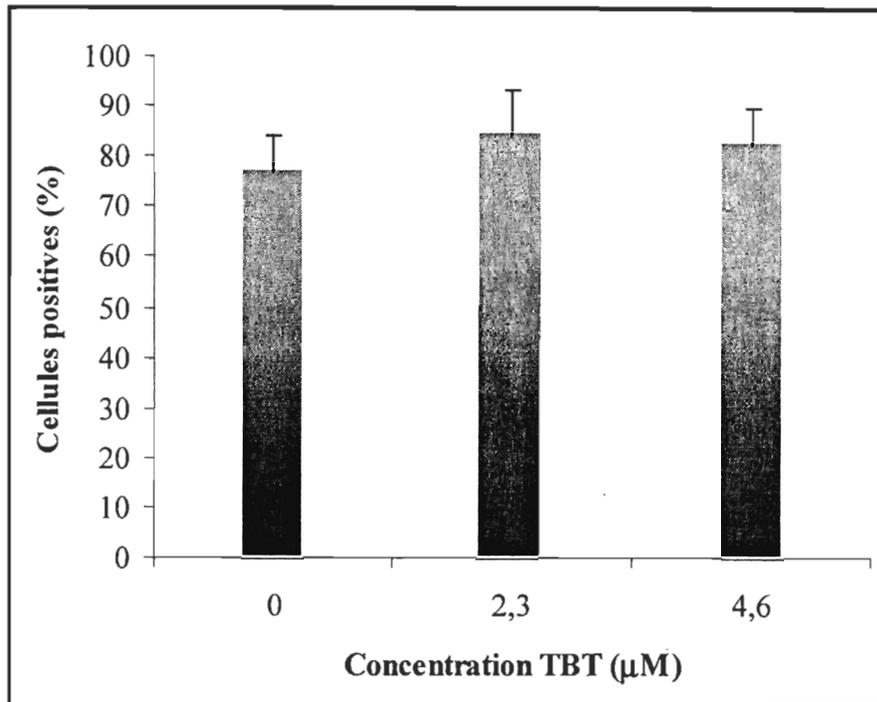


Figure 21 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 1 des amœbocytes exposées *in vitro*. La variation sur un même individu est inférieure à 10%. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes de *L. polaris* ayant phagocyté au moins 1 bille. Aucune différence significative ne ressort ($n=6$).

Le TBT n'a pas d'effet significatif sur la phagocytose ($P = 0.06$) de ce groupe d'individus. Par contre, le facteur individuel agit de façon significative sur cette activité cellulaire ($P = 0.000$). Il y a aussi interaction entre les 2 facteurs ($P = 0.002$). En effet, le TBT ($2,3 \mu\text{M}$) agit différemment sur la phagocytose, dépendamment de l'individu. C'est-à-dire que, dans la catégorie d'exposition à $2,3 \mu\text{M}$, il y a des différences de phagocytose significatives entre les individus. De plus, pour certaines astéries, la phagocytose tend, semble-t-il, à être stimulée. Dans la catégorie d'exposition à $4,6 \mu\text{M}$, peu de changement est observé par rapport au témoin pour l'ensemble des étoiles de mer. Pourtant, les cellules commencent à mourir à partir de ce niveau d'exposition.

✓ Cellules ayant ingéré plus de trois billes

La même tendance est soulignée avec les cellules qui phagocytent plus de 3 billes (figure 22). Le facteur individu a une action significative sur la phagocytose ($P=0.000$) et les deux facteurs interagissent significativement l'un envers l'autre ($P=0.007$). Le TBT a également une tendance significative ($P=0.056$) sur la phagocytose de plus de 3 billes. C'est le groupe d'exposition à $2,3 \mu\text{M}$ qui est différent du groupe témoin ($P=0,000$) et du groupe d'exposition à $4,6 \mu\text{M}$ ($P=0,035$). C'est à dire qu'une exposition à $2,3 \mu\text{M}$ semble stimuler la phagocytose de plus de 3 billes chez les cellules de la fraction 1. Il est important d'ajouter que l'histogramme de la phagocytose des cellules de la fraction 1 n'est pas très net. Il persiste toujours un amas de pics indéfinis après les premiers pics. De plus, la variabilité de réponses entre les étoiles de mer est toujours présente pour un même niveau d'exposition.

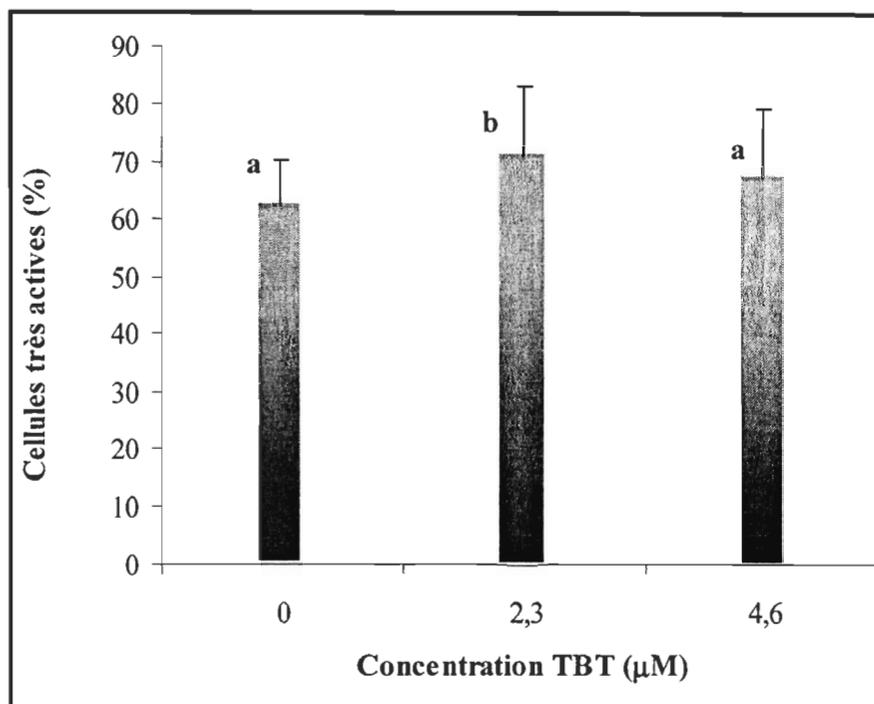


Figure 22 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 1 des amœbocytes exposées *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes. Les lettres différentes indiquent des tendances significatives (n=6)

iii. La fraction 2 des amœbocytes

✓ Cellules ayant ingéré plus d'une bille

Comme dans les résultats préliminaires, la deuxième fraction présente des pics très nets. Les fractions de seulement 4 individus ont été récupérées, au lieu de 6, à cause d'une erreur de manipulation. Les facteurs TBT ($P=0,058$) et individu ($P=0,000$) ont un effet significatif sur la phagocytose du groupe de 4 étoiles de mer. Nous observons également une interaction entre les 2 facteurs ($P=0,023$). Les groupes d'exposition à 2,3 µM ($P = 0.011$) et à 4,6 µM ($P = 0.00$) sont significativement différents du groupe témoin de 4 étoiles de mer. Le TBT inhibe la phagocytose de plus de 1 bille dès une exposition à 2,3 µM des cellules très adhérentes (figure 23).

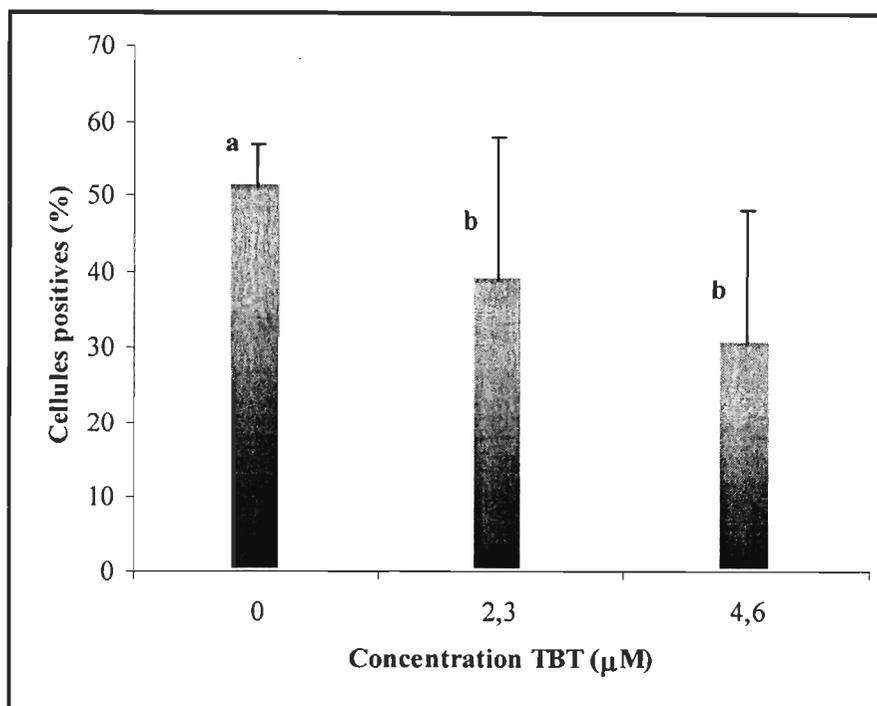


Figure 23 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 2 des amœbocytes exposées *in vitro*. La variation est inférieure à 20%. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes ayant phagocyté au moins 1 bille. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (n = 4).

✓ Cellules ayant ingéré plus de 3 billes

Parmi les cellules récupérées dans la deuxième fraction, la même tendance est observée pour les cellules très actives (figure 24). Le TBT (P=0,045) et le facteur individuel (P=0,000) ont un effet significatif sur la phagocytose de plus de 3 billes chez les cellules très adhérentes. Nous trouvons également une interaction entre ces 2 facteurs (P=0.018). Une exposition à 2,3 µM (P=0,002) et à 4,6 µM (P=0,000) provoque une diminution de la phagocytose de plus de 3 billes de ces cellules. La variabilité de réponses entre les individus est encore une fois très marquée.

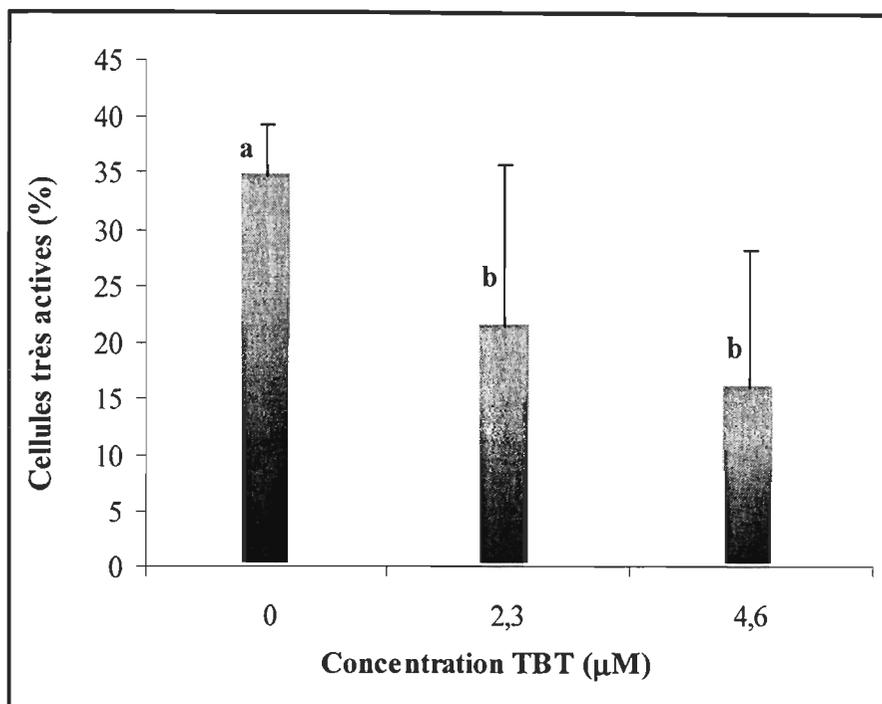


Figure 24 Effet du TBT sur la phagocytose moyenne de la fraction 2 des amœbocytes exposées *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amœbocytes ayant phagocyté au moins 3 billes. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (n = 4).

d. Incorporation du TBT

Afin de mieux comprendre ce test et son interprétation, 3 paramètres sont évalués : (i) le temps d'exposition au TBT, (ii) la concentration d'exposition au Morin, et (iii) la concentration d'exposition au TBT. Aucun traitement statistique n'a été effectué par manque de répliqua. Les résultats sont descriptifs. Les valeurs de fluorescence sont relatives et dépendent des réglages de l'appareil. Nous avons choisies la valeur moyenne de fluorescence pour exprimer les résultats de l'incorporation du TBT. Les valeurs de fluorescence médiane et moyenne étaient semblables.

i. Temps d'exposition au TBT

Les résultats de la figure 25 présente l'incorporation du TBT en fonction du temps d'exposition. La fluorescence augmente chez les cellules après un traitement au Morin, il possède donc bien une fluorescence de base. Avec une augmentation de l'incorporation du TBT dans la cellule, nous attendons une augmentation marquée de la fluorescence. Or, ce n'est pas ce que nous observons. De plus, les cellules restent viables pendant toute la durée des manipulations, selon la coloration au bleu trypan.

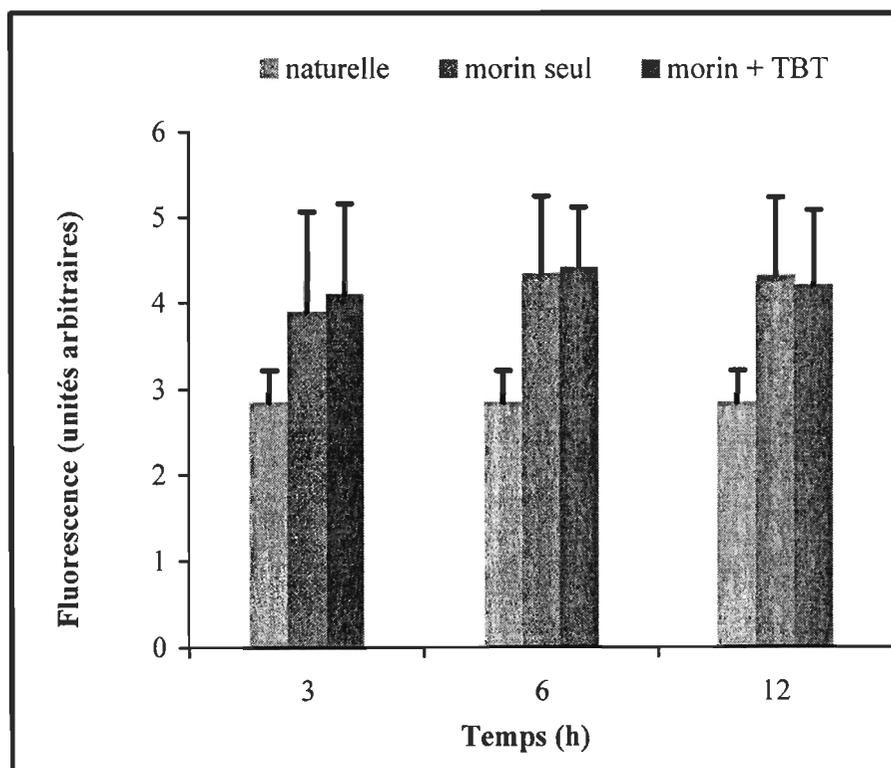


Figure 25 Effet du temps sur l'incorporation du TBT ($0,5 \mu\text{M}$) dans les amœbocytes de l'étoile de mer *L. polaris* ($n=3$). Les cellules sont préalablement traitées à une solution de Morin saturée (1/100). Les cellules sont par la suite exposées soit au TBT soit à l'EMASCM. Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.

ii. Variation de la concentration d'exposition au Morin

La figure 26 présente la variation de la concentration d'exposition au Morin (prétraitement cellulaire) sur l'incorporation du TBT. Plus la fluorescence augmente, plus il y a formation du complexe TBT-Morin. Rappelons que le complexe du TBT lié au Morin devrait faire augmenter la fluorescence.

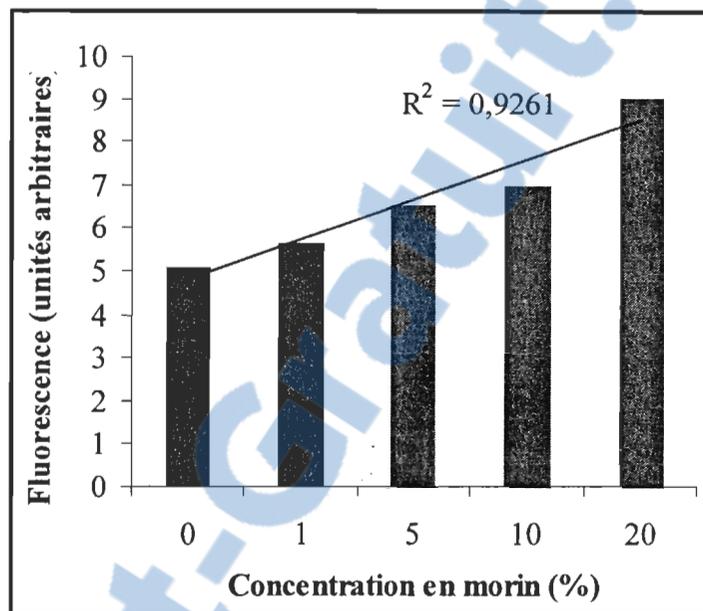


Figure 26 Effet de la concentration d'exposition au Morin (solution saturée) sur l'incorporation du TBT (0,5 μ M, 3 heures) dans l'amœbocyte de l'étoile de mer *L. polaris* (n=2). Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.

La fluorescence semble augmenter avec la concentration de Morin appliquée sur la cellule. Cela signifie que le TBT intracellulaire pourrait augmenter (figures 26 et 27) lorsque l'on augmente la quantité de Morin disponible. Il est cependant clair que l'augmentation est faible si l'on s'attarde à l'échelle de grandeur (figure 26). De plus, l'augmentation linéaire de la fluorescence observée ($R^2=0.926$, à titre indicatif seulement) pourrait être simplement due à l'augmentation de la quantité de Morin à l'intérieur de la

cellule puisqu'il est lui-même fluorescent. La viabilité cellulaire a été vérifiée à la coloration au bleu trypan et elle se maintient au dessus de 95% pour toutes les manipulations.

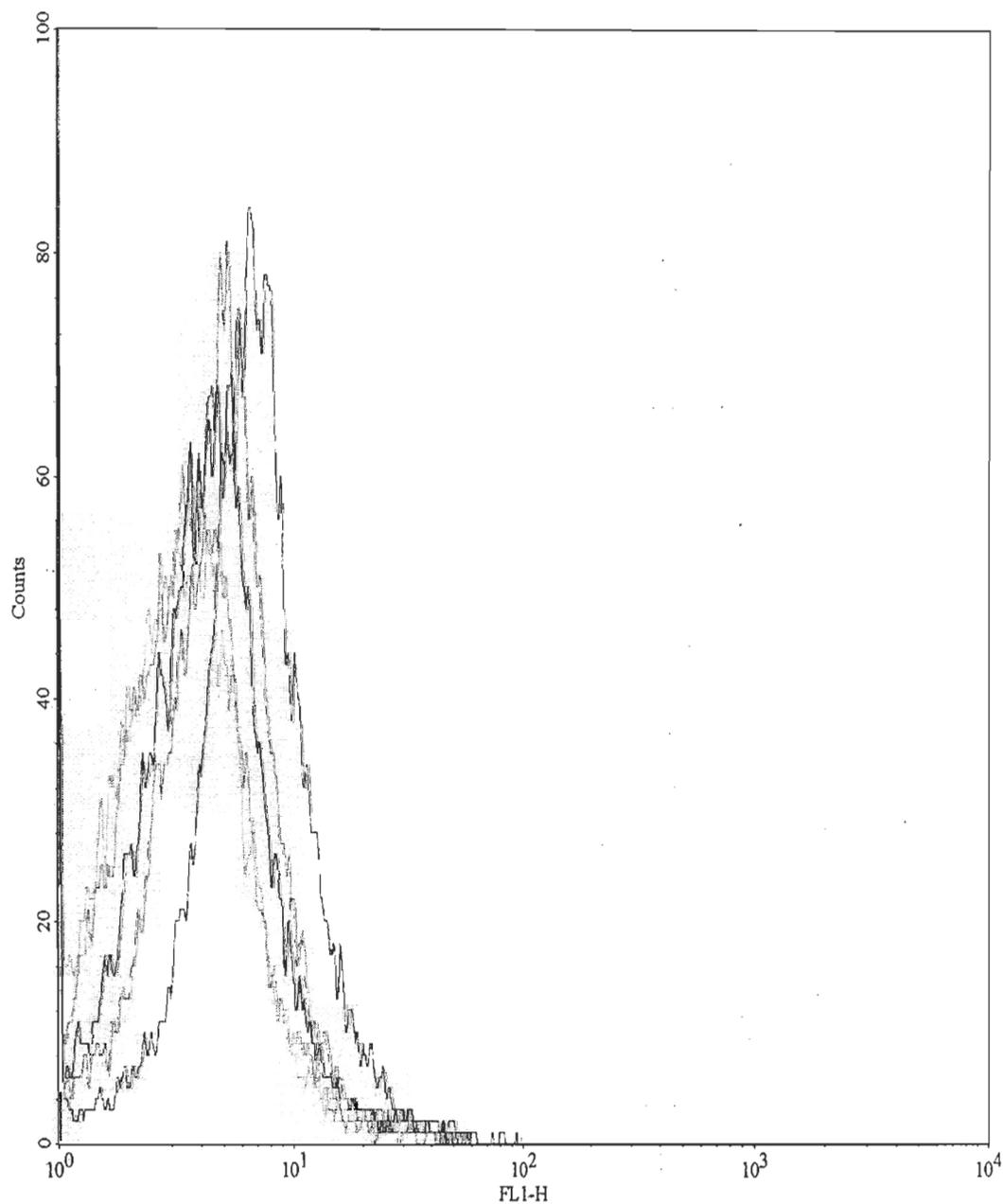


Figure 27 Histogramme de l'incorporation du TBT ($0,5 \mu\text{M}$ pendant 3 h) dans la cellule amœbocyte de l'étoile de mer *L. polaris*. Les cellules sont préalablement exposées au Morin selon des concentrations différentes (gris = 0, turquoise = 1, rouge = 5, mauve = 10 et vert = 20).

iii. Variation de la concentration en TBT

En augmentant la concentration en TBT, la fluorescence ne semble pas suivre de tendance marquée (figure 28). Selon l'hypothèse de départ, plus on augmente la concentration en TBT, plus on augmente la possibilité de liaison entre le TBT et le Morin dans la cellule.

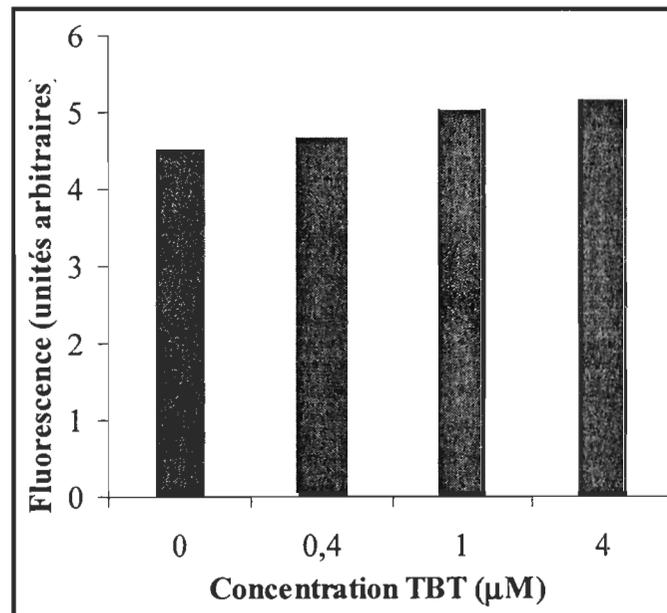


Figure 28 Effet de la concentration en TBT sur son incorporation dans la cellule amœbocyte de *L. polaris* ($n=2$). L'exposition au TBT est de 3h. Les résultats sont exprimés en fluorescence moyenne.

DISCUSSION

1. La réponse au toxique

a. La viabilité cellulaire

i. Résistance des amœbocytes de l'étoile de mer polaire au TBT

Les amœbocytes de *L. polaris* sont très résistantes au TBT puisqu'il faut une exposition de 4,6 μM de TBT pendant 3 h pour provoquer de 20 à 50 % de mortalité mesurée par la capacité de métabolisation du FDA. Pourtant, le TBT est considéré comme cytotoxique à des concentrations beaucoup plus faibles. Par exemple, sur des thymocytes de rat, une exposition *in vitro* de 0,1 μM de TBT pendant 3 h est suffisante pour induire la mort par apoptose (Nakata *et al.* 1999). Ces auteurs démontrent que le TBT provoque une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} qui induirait l'entrée en apoptose. Dans un milieu sans calcium, la réponse au TBT est en effet moindre. Au contraire, dans un milieu saturé en calcium et sans exposition au TBT, il y a induction de l'apoptose (Nakata *et al.* 1999). Ces auteurs proposent également que le TBT ait une action directe sur la membrane cytoplasmique, indépendamment du Ca^{2+} . La démonstration de l'atteinte directe du TBT sur la membrane cellulaire n'est, cependant, toujours pas évidente. Par contre, la réaction en chaîne qu'il engendre semble établie : une augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant une perturbation de l'homéostasie du calcium, qui induirait l'apoptose (Nakata *et al.* 1999). Afin de compléter notre compréhension du comportement des amœbocytes sous le stress d'une exposition au TBT, il serait intéressant d'étudier la mort cellulaire programmée et son induction.

ii. L'évaluation de la viabilité de la cellule : une approche double pour une meilleure évaluation

Indépendamment de notre conclusion précédente, il faut mentionner que la méthode au bleu trypan semble surestimer la viabilité cellulaire par rapport à la méthode de la fluorescéine. En effet, une exposition cellulaire de 4,6 μM de TBT pendant 3 h, provoque une mortalité de 20 % selon les résultats obtenus par la méthode au bleu trypan et de 50% selon la méthode de la fluorescéine. Le principe de détermination des cellules mortes au bleu trypan est une méthode très simple à utiliser (Tennant 1964). Pourtant, Jones et Senft (1985) sont d'avis que la méthode à la fluorescéine est plus réaliste car elle utilise le décompte des cellules en vie et non des cellules mortes comme la méthode au bleu trypan. Ainsi, des cellules pourraient ne pas incorporer ce colorant sans pour autant être viable selon la méthode de fluorescéine pour laquelle les estérases doivent être fonctionnelles. De plus, il est vrai que la méthode au bleu trypan peut être subjective due à l'interprétation de la coloration de la cellule au microscope (Altman *et al.* 1993). Ces auteurs ont également conclu que la méthode au bleu trypan entraînait une sous estimation des valeurs de toxicité. Cependant, ils montraient que la méthode à la fluorescéine comportait également des biais. En effet, le FDA semble pouvoir être clivé en fluorescéine par des résidus d'estérases de cellules non viables. Altman *et al.* (1993) proposent de combiner les tests avec le FDA et l'iodure de propidium, en microscopie en fluorescence puisque l'un se base sur les cellules viables et l'autre, sur les cellules non viables. Pour résumer, il nous semble intéressant d'utiliser l'approche double qui consiste à faire le compte des cellules qui sont vivantes et des cellules qui sont mortes, afin d'obtenir une approximation plus conservatrice des concentrations qui sont toxiques.

Malgré tout, selon nous, la méthode au bleu trypan est toujours très intéressante car elle est facile à utiliser, rapide et peu dispendieuse.

b. Le TBT ne semble pas immunotoxique pour *L. polaris*

Une étude *in vivo* et *in vitro* avait déjà montré la grande tolérance de *L. polaris* au TBT lors d'exposition à faibles concentrations (Békri et Pelletier 2003). Le présent travail *in vitro* confirme que le toxique affecte peu la phagocytose des amœbocytes de cette étoile de mer à fortes concentrations également. Rappelons ici que la phagocytose est la principale fonction connue de ces cellules. Le TBT a pourtant un effet chronique important sur la phagocytose de plusieurs organismes. Des expériences sur l'huître, du genre *Crassostrea*, ont montré une atteinte de cette fonction cellulaire après une exposition à 1,4 µM de TBT (Fisher *et al.* 1990). Pour fins de comparaison, nous avons utilisé dans notre étude une concentration d'exposition cellulaire jusqu'à quatre fois supérieure. Une diminution de la phagocytose a été également observée chez le bivalve *Tapes philipparum*, lors d'une exposition à 0,01 µM de TBT pendant 1 h (Cima *et al.* 1999). Et enfin, chez le tunicier, *Ciona intestinalis*, une baisse de la phagocytose a également été observée après une exposition à 0,015 µM de TBT pendant 90 minutes (Cooper *et al.* 1995). Les conditions d'expérience de ces 3 études sont comparables aux nôtres : une exposition *in vitro* au TBT. Ces études évaluent différemment la phagocytose mais sous des conditions comparables. Cette fonction cellulaire chez les organismes présentés ci-haut est atteinte à des concentrations beaucoup plus faibles que celles que nous avons utilisées. L'étoile de mer polaire est donc une espèce qui semble nettement plus tolérante au TBT que les autres invertébrés testés. Il semblerait également qu'une

autre étoile de mer, *Asterias rubens*, soit peu sensible au cadmium, un autre métal très toxique. En effet, ces étoiles de mer sont exposées à une très forte concentration de cadmium par la nourriture ($99.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les moules). La phagocytose des amœbocytes chute seulement après 7 jours, sans que la concentration en amœbocytes dans le liquide coelomique ne soit affectée (Coteur *et al.* 2005).

Dans la première fraction récupérée, la phagocytose est stimulée par l'exposition au TBT (figure 31). Ces cellules qui ingèrent plus de 3 billes fluorescentes sont considérées très actives (Fournier *et al.* 2002). Une immunostimulation par le TBT et le DBT, à faibles doses, a déjà été démontrée lors d'une étude *in vivo* chez la moule *Mytilus edulis* (St Jean *et al.* 2002). De plus, plusieurs contaminants, des métaux pour la plupart, stimulent également, à faibles doses, l'activité immunitaire (Rougier *et al.* 1994, Pipe *et al.* 1999, Pillet *et al.* 2000, Singh *et al.* 2003). Alors qu'à plus fortes doses, ces mêmes contaminants sont des immunosuppresseurs (Pipe *et al.* 1999, Pillet *et al.* 2000, Singh *et al.* 2003). Que le contaminant soit immunosuppresseur ou immunostimulant, c'est l'immunomodulation qui perturbe le système de défense d'un organisme. Par la suite, cet être vivant sera moins apte à se défendre contre des agents pathogènes. Certains auteurs proposent que les maladies auto-immunes soient, en partie, liées à l'exposition aux contaminants diffus dans l'environnement (Griffin *et al.* 2000).

c. Toxicité du TBT : hypothèse d'une résistance membranaire

Afin d'étudier le comportement des amœbocytes de *L. polaris* exposés au TBT, nous avons tenté de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et de vérifier l'hypothèse de la pénétration réduite du toxique à l'intérieur de la cellule. L'utilisation du Morin comme

marqueur indirect de la présence de TBT vient de son comportement fluorescent lorsqu'il est lié au toxique. L'augmentation de la fluorescence est donc reliée à l'augmentation de la présence de TBT dans la cellule dans laquelle celui-ci a pénétré. Selon cette méthode, le TBT ne rentre pas ou peu à l'intérieur de l'amœbocyte de *L. polaris* au cours des quelques heures d'exposition. En effet, les 3 facteurs pouvant faire varier la fluorescence ont pas ou peu d'effet. Tout d'abord, la quantité de TBT cellulaire n'augmente pas avec la concentration d'exposition puisque la fluorescence reste stable. Ensuite, le temps n'est pas non plus un facteur limitant pour l'entrée du TBT puisqu'il n'a pas d'effet sur la fluorescence, à la concentration de Morin fixe que nous avons déterminée. Enfin, davantage de Morin disponible dans la cellule n'induit qu'une faible augmentation de la fluorescence, pas nécessairement dû au complexe. Dans tous les cas, ces informations nous indiquent que le TBT pénètre peu ou pas la cellule car la fluorescence n'augmente pas ou très peu lorsque l'on fait varier les paramètres temps, concentration en Morin et concentration en TBT. Plus précisément, l'augmentation de la fluorescence n'est pas très évidente alors qu'elle est attendue lorsque le complexe est formé. Or, la fluorescence du complexe est normalement supérieure à la fluorescence du Morin seul (Arakawa *et al.* 1983), ce qui rend les données facilement interprétables, contrairement à ce que nous obtenons.

Pourquoi le TBT ne pénètre pas la cellule alors qu'il est considéré incontestablement comme toxique s'infiltrant facilement par la membrane cellulaire (Gray *et al.* 1987) ? Lors d'une étude sur la perméabilité des cellules intestinales humaines, Azenha *et al.* (2004) suggèrent que le TBT entre dans la cellule intestinale via, entre autre, un transport actif. Dans cette étude d'Azenha *et al.* (2004), la pénétration du toxique dans la cellule est

plus faible à 4°C et en absence d'ATP à 37°C. Cela nous indique que le transport cellulaire du TBT doit être actif, au moins en partie. En effet, l'ATP est l'énergie nécessaire pour l'activation des protéines de transport et la température de 37°C est optimale pour le fonctionnement physiologique normale d'une cellule humaine. Si l'absence d'ATP ou une température de 4°C ralentit la pénétration du TBT, cela nous suggère effectivement un transport actif du toxique à travers la membrane. De plus, des inhibiteurs connus de protéines de transport, provoquent une diminution de l'accumulation du TBT dans la cellule (Azenha *et al.* 2004). Nos résultats suggèrent que le TBT ne diffuse pas ou peu à travers la membrane et il se pourrait alors qu'un mécanisme de transport non spécifique effectue l'échange. Suivant cette même logique, nous pensons également que l'amœbocyte ne possède pas ce mécanisme. Cette cellule ne posséderait-elle pas de protéines transporteuses du TBT? Cela pourrait expliquer pourquoi le toxique a peu d'effet sur ces cellules. Des études ultérieures devraient vérifier l'hypothèse du transport cellulaire actif du TBT.

Pourtant, d'après plusieurs travaux, le TBT semble agir comme un toxique membranaire (Gray *et al.* 1987, Fent 1996). Sur les cellules de souris, le TBT atteint le complexe membrane/cytoplasme selon une relation dose réponse (Zucker *et al.* 1988). À une concentration de 0,1 µM, le TBT provoque un changement de forme cellulaire de l'érythrocyte humain, et il pénètre la partie extérieure de la double couche cellulaire (Gray *et al.* 1987). Le TBT porte donc atteinte à l'intégrité de la membrane et perturbe ainsi l'efficacité de la cellule. Ainsi, un mode d'action suggéré du toxique serait par fixation à la membrane cytoplasmique. L'internalisation du TBT est peu étudiée mais il semble que la membrane mitochondriale soit une cible (Snoeij *et al.* 1987 ; Guolan et

Yong 1995). Les travaux sur la toxicité membranaire ont été réalisés sur des cellules de mammifères. Les modes d'action suggérés ne sont peut-être pas présents dans une cellule d'échinoderme, ce qui rejoindrait notre hypothèse de résistance membranaire sur cette cellule primitive.

Dans l'éventualité où le TBT entrerait dans la cellule, la régulation cellulaire de l'amœbocyte est peut-être différente des cellules des autres organismes étudiés et elle serait moins sensible au changement de calcium intracellulaire. En effet, le TBT induit aussi une perturbation de l'homéostasie du calcium et aurait ainsi un effet final sur la phagocytose. En effet, le processus de phagocytose requiert en simultanée la participation du cytoplasme, de la membrane, du noyau et la réorganisation du cytosquelette (Greenberg 1995). Or, le TBT engendre un changement de la forme cellulaire, un problème identifié comme étant relié à une interférence sérieuse avec les protéines du cytosquelette (Cima *et al.* 1998). Alors pourquoi le TBT n'engendre-t-il pas de problème de phagocytose, puisqu'il perturbe la motilité de la cellule? La motilité cellulaire, importante pour la phagocytose, s'effectue grâce à la réorganisation du cytosquelette (Cooper 1999). De plus amples travaux sur la régulation cellulaire des amœbocytes de l'étoile de mer sont à souhaiter afin de mieux comprendre ce mécanisme chez les échinodermes. En effet, les études ont été effectuées sur des cellules de mammifères et de tuniciers, qui à priori, sont sensibles au TBT.

d. La variabilité individuelle peut être induite par de multiples facteurs

Plusieurs auteurs décrivent une forte variabilité inter individuelle du système immunitaire chez les vertébrés (Chandra 1997) comme chez les invertébrés (Kurtz 2002) et les échinodermes (Le Breton 2002, Békri et Pelletier 2004, Coteur *et al.* 2003). Ainsi, malgré

leur système de défense simplifié, les échinodermes réagissent de façon individuelle à la pression de leur environnement. Cela ressort également de nos résultats puisque le facteur individu et le facteur TBT ont un effet combiné sur la phagocytose des organismes. Également, le facteur individu est important pour la phagocytose de base. Cette principale méthode de défense est une activité immunitaire essentielle pour le maintien de leur santé. Un des objectifs de cette recherche était d'identifier les causes potentielles de variation de réponses entre les individus. Voici quelques caractéristiques de l'animal qui pourraient expliquer ces différences.

La mémoire immunitaire, ou le système de défense acquis, est une source de variabilité entre les animaux. Cependant, les échinodermes ne semblent pas vraiment avoir un système immunitaire acquis. La seule activité qui s'en approche est une augmentation de la rapidité du rejet de greffe (Chia et Xing 1996). Est-ce là un signe du début de la mémoire immunitaire ? Peu d'études en font mention. Cependant, la variabilité observée dans notre expérience n'est probablement pas due à une certaine mémoire immunitaire de la part de *L. polaris*, puisqu'elles sont maintenues en aquarium depuis quelques années.

La variation génétique entre les organismes pourrait être une des raisons expliquant la variabilité inter individuelle. Chez les vertébrés supérieurs, la phagocytose est héréditaire (Detilleux *et al.* 1994 et Sarker *et al.* 2000). Puisque la phagocytose est une caractéristique partagée par les vertébrés, les invertébrés et les échinodermes, Kurtz (2002) propose d'étendre son caractère héréditaire aux autres organismes. Des études sur la phagocytose *in vitro*, montre chez la panorpe vulgaire, *Panorpa vulgaris*, que la phagocytose s'hérite du père (Kurtz et Sauer, 1999). Cependant, la plupart des études ont été effectuées sur les vertébrés supérieurs, ou sur les insectes. Aucune étude sur un

échinoderme ni même un invertébré marin, n'est répertoriée. L'aspect génétique de la variabilité entre les individus reste encore à comprendre.

Le stade de développement de l'animal est important à prendre en considération car plusieurs gènes impliqués dans sa régulation jouent également un rôle dans le processus de phagocytose. Les larves ont des cellules phagocytes très actives (Aderem *et al* 2000, Lemaitre *et al* 1996 et Luo *et al* 2000). Notre recherche a cependant été effectuée sur des animaux adultes de plusieurs années et nous avons supposé que le stade de développement était le même pour tous.

Chez les humains, des études semblent montrer que l'immunité innée n'est pas affectée par l'âge (Solana et Mariani, 2000). L'effet de l'âge n'est cependant pas clair chez les vertébrés. Kurtz (2002) montre que la phagocytose diminue avec l'âge du panorpe vulgaire mais le peu d'études effectuées chez les invertébrés ne permettent pas de conclure. Nous n'avons pas, de toute façon, les moyens de donner un âge aux étoiles de mer sur lesquelles nous avons travaillées. Peu ou aucun d'outils sont en effet disponibles pour donner un âge aux échinodermes. Des essais sur les ossicules ont été effectuées chez les ophiures (Dahm et Brey 1998) et chez les oursins (Russel et Meredith 2000). Rien de concluant ne ressort cependant (Russel et Meredith 2000). Mais c'est un facteur supplémentaire qui pourrait engendrer la variation entre les individus que nous avons observé.

Le sexe et la maturité sexuelle pourraient peut être également avoir un effet sur les réponses individuelle. Il semblerait que les femelles aient bien souvent un potentiel immunitaire plus élevé chez les vertébrés (Zuk et McKean 1996 ; Owen 2002) mais moins élevée chez les invertébrés (Zuk *et al.* 2004). Chez les vertébrés, la testostérone

semble être un immunosuppresseur (Owen 2002) tandis que chez les invertébrés, c'est l'état reproductif qui semble être la cause d'une différence immunitaire (Zuk *et al.* 2004). La différence de sexe pourrait donc être également à l'origine d'une partie de la variabilité inter individuelle observée dans notre étude. Chez les étoiles de mer, le sexe peut être déterminé par une ponction dans les gonades et une observation au microscope. Il serait intéressant d'utiliser l'approche de comparaison intersexe dans une expérience ultérieure.

L'état nutritionnel de l'organisme peut également influencer sa défense immunitaire (Chandra 1997). Dans notre étude, tous les organismes sont nourris à satiété mais les expériences sont réalisées sur des animaux qui n'étaient pas en train de se nourrir au moment du prélèvement. L'état nutritionnel ne peut donc pas être relié à la variabilité observée.

En conclusion, plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe et l'hérédité pourraient être impliqués dans la variation interindividuelle que nous observons. Il reste beaucoup à apprendre sur l'écophysiologie des échinodermes.

e. Le TBT ne semble pas perturber l'adhérence cellulaire

La qualité de l'adhérence cellulaire ne semble pas être diminuée suite à une exposition au TBT. Le manque de répliquas ne permet pas d'être catégorique. Cependant, une exposition modérée au TBT (environ 2 μ M) ne semble pas également modifier de façon notable l'adhérence des cellules Hela en culture (E. Pelletier, communication personnelle). Or, ces cellules Hela sont également des cellules très adhérentes, comme les amœbocytes. Alors, les mécanismes de l'adhérence cellulaire ne semblent pas une cible spécifique du TBT.

2. Des sous- populations ou une différence mécanique ?

Comme la plupart des étoiles de mer, *L. polaris* ne semble avoir que des amœbocytes comme type cellulaire du milieu cœlomique (Vanden Bossche et Jangoux 1976, Boolootian 1966). En effet, aucune distinction cellulaire ne peut être effectuée au microscope, sauf dans certains cas où de petites cellules toutes rondes sont présentes. Au cytomètre en flux, nous observons très clairement la présence d'un seul type cellulaire caractérisé par la même taille et la même granulosité. La présence des cellules rondes n'a pas pu être reliée à un évènement extérieur et nous n'avons aucune idée de leur utilité ni même ce qui provoque leur présence. Des descriptions exhaustives des cœlomocytes d'astéries ont été effectuées (Bertheussen 1981a et 1981b, Smith 1981) mais les connaissances demeurent limitées. Dans la mise au point des méthodes nous avons mis en évidence deux fractions cellulaires qui n'avaient pas la même capacité d'effectuer la phagocytose. Nous entrevoyons deux hypothèses pour expliquer ce phénomène.

Premièrement, les deux fractions mises en évidence pourraient être deux sous populations d'amœbocytes. Il ne s'agirait pas de deux populations différentes puisqu'elles ont les mêmes caractéristiques de taille et de granulosité, tel que nous l'indique la cytométrie. Ainsi, la deuxième fraction est plus adhérente mais moins active d'un point de vue immunitaire. Plusieurs auteurs ont déjà décrits différents groupes morphologiques d'amœbocytes (Jangoux et Vanden Bossche 1975, Coteur *et al.* 2002). Par exemple, Coteur *et al.* (2002) ont mis en évidence deux sous populations d'amœbocytes grâce à la cytométrie en flux chez *Asteria rubens*, lorsque l'animal est stimulé par une injection bactérienne intracœlomique. L'injection provoque l'augmentation de la concentration cellulaire d'une sous population et stimule la phagocytose des cellules présentes. Dans

notre étude, la stimulation est *in vitro* et donc il ne peut pas y avoir de production d'amœbocytes *de novo*. Ainsi, l'observation des deux sous populations aurait lieu après stimulation, même *in vitro*, et la cellule programmée s'exécuterait pour une action précise. Plus précisément, les 2 sous populations cellulaires pourraient être des stades d'amœbocytes qui complèteraient leur différenciation, lors d'une stimulation, comme suggéré par Gross *et al.* 2000. Alors, selon ce raisonnement, les amœbocytes de deuxième fraction seraient programmées différemment de la première fraction. Ils seraient moins aptes à effectuer la phagocytose et auraient une meilleure capacité d'adhérence. D'un autre côté, les cellules issues de la première fraction seraient programmées pour effectuer en priorité la fonction immunitaire et donc paraîtraient plus actives que les autres. En résumé, en première hypothèse, nous suggérons qu'une stimulation par les bactéries ou billes fluorescentes enclenche la différenciation des sous populations. Nous n'avons cependant pas de références pour appuyer une différenciation enclenchée par une bille de latex.

Deuxièmement, l'explication pourrait tout aussi bien être mécanique. En effet, les cellules adhérees subiraient un changement physiologique les rendant moins aptes à effectuer la phagocytose. Cette deuxième hypothèse ne va pas à l'encontre de la première. En effet, les cellules pourraient très bien terminer leur différenciation sous stimulation physique externe. Les cellules vouées à l'adhérence seraient moins actives lorsqu'elles doivent remplir d'autres fonctions par exemple colmater les blessures de l'organisme.

L'hypothèse de la différenciation sous stimulation, apportée par Gross *et al.* (2000) est intéressante. Nous pensons que de plus amples études doivent être effectuées dans ce sens afin de mieux cerner les différents rôles que peuvent jouer les amœbocytes.

Il semblerait également que ces deux sous fractions n'aient pas la même tolérance au TBT. En effet, la deuxième fraction, moins active en phagocytose, est plus sensible puisque 2,3 μM d'exposition au TBT engendre une immunosuppression sur toutes les cellules alors que les cellules issues de la première fraction ne semblent pas affectées. Ces données sont pour l'instant difficilement interprétables puisque nous ne savons pas quelles différences réelles existent entre ces deux sous fractions cellulaires.

3. La concentration cœlomique en amœbocytes pourrait suivre une tendance saisonnière

Une tendance saisonnière semble se dégager des données de concentration en amœbocytes obtenues pendant l'année d'expérience. Lors du maximum de concentration en amœbocytes, en janvier et février, les étoiles de mer se trouvent dans leur période de couvaion. En effet, *L. polaris* est l'une des rares espèces d'étoiles de mer qui couvent ses œufs et jeûnent pendant plusieurs mois. En captivité, les étoiles de mer polaires pondent toutes en même temps en décembre, période pendant laquelle la température de l'eau peut atteindre 0°C. Ce maximum de concentration en amœbocytes n'est probablement pas directement relié à l'état de jeûne dans lequel se trouve l'animal pendant sa couvaion. En effet, les ponctions de liquide cœlomique n'ont pas été effectuées sur des organismes qui couvaient. Cependant, il nous semble réaliste de penser que la tendance saisonnière obtenue puisse être en lien avec l'état physiologique des étoiles de mer. Rappelons que les amœbocytes sont polyvalents et sont probablement sollicités dans plusieurs fonctions

physiologiques. Coteur *et al* (2004) n'ont cependant pas observé de tendance saisonnière de la concentration en cellules immunitaires chez l'étoile de mer commune, *Asterias rubens*, une espèce qui ne couve pas ses œufs.

Coteur *et al.* (2004) montraient également que la variation de température et de salinité n'avait pas d'effet sur la concentration cellulaire. Nos observations semblent au contraire indiquer qu'une variation de température et de salinité influence la concentration cœlomique en amœbocytes. Ces deux espèces d'étoiles de mer sembleraient alors réagir différemment selon les saisons, les variations de température et de salinité. D'une part, les étoiles de mer du genre *Asterias* sont les seules qui tolèrent les eaux saumâtres dans lesquelles on retrouve des variations de température et de salinité. D'autre part, les autres genres, comme *leptasterias*, ne supportent pas un changement brutal de température et sont sténohalines (Booolootian 1966).

Plusieurs autres facteurs pourraient influencer la variation de la concentration en amœbocytes du liquide cœlomique. Si bien qu'un changement soudain de la concentration pourrait être un indice de la condition de l'animal. En effet, des infections à des agents externes peuvent en être la cause (Gross *et al.* 2000, Coteur *et al.* 2004). Aussi, après l'autotomie, lorsque l'animal est en régénérescence d'un de ces bras, la concentration en amœbocytes est également plus élevée (Silva et Peck 2000, Coteur *et al.* 2004, observation personnelle). De plus, lors du maintien des organismes en milieu fermé à l'été 2003 (essais préliminaires), la concentration cœlomique a commencé par augmenter fortement avant de chuter, malgré les changements fréquents d'eau (1/3 du volume, 2 fois par semaine). Les étoiles de mer étaient visiblement malades (autotomie, pâleur, arrêt de l'alimentation). Leur état s'est grandement amélioré après le retour à la

station aquicole de Pointe-au-père où l'eau circule continuellement. Mais la quantité de cellules seules, sans un suivi journalier, ne peut pas nous donner une idée de la condition de l'animal et de toute façon, elle n'est pas directement liée à la performance immunitaire (Kurtz 2002).

4. Un retour sur les méthodes analytiques

a. Le maintien des cellules s'effectue à basse température

Pendant le déroulement des expériences, la température est primordiale pour maintenir viable les amœbocytes de l'étoile de mer. Pourtant, le même type d'expérience peut être effectué sur des cellules d'invertébrés marins à des températures plus élevées. Par exemple, les travaux sur la moule ou la mye, des animaux présents dans le même environnement froid que l'étoile de mer, sont couramment réalisés à des températures plus élevées sans que la viabilité des cellules ne soit affectée (Fournier *et al.* 2002, Brousseau *et al.* 2000, Grundy *et al.* 1996, Bouchard *et al.* 1999). L'étoile de mer, comme tous les échinodermes, est un animal qui supporte difficilement un changement rapide de température (Booolootian 1966). On peut donc penser que l'activité cellulaire suit cette même sensibilité. Plusieurs auteurs ont, par ailleurs, rapporté des activités cellulaires à des températures très froides chez les échinodermes. Par exemple, la phagocytose *in vitro* chez l'oursin *Strongylocentrotus droebachiensis* serait optimale entre 5°C et 15°C (Bertheussen 1981 a et b). Dans une revue de littérature, Chia et Xing (1996) rapportaient aussi que les cœlomocytes d'échinodermes étaient mieux conservés entre 10°C et 15°C. De plus, le système immunitaire de l'étoile de mer antarctique,

Odontaster validus, est très efficace à 0°C (Silva *et al.* 2001). Malgré tout, le maintien des coelomocytes d'échinodermes est très difficile *in vitro*. Au mieux, les cellules sont maintenues en vie quelques jours (Chia et Xing 1996). Quant à la culture de ce genre de cellules, très peu d'auteurs la décrivent et elle reste ardue et non concluante (Leclerc *et al.* 1986). La température de culture cellulaire n'est peut-être pas la même pour tous les échinodermes et il faut sûrement revoir la façon de travailler avec ce type de cellules.

b. La phagocytose et les amœbocytes

L'évaluation de la phagocytose en microplaque et en cytométrie en flux n'est pas simple à interpréter. La méthode au cytomètre est plus adéquate, selon nous, que la méthode en microplaque. Nous avons observé que la variabilité en microplaque est supérieure à celle obtenue en cytométrie. En plus de la variabilité biologique, il nous semble qu'il y ait en microplaque une variabilité méthodologique qui biaise nos données. Il est possible que le problème puisse être dû à la qualité adsorbante des cellules. Nous les utilisons justement pour cette caractéristique mais il est possible qu'elle entraîne un biais dans l'expérience. Grâce à la cytométrie en flux, nous avons montré qu'il existait une fraction 2 plus adhérente mais moins active. Or, en microplaque, il n'y a pas de distinction entre ces 2 fractions, comme en cytométrie. Ainsi, la forte variabilité obtenue dans la mesure de la phagocytose pourrait être engendrée par la présence des 2 fractions de cellules dans chaque puit de la microplaque. De plus, le travail en microplaque implique le transfert de petits volumes. Ainsi, lorsqu'il y a erreur de quelques μl , les conséquences sont plus grandes qu'en cytométrie où les volumes sont plus élevés.

Il y a un autre problème méthodologique que nous entrevoyons. Il s'agit de la fluorescence même des billes ou des bactéries. Avec la méthode en cytométrie en flux,

lorsque le milieu cellulaire contenant la première fraction est observé au microscope, les billes ont formé des doublets. Il paraît également que beaucoup de billes ne sont pas ingérées dans la cellule et sont seulement adsorbées à la paroi extérieure. Or, la méthode en cytométrie ne permet pas de différencier les billes ingérées des billes adsorbées à la surface de la cellule (Brousseau *et al.* 1998). Cela expliquerait pourquoi les pics de phagocytose chez les cellules issues de la première fraction cellulaire forment des paquets. Quant à la deuxième fraction, elle est épurée puisque tout le liquide est retiré. Pour cette fraction, les résultats en histogramme sont clairs. Nous pensons que la méthode en microplaque est trop aléatoire alors que la méthode au cytomètre est plus intéressante. Ultérieurement, il serait intéressant de comparer les réponses de phagocytose entre une exposition aux billes de latex et aux bactéries fluorescentes, en cytométrie en flux.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre le comportement des amœbocytes de *L. polaris*, en présence de TBT. Pour cela, nous avons évalué la cytotoxicité (viabilité cellulaire) et l'immunotoxicité (phagocytose) du TBT après exposition *in vitro* des amœbocytes de cette étoile de mer. Les amœbocytes de l'étoile de mer polaire sont très résistantes au TBT même si les résultats de la viabilité cellulaire obtenues d'après les deux méthodes utilisées sont un peu différents. L'approche double pour la détermination de la viabilité cellulaire est importante selon nous. Alors que le TBT est un inducteur de l'apoptose, il est très surprenant que la viabilité des amœbocytes soit très peu affectée par l'exposition. Il serait intéressant d'étudier la mort cellulaire programmée et son induction chez ces cellules.

Le TBT ne semble également pas toxique sur la phagocytose *in vitro* des amœbocytes de *L. polaris*. Nos concentrations d'exposition sont largement supérieures à celles utilisées dans des études similaires sur d'autres invertébrés marins.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité du TBT, des expériences ont été effectuées au cytomètre en flux pour vérifier l'hypothèse de sa pénétration à l'intérieur de la cellule. Les résultats indiquent que le TBT pénètre peu ou pas du tout quelque soit le temps et les concentrations utilisées, laissant penser à un mécanisme de transport qui serait absent chez *L. polaris*. Ces résultats sont très préliminaires et il serait intéressant de mieux comprendre le transport du TBT à travers la cellule.

La variabilité individuelle que nous observons peut être induite par de multiples facteurs comme l'âge, le sexe, l'hérédité et le petit nombre de répliquas. Mais il reste beaucoup à apprendre sur l'écophysiologie des échinodermes.

Lors des essais en cytométrie en flux, nous avons observé deux fractions cellulaires. La première fraction est décollée mécaniquement alors que la seconde est décollée chimiquement à l'aide de la trypsine. La phagocytose est largement plus active chez les cellules issues de la première fraction alors qu'il s'agit de la même population cellulaire d'amœbocytes. Cependant, les cellules pourraient terminer leur différenciation sous stimulation de particules étrangères. Les cellules vouées à l'adhérence (fraction 2), qui sont utiles pour colmater les blessures de l'organisme, seraient moins actives lorsqu'elles doivent remplir d'autres fonctions. L'hypothèse de la différenciation sous stimulation, apportée par Gross *et al.* (2000) est intéressante. Nous pensons que de plus amples études doivent être effectuées dans ce sens afin de mieux cerner les différents rôles que peuvent jouer les amœbocytes.

Plus on en apprend sur le système immunitaire des échinodermes et plus on est en mesure d'en apprécier leur capacité. Comme le mentionnait Gross *et al.* (1999), le système de défense des échinodermes n'est définitivement pas homologue à aucun sous-système des vertébrés. Il s'agit là d'une fenêtre fascinante sur l'évolution.

BIBLIOGRAPHIE

- Aderem, A., et Ulevitch, R. J. 2000. « Toll-like receptors in the induction of the innate immune response ». **Nature** 406, 782-787.
- Altman, S. A., Randers, L., et Rao, G. 1993. « Comparaison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determination ». **Biotechnological Progress** 9, 671-674.
- Alzieu, C. 2000. « Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates ». **Ecotoxicology** 9, 71-76.
- Arakawa, Y., Wada, O., et Manabe, M. 1983. « Extraction and fluorometric determination of organotin compounds with morin ». **Analytical Chemistry** 55, 1901-1904.
- Azenha, M. A., Evangelista, R., Martel, F., et Vasconcelos, M. T. 2004. « Estimation of the human intestinal permeability of butyltin species using the Caco-2 cell line model ». **Food and Chemical Toxicology** 42, 1431-1442.
- Baldwin, W. S., et LeBlanc, G. A. 1994. « In vivo biotransformation of testosterone by phase I and II detoxification enzymes and their modulation by 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna* ». **Aquatic Toxicology** 29, 103-117.
- Bang, F. B. 1982. « Disease processes in seastars : a metchnikovian challenge ». **Biological Bulletin** 135-148.
- Barakat, A. O. 2004. « Assessment of persistent toxic substances in the environment of Egypt ». **Environment International** 30, 309-322.
- Batley, G. 1996. « The distribution and fate of tributyltin in the marine environment ». Dans "**Tributyltin : case study of an environmental contaminant**" S. J. de Mora, Ed., pp. 139-166. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bayne, C. J. 1990. « Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates ». **Bioscience** 40, 723-731.
- Beck, G., et Habicht, G. S. 1986. « Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi* ». **Proc. Natl. Academy of Science** 83, 7429-7433.
- Beck, G., O'Brien, R. F., Habicht, G. S., L., S. D., Cooper, E. L., et A., R. D. 1993. « Invertebrate Cytokines III : invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells ». **Cellular Immunology** 146, 284-299.

- Békri, K. 2001. « Transfert trophique et immunotoxicité du tributylétain chez l'étoile de mer boréale *Leptasterias polaris* Echinodermata, Asteroidea ». "Mémoire présenté à l'Université du Québec à Rimouski". Rimouski.
- Békri, K., et Pelletier, E. 2003. « Trophic transfer and in vivo immunotoxicological effects of tributyltin TBT in polar seastar *Leptasterias polaris* ». **Aquatic Toxicology** 66, 39-53.
- Bertheussen, K. 1981a. « Endocytosis by echinoid phagocytes in vitro. I. Recognition of foreign matter ». **Developmental and Comparative Immunology** 5, 241-250.
- Bertheussen, K. 1981b. « Endocytosis by echinoid phagocytosis in vitro. II. Mechanisms of endocytosis ». **Developmental and Comparative Immunology** 5, 557-564.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., et Hansen, P.-D. 2002. « Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay ». **Environmental Toxicology** 17, 160-169.
- Boivin, Y., Larrivée, D., et Himmelman, J. H. 1986. « Reproductive cycle of the subartic brooding asteroid *Leptasterias polaris* ». **Marine Biology** 92, 329-337.
- Bosselmann, K. 1996. « Environmental law and tributyltin in the environment ». Dans "Tributyltin : Case study of an environmental contaminant" S. J. de Mora, Ed., pp. 237-263. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bouchard, N., Pelletier, E., et Michel, F. 1999. « Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves ». **Environmental Toxicology and Chemistry** 18, 519-522.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., et Fournier, M. 1998. « **Manual of Immunological Methods.** » CRC Press, Boston, USA 141p
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., et Fournier, M. 2000. « Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals ». **Toxicology** 142, 145-156.
- Chabot, R. et Rossignol, A. 1992. « **Algues et faune du littoral du Saint-Laurent maritime.** » Université du Québec à Rimouski et Pêches et Océan Canada, Mont-Joli.
- Chandra, R. K. 1997. « Nutrition and the immune system: an introduction ». **The American Journal of Clinical Nutrition** 66, 460-463.

- Chia, F.-S., et Xing, J. 1996. « Echinoderm cœlomocytes ». **Zoological Studies** 35, 231-254.
- Cima, F., et Ballarin, L. 2000. « Tributyltin induces cytoskeletal alterations in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* phagocytes via interaction with calmodulin ». **Aquatic Toxicology** 48, 419-429.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., et Burighel, P. 1998. « Cytoskeleton alterations by Tributyltin TBT in Tunicate phagocytes ». **Ecotoxicology and Environmental Safety** 40, 160-165.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Martinucci, G., et Burighel, P. 1996. « Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate *Styela ptilucata*; Tunicata ». **Ecotoxicology and Environmental Safety** 35, 174-182.
- Cima, F., Marin, M. G., Matozzo, V., Da Ros, L., et Ballarin, L. 1999. « Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve, 1850 ». **Marine Pollution Bulletin** 39, 112-115.
- Conover. 1980. "Practical Nonparametric Statistics." John Wiley & Sons. N.Y.
- Cooke, G. M., Tryphonas, H., Pulido, O., Caldwell, D., Bondy, G. S., et Forsyth, D. 2004. « Oral gavage, in utero and postnatal exposure of sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part I: toxicology, histopathology and clinical chemistry ». **Food and Chemical Toxicology** 42, 211-220.
- Cooper, E. L., Arizza, V., Cammarata, M., Pellerito, L., and Parrinello, N. 1995. Tributyltin affects phagocytic activity of *Ciona intestinalis* hemocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology part C** 112, 285-289.
- Cooper, G. 1999. "La cellule : une Approche Moléculaire." DeBoeck Université, Bruxelles.
- Coteur, G., Corriere, N., et Dubois, P. 2004. « Environmental factor influencing the immune responses of the common European starfish *Asterias rubens* ». **Fish and Shellfish Immunology** 16, 51-63.
- Coteur, G., DeBecker, G., Warnau, M., Jangoux, M., et Dubois, P. 2002. « Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common species european starfish, *Asterias rubens* Echinodermata ». **European Journal of Cell Biology** 81, 413-418.
- Coteur, G., Pernet, P., Gillan, D., Joly, G., Maage, A., et Dubois, P. 2003. « Field contamination of the starfish *Asterias rubens* by metals. part I : short and long term accumulation along a pollution gradient ». **Environmental Toxicology and Chemistry** 22, 2136-2144.

- Coteur, G., Gillan, D., Pernet, P. et Dubois, P. 2005. « Alteration of cellular immune responses in the seastar *Asterias rubens* following dietary exposure to cadmium ». **Aquatic Toxicology** 73, 418-421.
- Courtney Smith, L., Britten, R. J., et Davidson, E. H. 1995. « Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system ». **Developmental and Comparative Immunology** 19, 217-224.
- Dahm, C., et Brey, T. 1998. « Determination of growth and age of slow growing brittle stars echinodermata : ophiuroidea from natural growth bands ». **Journal of Marine Biology Assessment** 78, 941-951.
- de Bernardo, S., Weigele, M., Tomme, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Böhlen, P., Stein, S., et Udenfriend, S. 1974. « Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines ». **Archives of Biochemistry and Biophysics** 163, 390-400.
- de Mora, S. J. 1996. « The tributyltin debate : ocean transportation versus seafood harvesting ». Dans "Tributyltin : **Case study of an environmental contaminant**" S. J. De Mora, Ed., pp. 1-20. Cambridge University Press, Cambridge.
- de Mora, S. J., et Pelletier, E. 1997. « Environmental tributyltin research : past, present, future ». **Environmental Technology** 18, 1169-1177.
- Detilleux, J. C., Koehler, K. J., Freeman, A. E., Kehrli, M. E., et Kelley, D. H. 1994. « Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation ». **Journal of Dairy Science** 77, 2640-2650.
- Dopp, E., Hartmann, L. M., Florea, A.-M., Rettenmeier, A. W., et Hirner, A. V. 2004. « Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometalloid compounds ». **Critical Reviews in Toxicology** 34, 301-333.
- Ducusin, R. J., Sarashina, T., Uzuka, Y., Tanabe, S., et Ohtani, M. 2001. « Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants *in vitro* ». **Canadien Journal of Veterinary Research** 65, 38-44.
- Elsabbagh, H. S., Moussa, S. Z., et El-Tawil, O. S. 2002. « Neurotoxicologic sequelae of tributyltin intoxication in rats ». **Pharmacological Research** 45, 201-206.
- Endean, R. 1966. « The coelomocytes and coelomic fluids ». Dans "**Physiology of Echinodermata**" R. A. Boolootian, Ed., pp. 301-321. Interscience publishers.
- Evans, S. M., et Nicholson, G. J. 2000. « The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas ». **The science of the Total Environment** 258, 73-80.

- Fent, K. 1996. « Ecotoxicology of organotin compounds ». **Critical Reviews in Toxicology** 26, 1-117.
- Fisher, W. S., Wishkovsky, A., et Chu, F.-L. E. 1990. « Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes ». **Archives of Environmental Toxicology** 19, 354-360.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., et Cyr, D. 2002. « Effects of exposure of *Mya Arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes ». **Aquatic Toxicology** 59, 83-92.
- Gallaway, T. S., et Depledge, M. H. 2001. « Immunotoxicity in invertebrates : measurement and ecotoxicological relevance ». **Ecotoxicology** 10, 5-23.
- Girard, J.-P., Szpunar, J., Pedrotti, M.-L., et Pesando, D. 2000. « Toxicity of tri-n-butyltin to sea urchin eggs and larvae : relation to bioaccumulation at the nanomolar level ». **Environmental Toxicology and Chemistry** 19, 1272-1277.
- Goldberg, E. 1986. « TBT : an environmental dilemma ». **Environment** 28, 17-44.
- Gray, B. H., Porvaznik, M., Carlyle, F., et Lee, L. H. 1987. « Tri-n-butyltin : a membrane toxicant ». **Toxicology** 47, 35-54.
- Greenberg, S. 1995. « Signal transduction of phagocytosis. » **Trends in Cell Biology** 5, 93-99.
- Griffin, J. M., Gilbert, K. M., Lamps, L. W., et Pumford, N. R. 2000. « CD4+ T-cell activation and induction of autoimmune hepatitis following trichloroethylene treatment in MRL+Mice ». **Toxicological Sciences** 57, 345-352.
- Gross, P. S., Clow, L. A., et Smith, C. L. 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.
- Grundy, M. M., Moore, M. N., Howell, S. M., and Ratcliffe, N. A. 1996. « Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis* ». **Aquatic Toxicology** 34, 273-290.
- Gui-Bin, J., Q un- Fang, Z., et Bin, H. 2000. « Speciation of Organotin Compounds, Total Tin, and Major Trace Metal Elements in Poisoned Human Organs by Gas Chromatography-Flame Photometric Detector and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry ». **Environmental Science and Technology** 34, 2697-2702.
- Guolan, H., et Yong, W. 1995. « Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels ». **Water Research** 29, 1877-1884.

- Hashimoto, S., Watanabe, M., Noda, Y., Hayashi, T., Kurita, M., Takasu, Y., et Otsuki, A. 1998. « Concentration and distribution of butyltin compounds in a heavy tanker route in the strait of Malacca and Tokyo Bay ». **Marine Environmental Research** 45, 169-177.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., et Larson, A. 1996. "**Integrated Principles of Zoology.**" WCB/McGraw-Hill.
- Hidelman, W. H., et Dix, T. G. 1972. « Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms ». **Transplantation** 15, 624-633.
- Himmelman, J. H., et Dutil, C. 1991. « Distribution, population structure and feeding of subtidal seastars in the northern Gulf of St. Lawrence ». **Marine Ecology Progress Series** 76, 61-72.
- Himmelman, J. H., Lavergne, Y., Cardinal, A., Martel, G., et Jalbert, P. 1982. « Brooding behaviour of the northern sea star *Leptasterias polaris* ». **Marine Biology** 68, 235-240.
- IMO. 2005. « International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships ». Site internet consulté en mars 2005
- Jangoux, M. 1982. « Excretion ». In "**Echinoderm Nutrition**" M. Jangoux and J. M. Lawrence, Eds., pp. 437-445. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Jangoux, M., et Vanden Bossche, J.-P. 1975. « Morphology and dynamics of the coelomocytes of *Asterias rubens*, Echinodermata, Asterozoa ». **Forma Functio** 8, 191-208.
- Jenkins, S. M., Ehman, K., et Barone Jr., S. 2004. « Structure-activity comparison of organotin species : dibutyltin is a developmental neurotoxicant *in vitro* and *in vivo* ». **Developmental Brain Research** 151, 1-12.
- Jha, A. N., Hagger, J. A., Hill, S. J., et Depledge, M. H. 2000. « Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide TBTO : an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species ». **Marine Environmental Research** 50, 565-576.
- Jones, K. H., et Senft, J. A. 1985. « An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide ». **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 33, 77-79.
- Kaneshiro, K., et Karp, R. D. 1980. « The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias Imbricata* ». **Biological Bulletin** 159, 295-310.

- Kannan, K., Senthilkumar, K., et Gietsy, J. P. 1999. « Occurrence of Butyltin Compounds in Human Blood ». **Environmental Science and Technology** 13, 1776-1779.
- Kishimoto, K., Matsuo, S. I., Ishibashi, H., Oyama, Y., et Akaike, N. 2001. « Nanomolar concentrations of tri-n-butyltin facilitate gamma-aminobutyric acidergic transmission in rat hypothalamic neurons ». **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 299, 171-177.
- Kurtz, J. 2002. « Phagocytosis by invertebrate hemocytes : causes of variation in *Panorpa vulgaris* Scorpionflies ». **Microscopy Research and Technique** 57, 456-468.
- Kurtz, J., et Sauer, K. P. 1999. « The immunocompetence handicap hypothesis : testing the genetic predictions ». **Proceedings of the Royal Society of London, Series B : Biological Sciences** 266, 2515-2522.
- Le Breton, S. 2002. « Transfert trophique du rétène et du phénanthrène chez l'étoile de mer boréale, *Leptasterias polaris* Echinodermata, asteroidea et réponse immunotoxique ». "Mémoire présenté à l'Université du Québec à Rimouski", Rimouski. 168p.
- Leclerc, M., Brillouet, C., Luquet, G., et Binaghi, R. A. 1986. « Production of an antibody-like factor in the sea star *Asteria rubens* : involvement of at least three cellular populations ». **Immunology** 57, 479-482.
- Lemaitre, T., Michaut, L., Reichart, J. M., et Hoffmann, J. A. 1996. « The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults ». **Cell** 86, 973-983.
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S.-M., et Kepler, T. B. 2004. « Invertebrate immune systems-not well homogeneous, not simple, not well understood ». **Immunological Reviews** 198, 10-24.
- Lorenzen, A., et Kennedy, S. W. 1993. « A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader ». **Analytical Biochemistry** 214, 346-348.
- Luo, C., et Zheng, L. 2000. « Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals ». **Immunogenetics** 51, 92-98.
- Martineau, D., Lemberger, K., Dallaire, A., Labelle, P., Lipscomb, T. P., Michel, P., et Mikaelian, I. 2002. « Cancer in wildlife, a case study : beluga from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada ». **Environmental Health Perspectives** 110, 285-292.

- Matthiessen, P., et Gibbs, P. E. 1998. « Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks ». **Environmental Toxicology and Chemistry** 17, 37-43.
- McMaster, M. E. 2001. « A Review of the evidence for endocrine disruption in canadian aquatic ecosystems ». **Water quality research journal of Canada** 36, 215-231.
- Micié, M., Bihari, N., Labura, Z., Müller, W. E. G., et Batel, R. 2001. « Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride ». **Aquatic Toxicology** 55, 61-73.
- Morcillo, Y., Ronis, M. J. J., et Porte, C. 1998. « Effects of tributyltin on the Phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. » **Aquatic Toxicology** 42, 1-13.
- Nakata, M., Oyama, Y., Okada, Y., Yamazaki, Y., Chikahisa, L., et Satoh, M. 1999. « Flow cytometric analysis on tri-n-butyltin-induced increase in annexin V binding to membranes of rat thymocytes ». **Environmental Toxicology and Pharmacology** 7, 267-273.
- Nielsen, J. B., et Strand, J. 2002. « Butyltin compounds in human liver ». **Environmental Research Section A** 88, 129-133.
- Oberdörster, E., et McClellan-Green, P. 2002. « Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta* : TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor ». **Marine Environmental Research** 54, 715-718.
- Oberdörster, E., Rittschof, D., and LeBlanc, G. A. 1998. Alteration of [14C]-testosterone metabolism after chronic exposure of daphnia magna to Tributyltin. *Archives of environmental contamination and toxicology* 34, 21-25.
- O'Halloran, K., Ahokas, J. T., et Wright, P. F. A. 1998. « Response of fish immune cells to *in vitro* organotin exposures ». **Aquatic Toxicology** 40, 141-156.
- Owens, I. P. F. 2002. « Sex differences in mortality rate ». **Science** 297.
- Pillet, S., Lesage, V., Hammill, M., Cyr, D., J.-M., B., et Fournier, M. 2000. « *In vitro* exposure of seal peripheral blood leukocytes to different metals reveal a sex-dependent effect of zinc on phagocytosis activity ». **Marine Pollution Bulletin** 40, 921-927.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., F.M.M., C., et Ramanathan, K. 1999. « Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis* ». **Aquatic Toxicology** 46, 43-54.

- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., et Rhodes, C. P. 1985. « Invertebrate Immunity : basic concepts and recent advances ». **International Review of Cytology** 97, 183-354.
- Rice, C. D., et Weeks, B. A. 1990. « The influence of in vivo exposure to tributyltin on reactive oxygen formation in oyster toadfish macrophages ». **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 19, 854-857.
- Roitt, I., Brostoff, J., et Male, D. 1997. "**Immunologie.**" De Boeck Université, Paris.
- Rotman, B., et Papermaster, B. W. 1966. « Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters ». **Proc. Natl. Academy of Science** 55, 134-141.
- Rougier, F., Troutaud, D., Ndoye, A., et Deschaux, P. 1994. « Non-specific immune response of zebrafish, *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan, following copper and zinc exposure ». **Fish and Shellfish Immunology** 4, 115-127.
- Rouleau, C., Xiong, Z.-H., Pacepapiivius, G., et Huang, G.-L. 2003. « Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish : axonal transport as a proposed mechanism ». **Environmental Science and Technology** 37, 3298-3302.
- Russell, M. P., et Meredith, R. W. 2000. « Natural growth lines in echinoid ossicles are not reliable indicators of age: a test using *Strongylocentrotus droebachiensis* ». **Invertebrate Biology** 119, 410-420.
- Sahlin, S., Hed, J., et Rundquist, I. 1983. « Differentiation between attached and ingested immune complexe by fluorescence quenching cytofluorometric assay ». **Journal of Immunological Methods** 60, 115-124.
- Sarker, N., Tsudzuki, M., Nishibori, M., Yasue, H., et Yamamoto, Y. 2000. « Cell-mediated and humoral immunity and phagocytic ability in chicken Lines divergently selected for serum immunoglobulin M and G levels ». **Poultry Science** 79, 1705-1709.
- Silva, J. R. M. C., Hernandez-Blaquez, F. J., Porto-Neto, L. R., et Borges, J. C. S. 2001. « Comparative study of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis including germicidal capacity in *Odontaster validus* Koehler, 1906 at 0°C ». **Journal of Invertebrate Pathology** 77, 180-185.
- Silva, J. R. M. C., et Peck, L. 2000. « Induced in vitro phagocytosis of tne antarctic starfish *Odontaster validus* Koehler 1906 at 0°C ». **Polar Biology** 23, 225-230.
- Singh, V. K., Mishra, K. P., Rani, R., Yadav, V. S., Awasthi, S. K., et Garg, S., K. 2003. « Immunomodulation by lead ». **Immunologic Research** 28, 151-165.

- Smith, C. L., et Davidson, E. H. 1994. « The Echinoderm immune system. Characters shared with vertebrate immune systems and characters arising later in deuterostome phylogeny ». **Annals of the New York Academy of Sciences** 712, 213-226.
- Smith, V. J. 1981. « The echinoderms ». Dans "**Invertebrate Blood Cells**" N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, Eds., Vol. 2, pp. 514-558. Academic press, London.
- Snoeij, N. J., Penninks, A. H., et Seinen, W. 1987. « Biological activity of organotin compounds : an overview ». **Environmental Research** 42, 335-353
- Solana, R., et Mariani, E. 2000. « NK and NK/T cells in human senescence ». **Vaccine** 18, 1613-1620.
- St.-Louis, R., de Mora, S. J., Pelletier, E., Doidge, B., Leclair, D., Mikaelian, I., et Martineau, D. 2000. « Hepatic butyltin concentrations in beluga whales *Dephinus leucas* from the St. Lawrence Estuary and Northern Quebec, Canada ». **Applied Organometallic Chemistry** 14, 218-226.
- St.-Louis, R., Gobeil, C., et Pelletier, E. 1997. « Tributyltin and its degradation products in the St Lawrence estuary Canada ». **Environmental Technology** 18, 1209-1218.
- St-Jean, S. D., Pelletier, E., et Courtenay, S. C. 2002. « Hemocyte functions and bacterial clearance affected *in vivo* by TBT and DBT in the blue mussel *Mytilus edulis* ». **Marine Ecology Progress Series** 236, 163-178.
- Stridh, H., Orrenius, S., et Hampton, M. B. 1999. « Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin ». **Toxicology and Applied Pharmacology** 156, 141-146.
- Takeuchia, I., Takahashib, S., Tanabec, S., et Miyazakid, N. 2004. « Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella* spp. Crustacea: Amphipoda ». **Marine Environmental Research** 57, 397-414.
- Tennant, J. R. 1964. « Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability ». **Transplantation** 2, 685-694.
- Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., et Weigle, M. 1972. « Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range ». **Science** 178, 871-872.
- Uff, C. R., Pockley, A. G., et Phillips, R. K. S. 1993. « A rapid microplate-based fluorometric assay for phagocytosis ». **Immunological Investigations** 22, 407-413.
- Umebayashi, C., Oyama, Y., Chikahisa-Muramatsu, L., Nakao, H., Nishizaki, Y., Nakata, M., Soeda, F., et Takahama, K. 2004. « Tri-n-butyltin-induced cytotoxicity on rat thymocytes in presence and absence of serum ». **Toxicology in vitro** 8, 55-61.

- Vanden Bossche, J.-P., et Jangoux, M. 1976. « Epithelial origin of starfish cœlomocytes ». **Nature** 261, 227-228.
- Viglino, L., Pelletier, E., et St.-Louis, R. 2004. « Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the saguenay fjord Canada ». **Environmental Toxicology and Chemistry** 23, 2673-2681.
- Viglino, L. 2005 « Comportement des organoétains dans les écosystèmes côtiers des hautes latitudes. Élaboration d'un modèle quantitatif appliqué au fjord du Saguenay. ». "Thèse présentée à l'Université du Québec à Rimouski". Rimouski.
- Vos, J. G., de Klerk, A., Krajnc, E. I., Kruizinga, W., van Ommen, B., et Rozing, J. 1984. « Toxicity of bistrin-butyltin oxide in the rat. II : Suppression of thymus-dependant immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure ». **Toxicology and Applied Pharmacology** 75, 387-408
- Vray, B., Hoebeke, J., Saint-Guillain, M., Leloup, R., et Strosberg, A. D. 1980. « A new quantitative fluorimetric assay for phagocytosis of bacteria ». **Scandinavian Journal of Immunology** 11, 147-153.
- Waite, M. E., Waldock, M. J., Thain, J. E., Smith, D. J., et Milton, S. M. 1991. « Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987 ». **Marine Environmental Research** 32, 89-111.
- Wan, C. P., Park, C. S., et Lau, B. H. S. 1993. « A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay ». **Journal of Immunological Methods** 162, 1-7.
- Xing, J., et F-S., C. 2000. « Opsonin-like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota* ». **Marine Biology** 136, 979-986.
- Zucker, R. M., Elstein, K. H., Easterling, R., E., et Massaro, E. J. 1988. « Flow cytometric analysis of the cellular toxicity of tributyltin ». **Toxicology Letters** 43, 201-218.
- Zuk, M., et McKean, K. A. 1996. « Sex differences in parasite infections : patterns and processes ». **International Journal for Parasitology** 26, 1009-1024.
- Zuk, M., Simmons, L. W., Rotenberry, J. T., et Stoehr, A. M. 2004. « Sex differences in immunity in two species of field crickets ». **Canadien Journal of Zoology** 82, 627-634.

ANNEXE A : préparation des solutions

DOSAGE DES PROTÉINES

Solution de BSA

BSA : solution mère : 500 mg d'albumine fraction V (4°C) dans 100 ml d'eau nanopure
Concentration en albumine finale : 0,03% ou 0,03g/100mL

80 ml d'eau nanopure dans une fiole jaugée de 100 ml
Ajouter 500 mg d'albumine (ne pas agiter pour éviter la formation de bulles)
Mettre au frigo à 4°C toute la nuit pour dissoudre l'albumine
Le lendemain, compléter à 100 ml avec de l'eau nanopure

Fractionner dans des eppendorfs de 2ml et congeler à -20°C.

Lors du dosage des protéines

Décongeler 2 eppendorfs de 2 ml, filtrer sur 0,2 µm par gravité
Dans fiole jaugée de 25 ml, mettre 20 ml de tampon
Ajouter 1,5 ml de solution mère filtrée
Compléter à 25 ml avec le tampon

Solution mère de Fluorescamine

Mettre 0,0250 g de fluorescamine dans 50 ml d'acétonitrile
Couvrir de papier aluminium, conservation au frigo à 4°C

VIABILITÉ CELLULAIRE

Solution mère de Fluorescéine

Mettre 0,0332 g de fluorescéine dans 100 ml de tampon
Solution de travail : utiliser 10 µl de solution mère dans 5 ml de tampon

EMASCM

Pour 1 litre (eau nanopure)

NaCl : 24 g

KCL : 0,6651 g

Na₂SO₄ : 3,9162 g

NaHCO₃ : 0,1942g

PH : 7,4 Ajuster avec HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N

Salinité (‰) : Prendre lecture avec réfractomètre de terrain. Avoir 30‰ maximum, sinon refaire avec moins de NaCl

N. b. : Autoclaver le système de filtration ainsi que les contenants qui seront utilisés pour stocker les solutions

MILIEU ANTI-AGRÉGATIF (AG)

Prendre un ballon autoclavé de 500 ml jaugé

Préparer une solution avec 1,115g EDTA (P.M. :372,24 g/mole) dans 500 ml d'eau Emascm

Ajouter le EDTA par petite quantité dans le ballon pour faciliter sa dissolution

Couvrir d'un parafilm et laisser sur plaque agitatrice jusqu'à dissolution complète

Stocker dans des petites vials

TAMPON MOULE-ÉTOILE (TME)

Pour 1 litre (eau nanopure) :

NaCl : 20 g/L

KCl : 0,746 g/L

NaH₂PO₄ : 1,38 g/L

KH₂PO₄ : 0,313 g/L

PH : 7,4

Osmolarité : 790 ± 20 mOsm

Salinité : 26-27‰

Calibrer pH-mètre

Ajuster le pH de la solution avec NaOH 5M goutte-à-goutte puis avec 0,1N NaOH pour avoir pH à 7,4

Lire la salinité au réfractomètre (26‰ est la valeur désirée)

Vérifier à nouveau le pH et corriger si nécessaire

Stériliser par filtration sur 0,2 µm, prendre soin d'utiliser une verrerie autoclavée

Conserver à 4°C

ANNEXE B : mise au point des méthodes

1. Mise au point du test de VB en microplaque

Le dosage de protéines qui est utilisé dans l'expression finale de la VB a demandé quelques ajustements de la méthode alors que la métabolisation du FDA est très bien décrite dans la littérature (Blaise *et al.* 2002) et ne diffère pas pour l'étoile de mer.

- Le dosage des protéines

Le problème du dosage des protéines fut la concentration de NaOH, insuffisante dans le protocole initial. Plusieurs expériences ont permis de cibler la concentration adéquate, assez forte pour briser la membrane cellulaire sans détruire les protéines intracellulaires. Le graphique ci-dessous illustre la dernière manipulation. La concentration de NaOH choisie est 0,02M car il semble que la concentration de protéine obtenue soit la plus stable. De plus, 0,02M est la moins forte des concentrations testées, il y a donc moins de risque d'endommager les protéines intracellulaires.

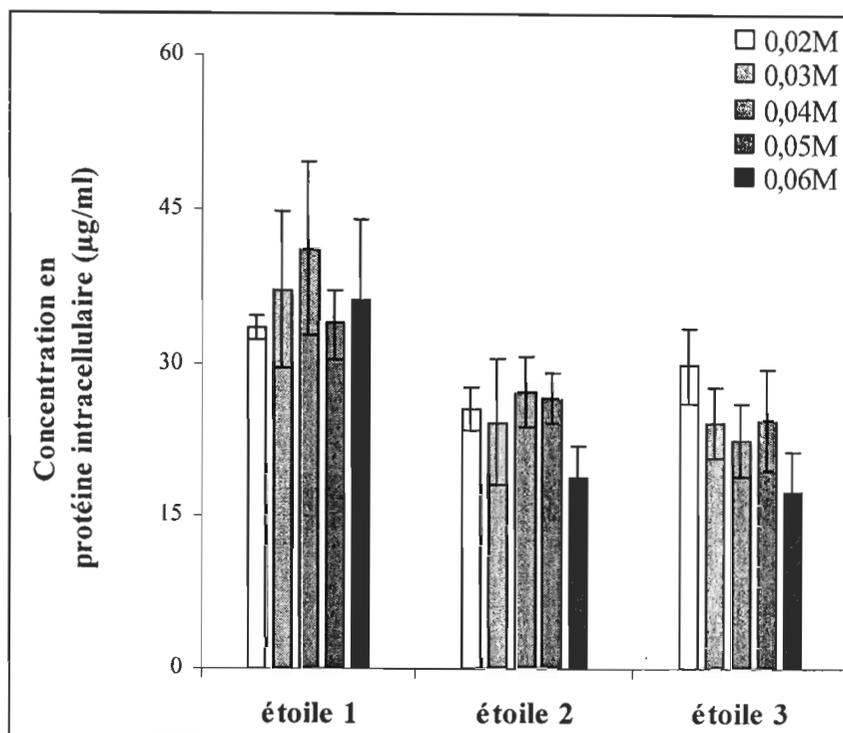


Figure 29 Détermination de la concentration optimale de NaOH pour le dosage des protéines intracellulaire des amœbocytes de *L. polaris*. Les résultats sont exprimés en quantité de protéines (µg/ml).

2. Mise au point du test de PHAG en microplaque

a. Arrêt de l'activité phagocytaire

Le formol est utilisé par plusieurs auteurs pour arrêter la réaction biologique de phagocytose. Nous avons voulu tester son efficacité sur les amœbocytes. Les essais sont effectués sur une seule étoile à la fois afin d'obtenir le plus de combinaisons possibles sur la même microplaque avec des cellules prélevées du même individu, donc avec le même bagage immunitaire (figure 30). Le même essai est répété plusieurs fois sur des étoiles différentes échantillonnées au hasard. L'utilisation du formol devait nous permettre de stabiliser la réaction biologique et de diminuer la variabilité entre les individus. De plus,

en jouant avec le ratio de bactéries par cellule, nous espérons obtenir une relation linéaire.

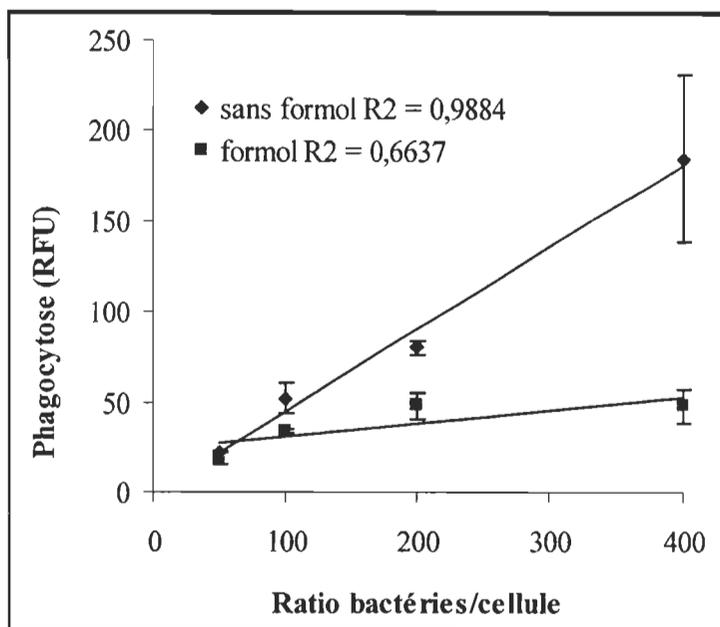


Figure 30 Effet du formol sur la phagocytose *in vitro* en microplaque des amœbocytes de *L. polaris*. Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU). Les amœbocytes sont incubés en présence de différents ratio de bactéries fluorescentes / cellule.

Après plusieurs essais avec les amœbocytes de l'étoile de mer polaire, les résultats sans formol sont meilleurs. C'est-à-dire que plus on augmente la quantité de bactéries fluorescentes et plus on augmente la fluorescence, donc la phagocytose. Le formol, par contre, semble bloquer complètement la fluorescence. Il est inutile si on l'utilise dans l'optique d'arrêter la réaction biologique puisque la lecture est réellement faite après le temps x d'incubation. Il existe un délai de 10 secondes entre la lecture du premier puit et du dernier puit par le lecteur de microplaque. Ce délai est considéré minime et donc

l'agent d'arrêt de la phagocytose (formol) a été supprimé de la méthode. De plus, il n'est pas efficace pour diminuer la variabilité des résultats.

b. Extinction de la fluorescence extracellulaire

La quantification de bactéries fluorescentes ingérées par la cellule permet l'évaluation de la phagocytose. Dans chaque puits, les bactéries peuvent également se retrouver libres dans le milieu extra cellulaire ou encore simplement adsorbées à la paroi cellulaire. Afin d'éliminer la fluorescence de ces bactéries adsorbées, nous utilisons du bleu trypan pour éteindre la fluorescence en extra (Sahlin *et al.* 1983). Le bleu trypan ne pénètre pas les cellules vivantes et ainsi la fluorescence lue par le lecteur provient des bactéries ingérées. Les essais sont réalisés sur une seule étoile à la fois pour les raisons expliquées précédemment. La figure présentée ci-après représente le résultat sur une étoile échantillonnée au hasard.

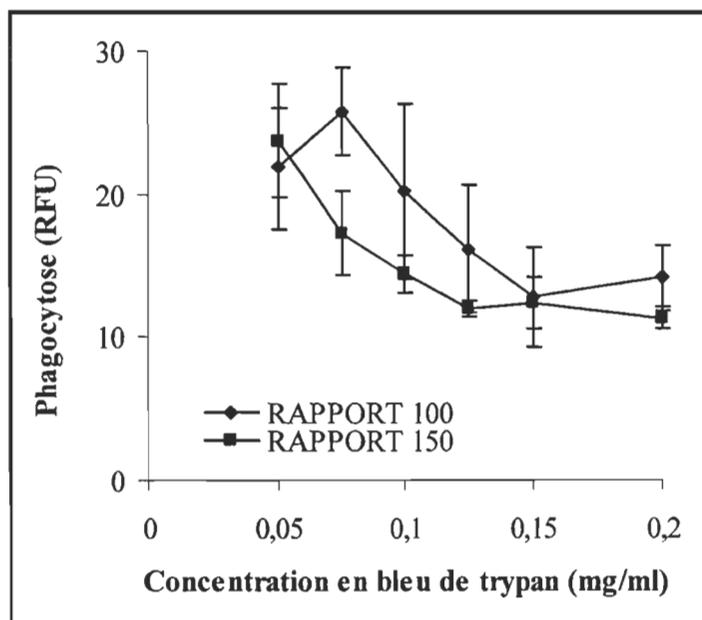


Figure 31 Effet du bleu trypan sur l'extinction de la fluorescence des bactéries libres et/ou adsorbées sur les amœbocytes lors d'essai de phagocytose. Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU).

La concentration en bleu trypan est déterminée au point d'inflexion de la courbe. C'est-à-dire que pour un rapport de 150 bactéries, le point d'inflexion est $0,125 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Au delà de cette concentration, l'extinction de la fluorescence extérieure par le bleu de trypan est stable. Ainsi, il est inutile d'augmenter la concentration en bleu de trypan. Le rapport 150 bactéries pour 1 cellule semble engendrer le moins de variabilité. C'est pourquoi il a été choisi pour le reste des expériences.

c. Cinétique de la phagocytose

La phagocytose des bactéries par les amœbocytes augmente dans les premières heures pour atteindre un plateau entre 15h et 18h. Elle décroît par la suite (figure 32). Afin d'obtenir une mesure de phagocytose stable pour l'ensemble des étoile de mer, le temps d'incubation des amœbocytes avec les bactéries fluorescentes a été fixé à 18 h. La température d'incubation est de 12°C .

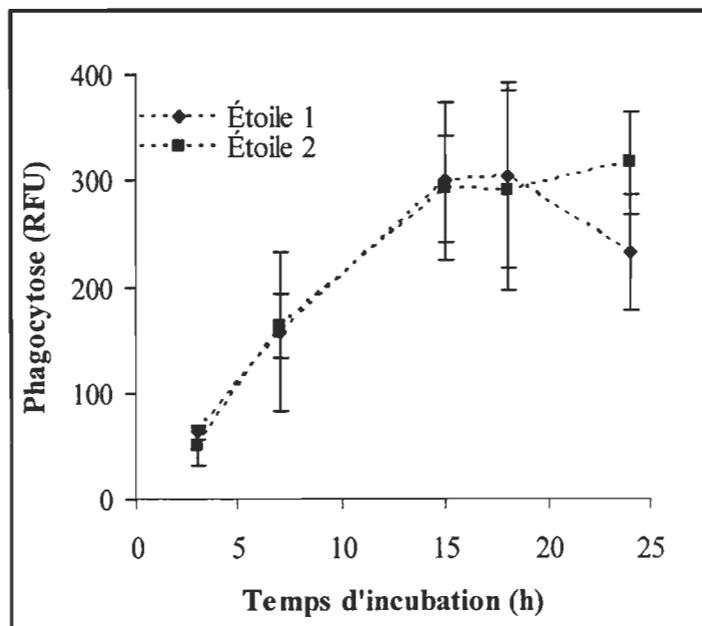


Figure 32 Effet du temps sur la phagocytose *in vitro* des amœbocytes de l'étoile de mer *L. polaris*. Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence (RFU).

3. Mise au point du test de la phagocytose en cytométrie

L'azide de sodium est utilisé par plusieurs auteurs comme contrôle négatif de la phagocytose en cytométrie en flux. Il semble cependant que chez les invertébrés marins, son efficacité n'ait pas encore été prouvée. L'étoile de mer ne fait pas exception et l'azide de sodium ne semble pas avoir un effet inhibiteur sur la phagocytose.

Afin de définir les paramètres sur l'essai de la phagocytose avec des billes fluorescentes, plusieurs essais sur le ratio billes / amœbocytes ont été effectués. Un ratio de 100 a été identifié comme étant le meilleur compromis entre le bruit de fond obtenu lors de la lecture au cytomètre et la lecture réelle de la phagocytose. Afin de pouvoir obtenir assez de cellules de deuxième fraction (voir section sur la récupération cellulaire), une quantité initiale de 500 000 cellules a été déterminée.

a. Cinétique de la phagocytose

Nous avons obtenu moins de données pour la cinétique de phagocytose au cytomètre en flux à cause de problèmes avec les étoiles de mer. Les résultats sont très variables (figure 33). Cependant, il semble que la cinétique de phagocytose au cytomètre suive celle obtenue en microplaque en fluorescence. Un même temps d'incubation de 18 h a été choisi.

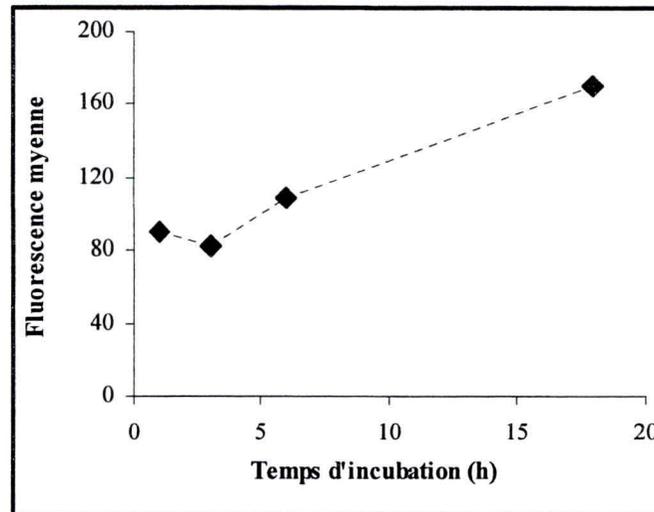


Figure 33 Effet du temps sur la phagocytose des amœbocytes de l'étoile de mer *L. polaris*. Les résultats sont exprimés en canal moyen du cytomètre en flux (densité optique).

b. Conditions d'incubation

Afin de connaître la température optimale de la phagocytose des amœbocytes, une comparaison entre une incubation à 4°C et 12°C a été effectuée (figure 34).

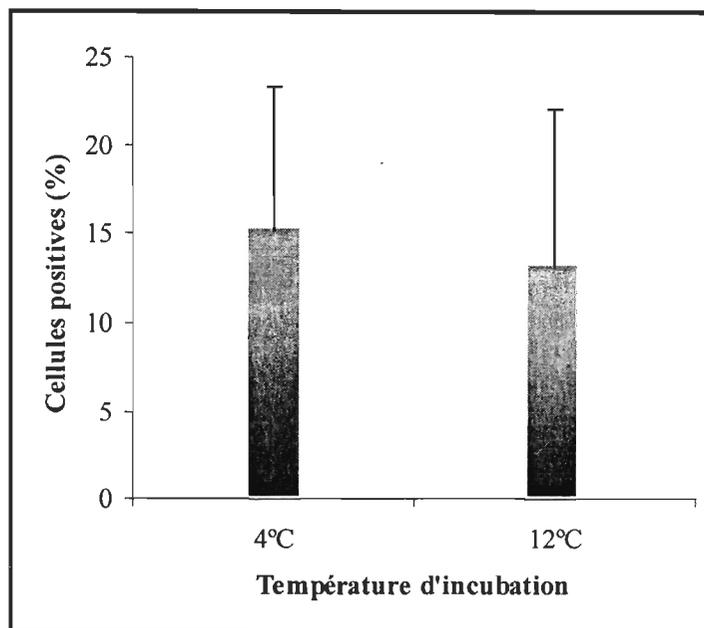


Figure 34 Effet de la température d'incubation des cellules sur la phagocytose *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocytés au moins 1 bille n =12. Aucune différence significative ($P = 0.07$).

Afin d'éviter des variations de température pour les cellules lors des manipulations, la température de 12°C a été choisie pour faciliter les manipulations car il n'y a pas de différences significatives entre les 2 températures d'incubation ($P = 0,07$). En effet, les cellules sont manipulées après 1h, 4h et 22h à partir du début de l'expérience. Il est plus facile de les maintenir tout le temps à 12°C plutôt qu'à 4°C. Il est important de mentionner l'importante variabilité de la phagocytose entre les individus. Cette variabilité est présente depuis le début des tests et persiste jusqu'à la fin des manipulations.

Bien que certains protocoles suggèrent de maintenir le milieu d'incubation en mouvement, cela ne s'applique pas aux essais avec les amœbocytes (figure 35).

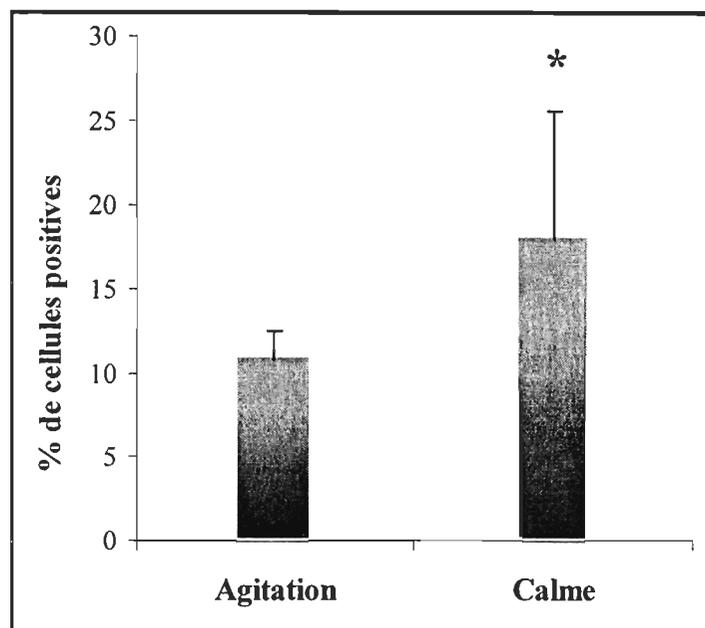


Figure 35 Effet du mouvement lors de l'incubation sur la phagocytose des amœbocytes de *L. polaris*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant au moins ingéré une bille. L'étoile indique une différence significative différente entre les deux groupes ($n = 3$, $P = 0,00459$).

Le maintien des cellules au calme améliore significativement la phagocytose des amœbocytes ($P=0,00459$). Ce résultat est cependant à prendre avec un bémol à cause du nombre restreint des répliquas (3). De plus, une forte variabilité de phagocytose entre les individus est observée. Dans le protocole final, les cellules sont maintenues sans agitation pendant toute la durée de l'expérience.