

Les parasites du groupe « Mikrocell » : Qui est qui ?

N. Cochennec-Laureau, F. Le Roux, F. Berthe et A. Thébault.
Laboratoire de Génétique et Pathologie – La Tremblade

La bonamiose, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae*, décime depuis 1979 les productions d'huîtres plates *Ostrea edulis* en France mais également en Europe et aux Etats Unis. Une autre espèce de *Bonamia* a également été rapportée en Nouvelle Zélande, en Australie et plus récemment au Chili. Au Canada et en Australie, deux autres parasites ont été décrits chez des huîtres creuses, respectivement *Mikrocytos mackini* et *Mikrocytos roughleyi*. Tous ces protozoaires de petite taille ont été regroupés sous le nom de « Mikrocell ». Pour la plupart, des descriptions en microscopies photonique et électronique ont été réalisées. Basées sur ces critères, différentes positions taxonomiques ont été proposées. Cependant ces analyses sont encore aujourd'hui sujettes à controverse.

Afin de compléter ces résultats nous nous sommes attachés à l'étude de gènes d'intérêt phylogénique, le gène 18S et l'ITS. A partir des premiers résultats obtenus les analyses phylogénétiques réalisées montre l'appartenance de la plupart de ces parasites aux parasites du genre Haplosporidia. Ces résultats ne sont pas sans conséquence sur la notion d'hôte sensibles et/ou porteurs et donc sur la définition des procédures d'échange entre les pays et des contrôles de ces maladies.

A l'heure actuelle, le diagnostic de ces différents parasites repose sur des examens cytologiques et histologiques et il est très difficile de pouvoir les différencier. De plus, ces techniques qui sont lourdes à mettre en œuvre et consommatrices de temps sont insuffisantes pour la détection des faibles niveaux d'infection.

Des techniques complémentaires d'identification et de diagnostic de ces parasites sont en cours d'élaboration (PCR, PCR-RFLP, Hybridation *in situ*).

Les parasites du groupe « Mikrocell », qui est qui?

N. Cochenec-Laureau, F. Le Roux, F. Berthe
et A. Thébault
IGP - La Tremblade



Répartition géographique des parasites du groupe « Mikrocell »



- *Bonamia ostreae*
- *Bonamia* sp.
- *Mikrocytos mackini*
- *Mikrocytos roughleyi*

	<i>B. ostreae</i>	<i>B.sp.</i>	<i>M. mackini</i>	<i>M. roughleyi</i>
Hôte naturel	<i>O. edulis</i>	<i>T. chilensis</i>	<i>V. gigas</i>	<i>V. angusticostatus</i>
Signes macro.	perforations branchies	pas de signes	abcès pustules manteau GD	abcès pustules manteau GD
Signes micro.	Infiltration généralisée	Infiltration localisée	Infiltration localisée	Infiltration localisée
Localisation tissulaire	hémocyte	hémocyte	hémocyte	tissu conjonctif

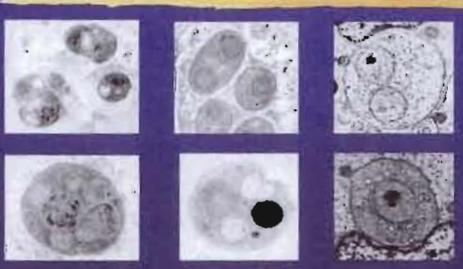
⚡ Quelques similarités mais absence
de critères spécifiques

Difficile à diagnostiquer...en photonique...

(Coupes hist. X 1000)



Difficile à identifier...en électronique...



M. roughleyi *B. ostreae* *M. mackini*

Comparaison des études en microscopie électronique

Organelles	<i>Bonamia ostreae</i>	<i>Bonamia</i> sp.	<i>M. mackini</i>
Intranuclear microtubules <i>(Mikrocytos)</i>	+	+	-
Multivesicular bodies <i>(Mikrocytos)</i>	+	+	-
Lipid bodies	+	+	-
Vacuolated stage	-	+	-

Taxonomie controversée : Haplosporidia ?

En dépit des nombreuses études morphologiques et ultrastructurales la taxonomie des « Mikrocells » reste incertaine



- haplosporosomes
- stades plasmodiaux (Brehelin, 1987)



- Absence de spores
- organismes extracellulaires
- pas de reproduction expérimentale

De quoi avons-nous besoin?



- De les identifier clairement et avec certitude
- De mieux comprendre les relations phylogénétiques : quels genres, quelles espèces ??
- De mettre au point des outils de détection spécifiques

Résultats

B. ostreae
1962 pb



B. sp
1970 pb



M. roughleyi
1134 pb

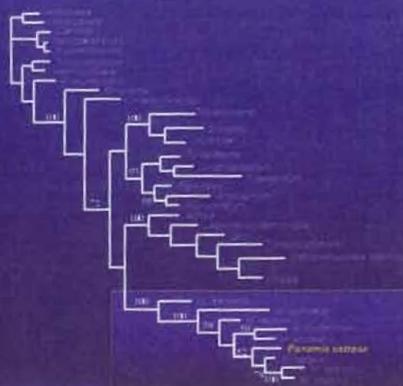


Alignements
18S
(Clustalw)

Similarité de
M. roughleyi :

95.21% *B. ostreae*
98.44% *B. sp*

Analyse phylogénétique



Analyse phylogénétique des parasites *Bonamia ostreae* et *Mikrocytos roughleyi* (au sein des haplosporidians)



Sonde spécifique de genre en hybridation *in situ*

B. ostreae Bonamia sp.

Haplosporidium nelsoni

Profils en RFLP

HaeII

BglI

BO

BOas

B. ostreae B. sp. M. roughleyi

PCR: 300pb 304pb 304pb

BglI

HaeII

En résumé

- Nécessité de compléter les études ultrastructurales pour préciser la taxonomie (critères ultrastructuraux insuffisants)
- *Bonamia ostreae*, *Bonamia* sp. et *Mikrocytos roughleyi* regroupés au sein des Haplosporidia : 3 espèces de *Bonamia* ?
- Outils de détection spécifiques d'espèce : PCR-RFLP

Perspectives

- Validation des outils : frottis, coupes histologiques et hybridation *in situ*
 - applicabilité au diagnostic de routine
- Mise au point de sondes spécifiques d'espèce en HIS
- Utilisation de ces outils pour analyser le cycle de *Bonamia*