

Etude comparative en cytométrie en flux des fonctions estérases et du métabolisme oxydatif d'hémocytes d'huîtres saines, parasitées, sensibles et résistantes au protozoaire *Bonamia ostrea*

N. Cochennec-Laureau, S. Garcia et E. Bédier
Laboratoire de Génétique et Pathologie – La Tremblade

Pour lutter contre la Bonamiose, les moyens sont limités et sont essentiellement basés sur un diagnostic rapide et précoce permettant de réduire la propagation de la maladie et l'accroissement de la « résistance » par sélection génétique. Différents travaux sont réalisés pour tenter de comprendre les mécanismes de défense mis en jeu par les huîtres vis-à-vis de ce parasite, afin de proposer des solutions pour développer des méthodes de prophylaxie et de lutte.

Dans notre laboratoire nous nous intéressons plus particulièrement aux compartiments cellulaires, les hémocytes circulants, dans lesquels se multiplie *B. ostreae* et à leurs interactions avec le parasite. La répartition des types cellulaires présents, l'activité d'estérases non spécifiques et le métabolisme oxydatif ont été étudiés en cytométrie en flux chez des populations hémocytaires d'huîtres plates de statuts d'infection différents, saines, parasitées, sensibles et « résistantes ». Les résultats obtenus indiquent que la distribution hémocytaire est variable en fonction des animaux, en fonction de leur statut d'infection et en fonction de la technique utilisée, cytométrie en flux et microscopie photonique. Ces résultats soulignent la difficulté à déterminer sur la seule base de critères tinctoriaux et morphologiques des sous-populations hémocytaires. L'activité enzymatique des estérases et la flambée oxydative détectées essentiellement dans les hémocytes de type granuleux confirment l'existence de fonctions cellulaires différentes entre les types granuleux et agranuleux.

Bien qu'il existe une certaine variabilité individuelle, l'analyse d'hémocytes infectés, *in vivo*, et *in vitro* par le parasite *B. ostreae* ne permet pas de mettre en évidence d'augmentation significative d'activité de type estérase. La présence du parasite semble atténuer le métabolisme oxydatif des cellules. Ces résultats suggèrent que l'établissement et la multiplication de *B. ostreae* dans les hémocytes semblent, au moins en partie, liés à l'inhibition de certaines fonctions microbicides.

L'analyse comparative d'hémocytes provenant d'animaux sensibles et résistants montre une corrélation entre l'activité des hémocytes et le statut des animaux.

En conclusion, la cytométrie en flux nous a permis de disposer de techniques rapides et reproductibles pour caractériser l'état fonctionnel de populations cellulaires. D'autre part, ces résultats sont une première approche dans la compréhension des mécanismes développés par le parasite pour s'adapter aux conditions intracellulaires.

Etude en cytométrie en flux des fonctions des hémocytes des huîtres plates, *Ostrea edulis*

Comparaison de populations d'huîtres saines, parasitées et « résistantes » au parasite *Bonamia ostreae*

Nathalie Cochenec-Laureau, Sandrine Garcia, Edouard Bedier, Frédéric Blouin et Bruno Chollet

LGP - La Tremblade 

Objectifs : interactions hémocyte/*B.ostreae*

Hôte

Les hémocytes : professionnels de la phagocytose

Bonamia ostreae parasite intracellulaire obligatoire

parasite

Mieux comprendre les mécanismes cellulaires de défense et les stratégies élaborées par le parasite pour survivre dans les hémocytes → Recherche de marqueurs de sélection

Ce que nous avons déjà fait...



- **Caractérisation cytoenzymatique sur cellules centrifugées (post-phagocytaires)**
 - activités granulocytes > cellules agranuleuses
- **Cytologie comparative sur cellules centrifugées**
 - Pas de différence significative de **concentration cellulaire** entre huîtres sensibles et résistantes
 - **Corrélation** entre **statut de résistance** et **comptage différentiel** (% cellules agranuleuses)

Les problèmes les + importants...

Système circulatoire semi-ouvert

↳ variabilité importante des paramètres cellulaires



difficulté de choisir des marqueurs des capacités de défense pertinents de fonctions cellulaires (modifiés par les conditions à tester)

quantification limitée

analyse simultanée de plusieurs paramètres difficile

Comptage cellulaire différentiel

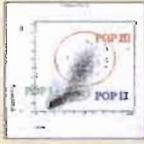
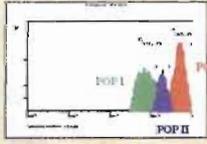
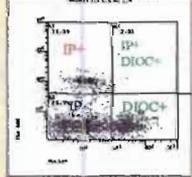




Figure 2 : dot plot : taille versus complexité montrant 3 populations (POP I, POP II, POP III).

Figure 3 : Graphe monoparamétrique utilisant la complexité seule pour différencier les populations. POP I, POP II and POP III représentent des cellules saines, avec un petit, et très complexes

Viabilité hémocytaire

Propidium iodure
10µg/ml
Intercalant ADN et ARN
Application : perméabilité cellulaire



Graph de phagocytose FL1 (phagocytosis) versus FL3 (propidium iodure).

Marqueurs fonctionnels d'activité enzymatique post phagocytaire

FDA esterase
fluorescein diacétate
50ng/ml (10min)
Complex non fluorescent $\xrightarrow{\text{esterase}}$ complex fluorescent

DCFH-DA
dichlorofluorescein diacetate
20µM (10min)
DCFH-DA non fluorescent $\xrightarrow{\text{esterase}}$ DCFH $\xrightarrow[\text{peroxydase}]{\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}}$ DCF(fluorescent)

Marqueurs fonctionnels

Activité oxydative des cellules agranuleuses et des granulocytes

Activité esterase des cellules agranuleuses et des granulocytes

Activités fonctionnelles *in vivo* de populations saines et parasitées

ACTIVITE ESTERASE

ACTIVITE DU METABOLISME OXYDATIVE

Estérase = Oxydative burst

Etude de la phagocytose de *Bonamia ostreae*

Control -

Control + *E. coli**

2H

18H

1:10 1:20 1:30

Etude de l'activité oxydative après phagocytose *in vitro*

Témoin négatif
Hémocyte - *Bonamia*

Témoin positif
Hémocyte + *Bonamia*

Activité *in vivo* = activité *in vitro*
La présence du parasite *Bonamia* inhibe en partie les activités oxydatives

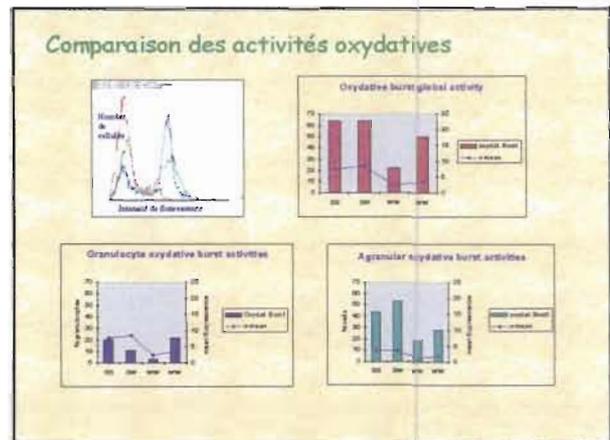
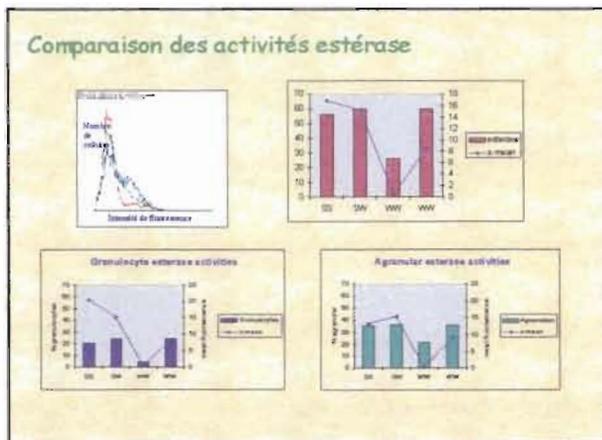
Comparaison de populations sensibles (WW) sensibles X sélectionnées (SW) et sélectionnées (SS)

Types hémocytaires

% cells

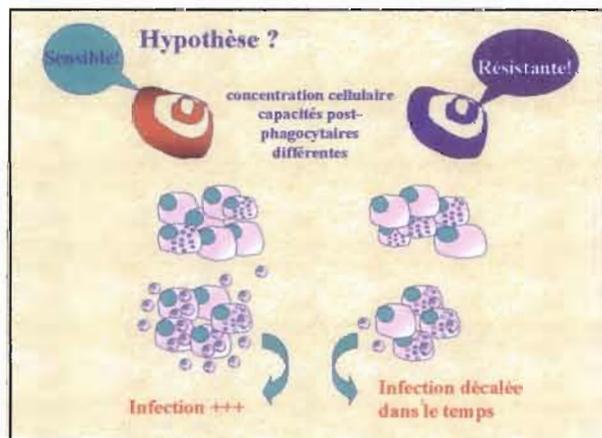
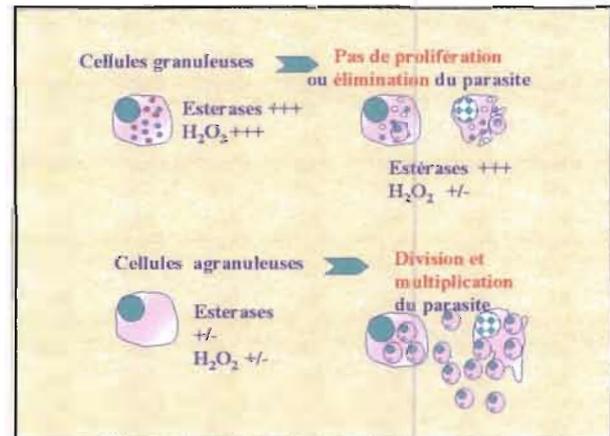
■ Granulocytes
■ Agranuleux

SS SW WW(+) WW(-)



Principaux résultats

- développement de tests quantitatifs pour évaluer les capacités cellulaires non spécifiques de défense
- activités enzymatiques corrélées au statut d'infection *in vivo* et *in vitro*
 - *Bonania itubae* oxydative burst
- statut de sensibilité corrélié avec activités enzymatiques importantes, en particulier dans les granulocytes



Perspectives

- Mise en évidence de différences fonctionnelles entre populations sensible et « résistante »
- Recherche d'animaux très sensibles (test de différentes populations sauvages)
- ➔ recherche de gènes de résistance au niveau moléculaire
- Analyser les différentes activités fonctionnelles de géniteurs et suivre la sensibilité de la descendance
- ➔ prédiction de la réponse