

Etude des interactions entre le parasite *Bonamia ostreae* et son hôte, huître plate *Ostrea edulis in vitro*.

Benjamin Morga, Isabelle Arzul, Bruno Chollet, Béatrice Gagnaire
et Tristan Renault



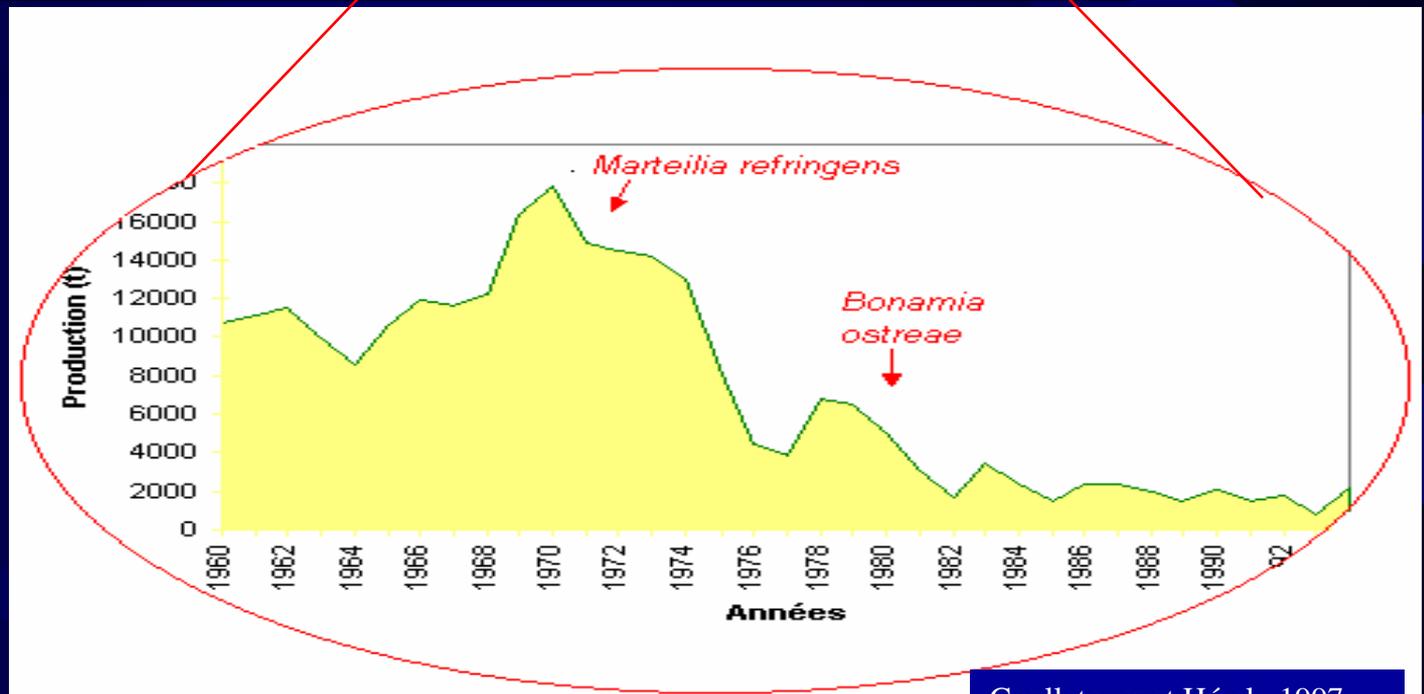
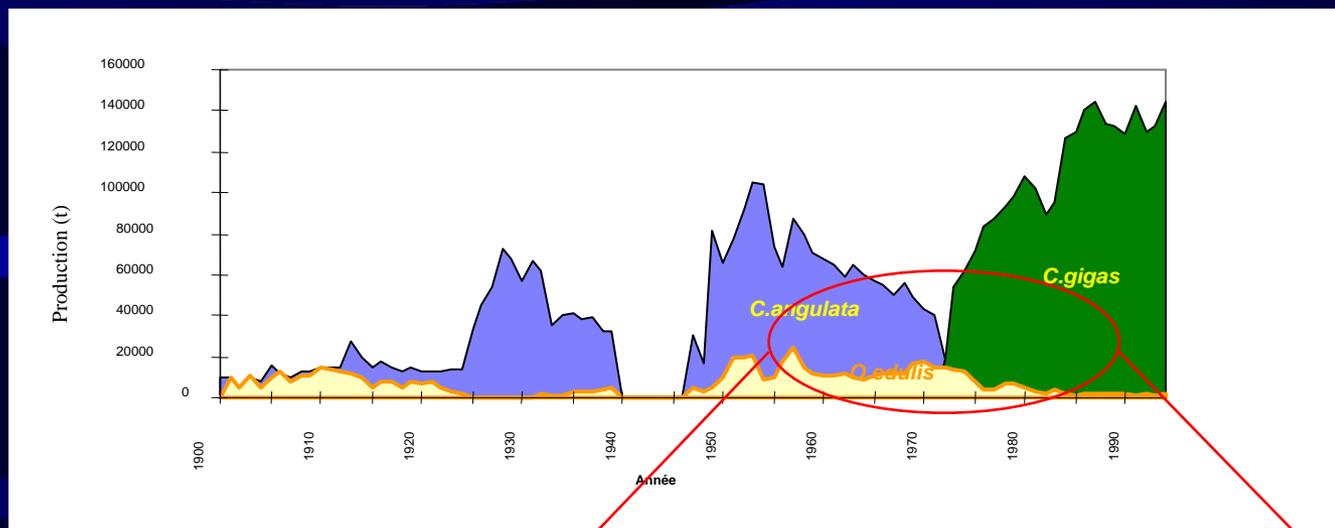
45ème Colloque du GPLF Station Biologique Roscoff 29 Mai 2007

La bonamiose

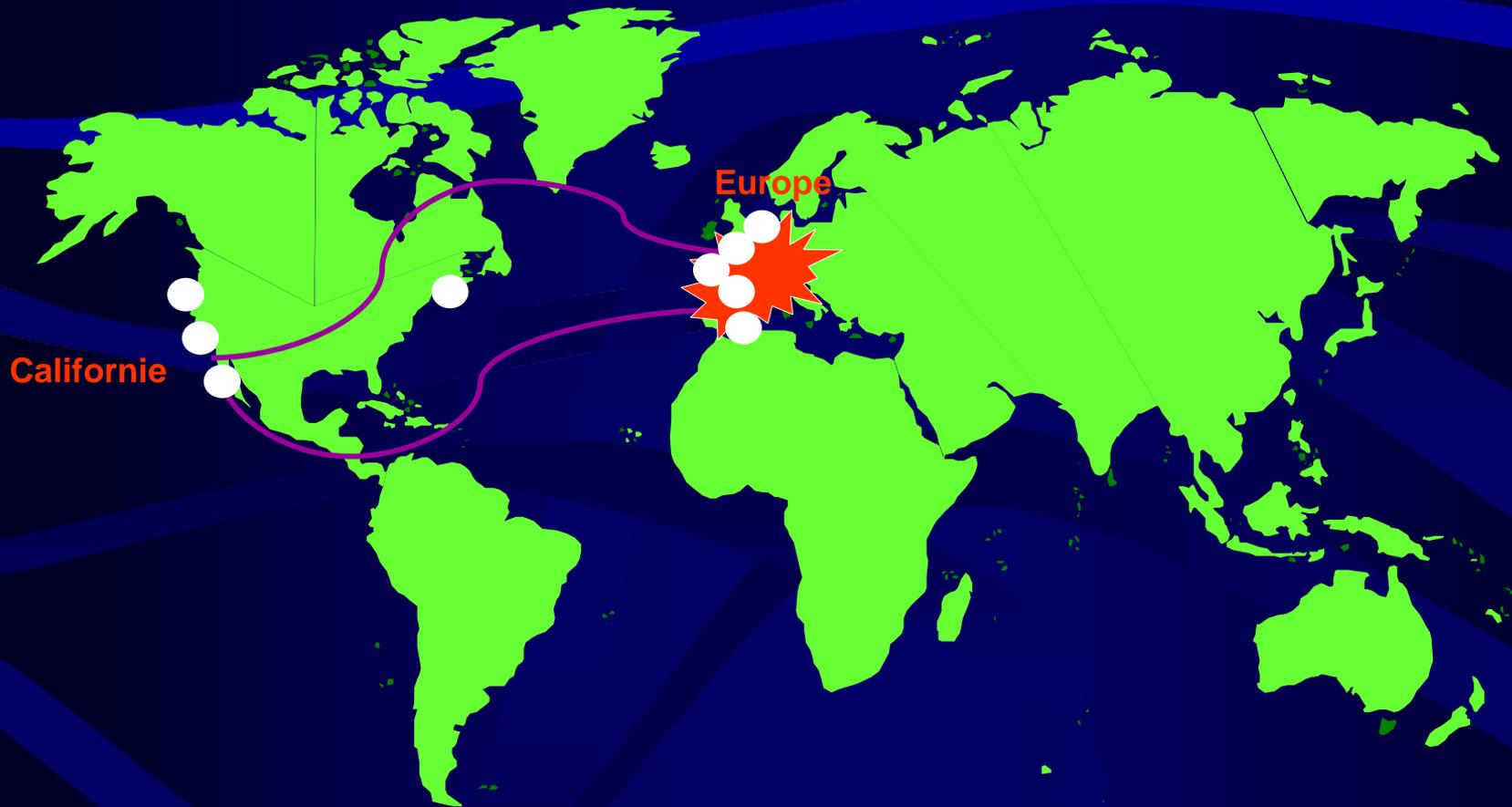
Etat de l'art:



Histoire de la production d'huître en France



Distribution géographique: *Bonamia ostreae*



- Introduction de *Bonamia ostreae* suite à un transfert d'huître plate *Ostrea edulis* provenant de californie.

● *Bonamia ostreae*

Bonamiose

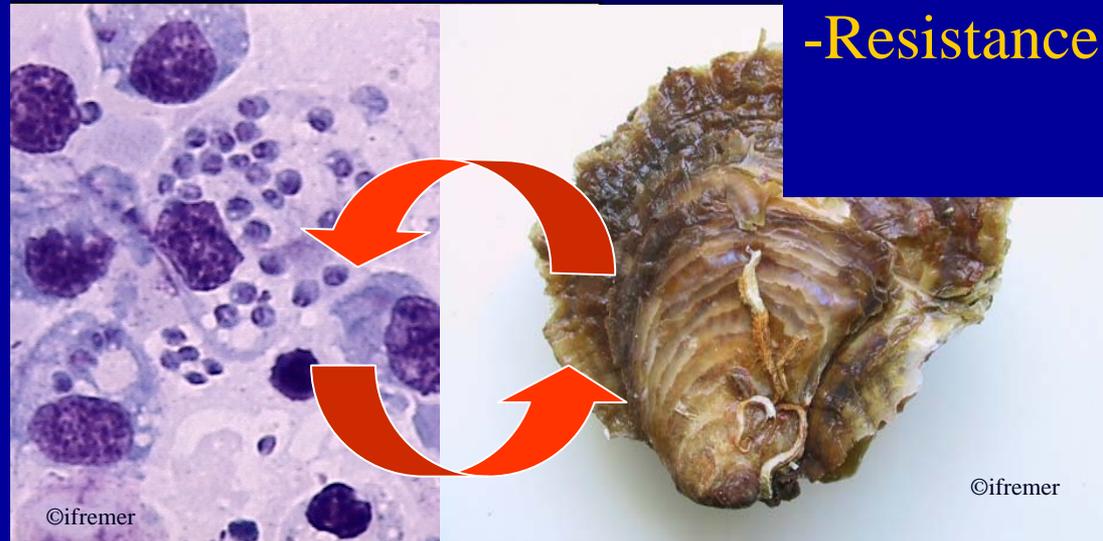


- Maladie à déclaration obligatoire à l'OIE et auprès de la Commission Européenne (Annexe A de la Directive 91/67/EC)
- Le parasite appartient au groupe des Haplosporidies (Phylum des cercozoaires Cavalier et Smith 2005)
- Hôte naturel est l'huître plate *Ostrea edulis*
- Pas d'hôte intermédiaire nécessaire
- Cellules hôtes: hémocytes

Relation entre l'hôte et le parasite au niveau macroscopique

- Transmission directe
- Détection du parasite après 3-5 mois
- Mortalité observée à partir de 2 ans et plus
- Resistance sélection génétique-
NaciriGraven, Y., et al. (1998)

- Cycle?
- Resistance?



Relation entre l'hôte et le parasite au niveau microscopique

-Après infection *in vitro* le parasite est phagocyté mais pas détruit (Chagot 1989 et Mourton et *al.*,1992).



-Parasite induit un effet sur les activités hémocytaires (inhibition activité des esterase et production d'EOR. (Cochennec 2000)

Objectif général

- Mieux comprendre l'évolution de la maladie chez l'huître.
- Amélioration de la connaissance des interactions entre les hémocytes et le parasite.

Matériel biologique

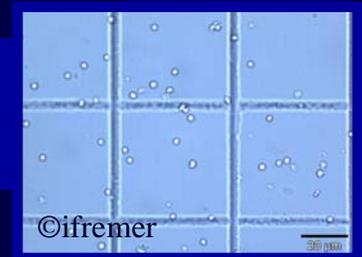
Animaux:

-Huîtres plates *Ostrea edulis* (origine Quiberon)



Ponction d'hémolymphe

-Purification de *Bonamia ostreae* (Mialhe *et al.* 1988)



-Inactivation du parasite:

-Chaleur 15min 100°C

Méthode

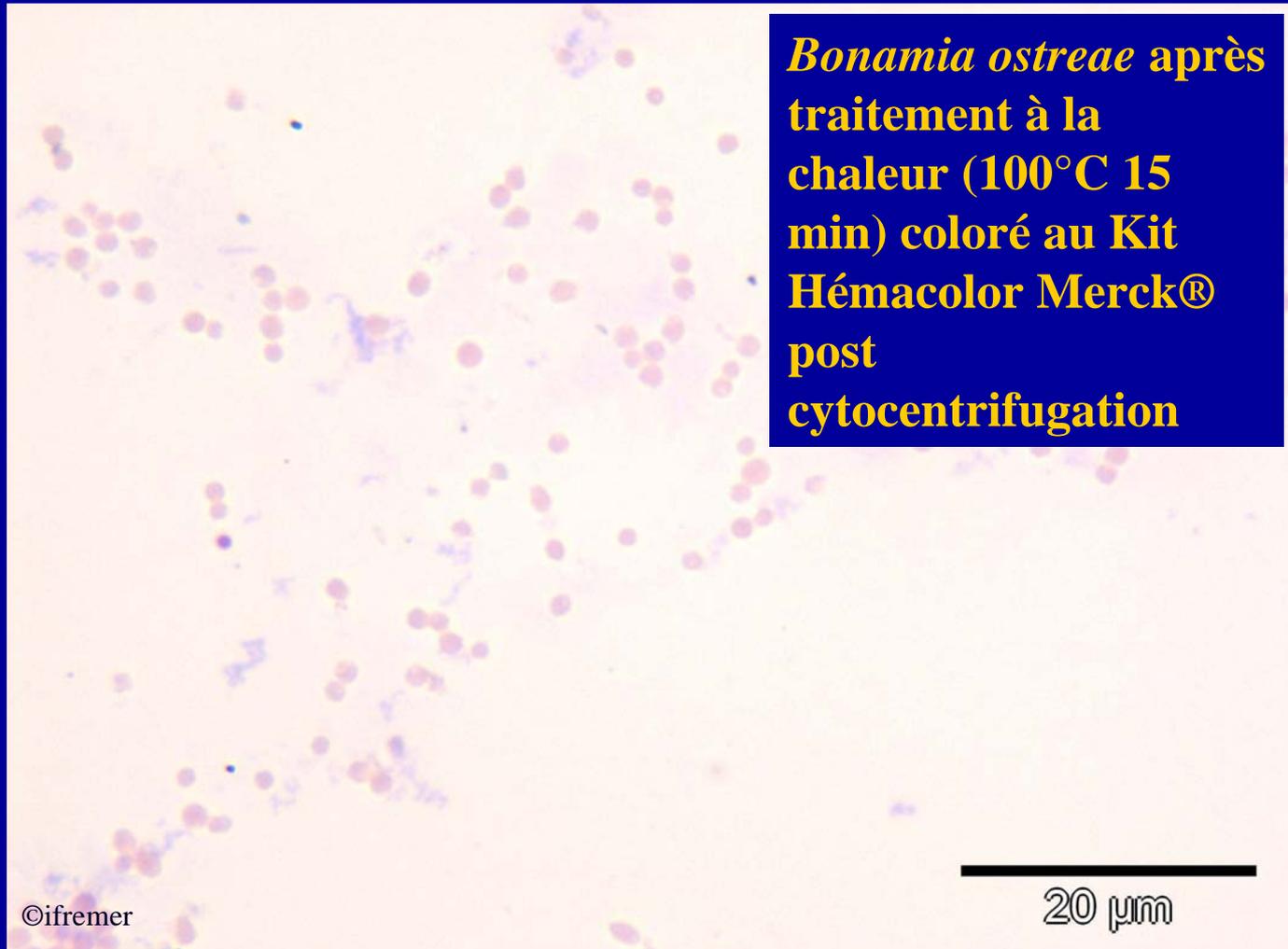
- Mise en contact 2h concentration de 500000 cellules par mL (1 hémocyte pour 5 bonamia et 1 hémocyte pour 10 bonamia).
- Cytocentrifugation
- Marquage des cellules.
- Analyse au cytomètre Beckman Coulter EPICS XL 4.

Méthode

- Utilisation de fluorochromes:
 - **Iodure de propidium** (viabilité des cellules)
 - **Fluoresceine DiAcetate** (activité des estérases non spécifiques)
 - **Dihydrorhodamine 123, DCFH-DA** (production d'EOR)
 - **Billes 1 μm marquées à l'isothiocyanate de fluoréscéine** (activité phagocytaire)

Résultats

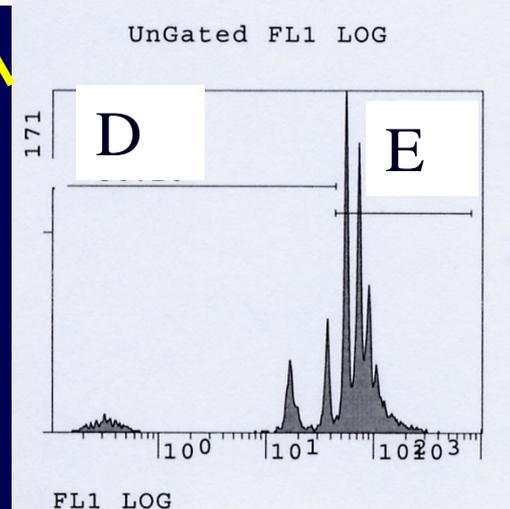
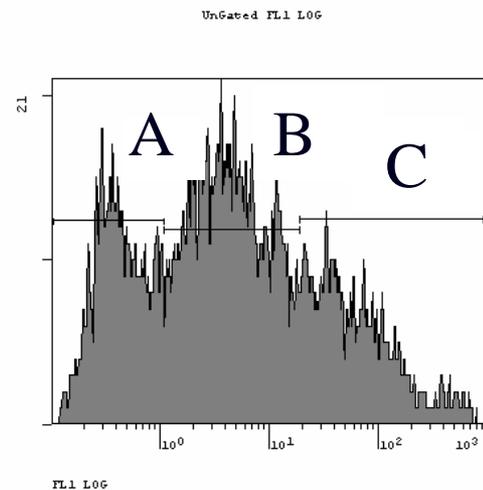
- Ina



Résultats

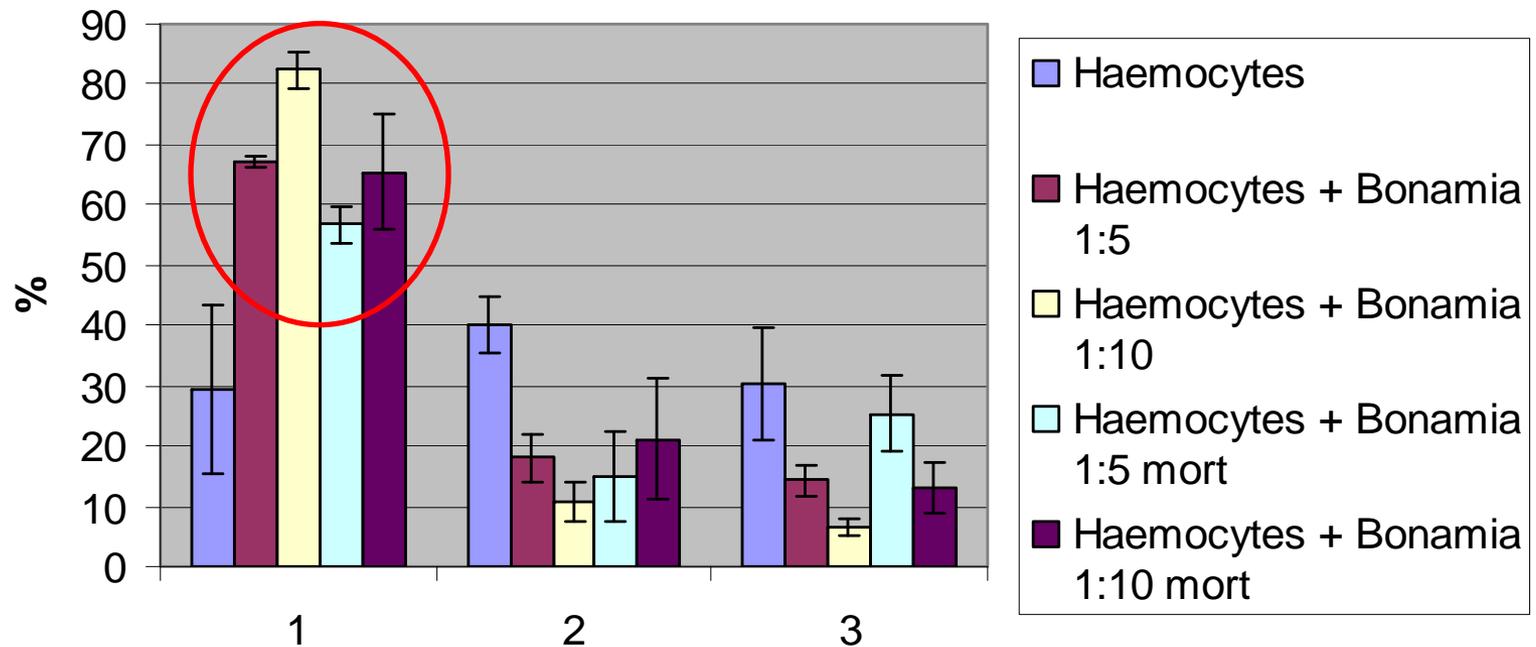
- Activités hémoctaires:

Activité des estérases			Production des EOR			Activité phagocytaire		Présence de lysosomes		
A	B	C	A	B	C	D	E	A	B	C
21.9%	48.2%	29.4%	11.5%	79.9%	13.80%	48.3%	51.70%	21.9%	56.2%	22.4%



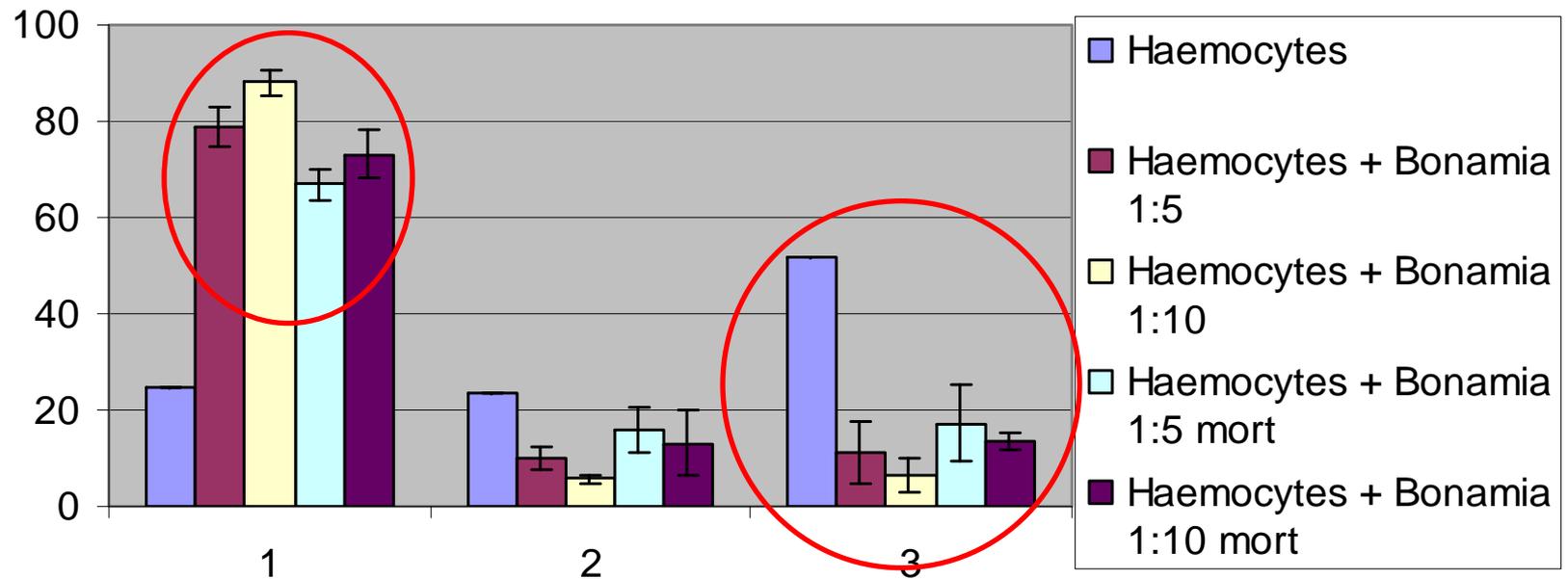
Résultats Mise en contact 2h

Mesure de l'activité des estérases



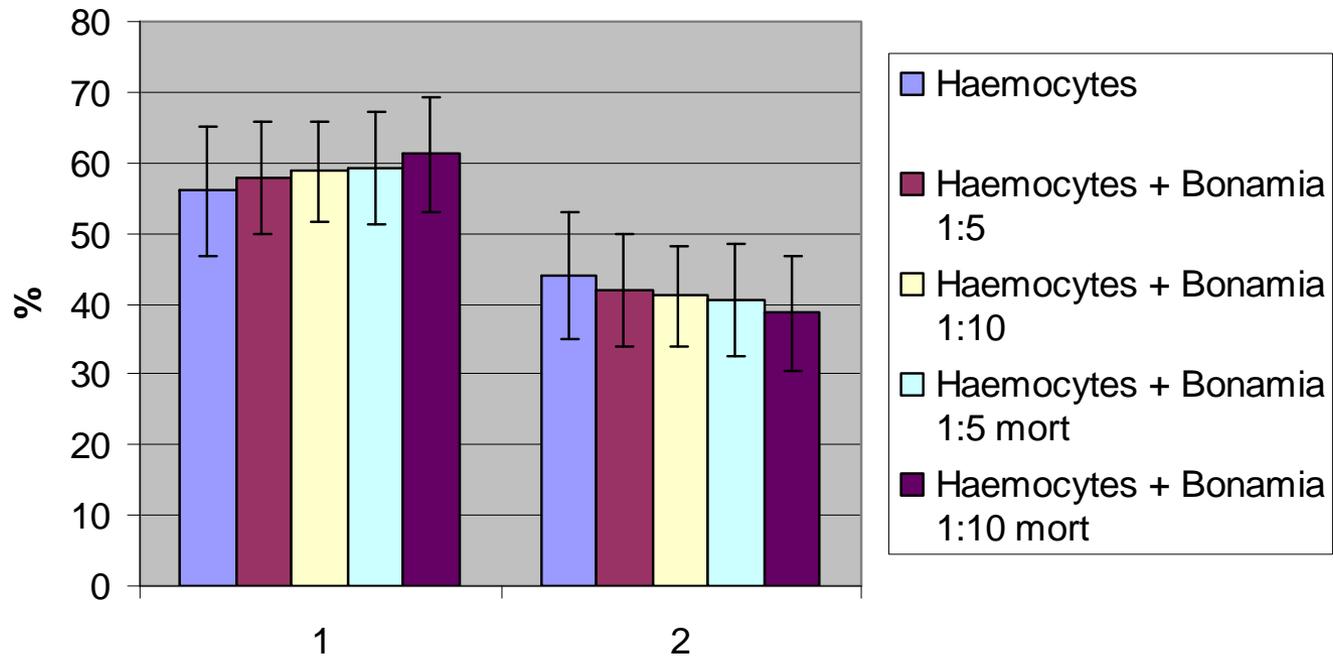
Résultats Mise en contact 2h

Production d'espèces oxygénées réactives au sein des hémocytes

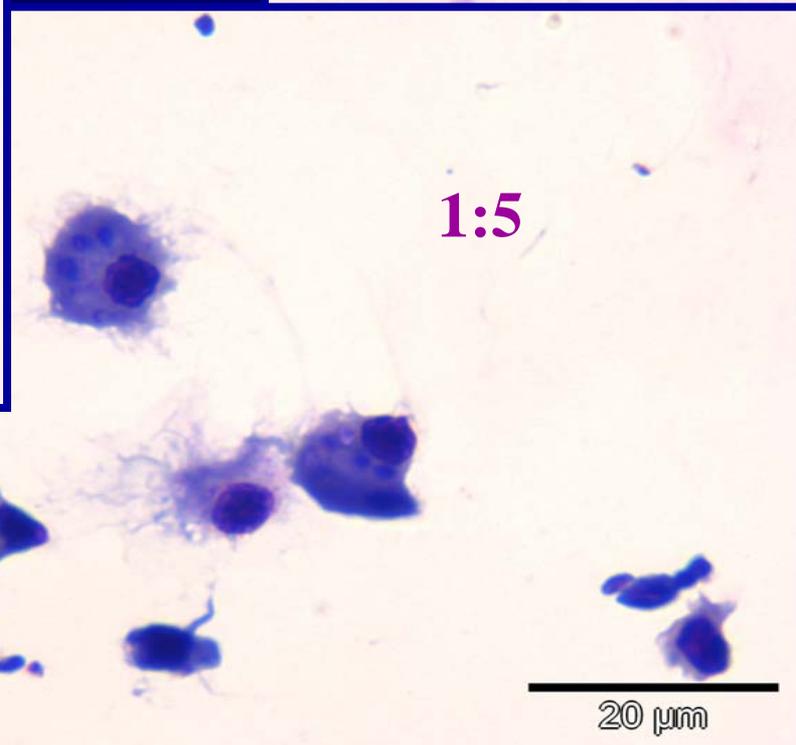
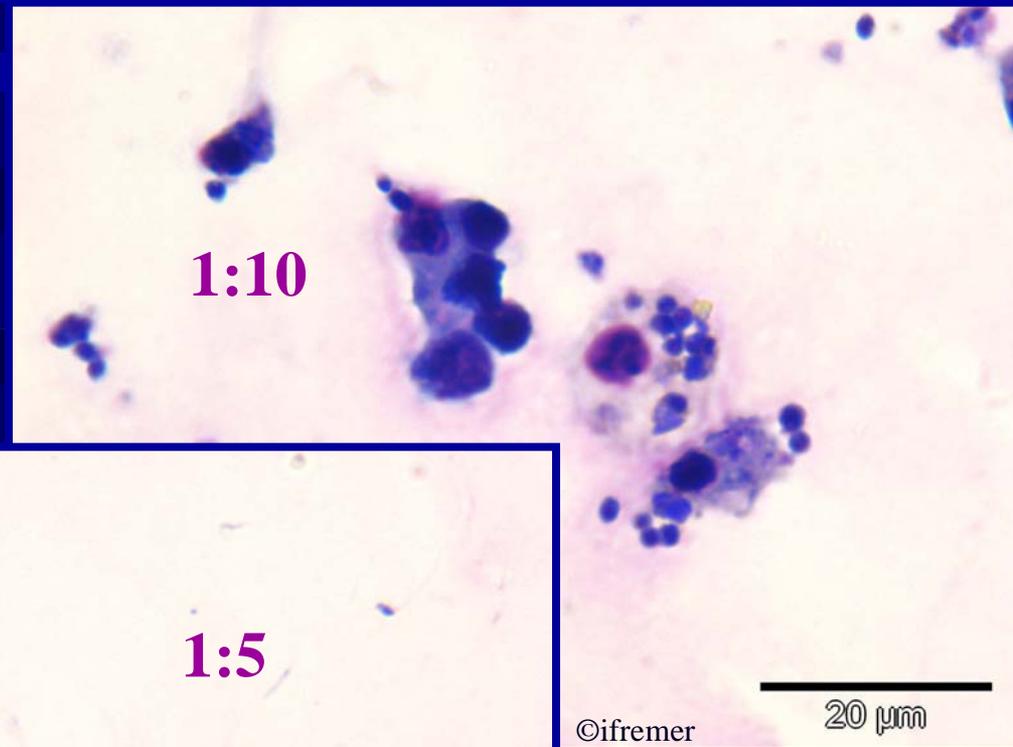
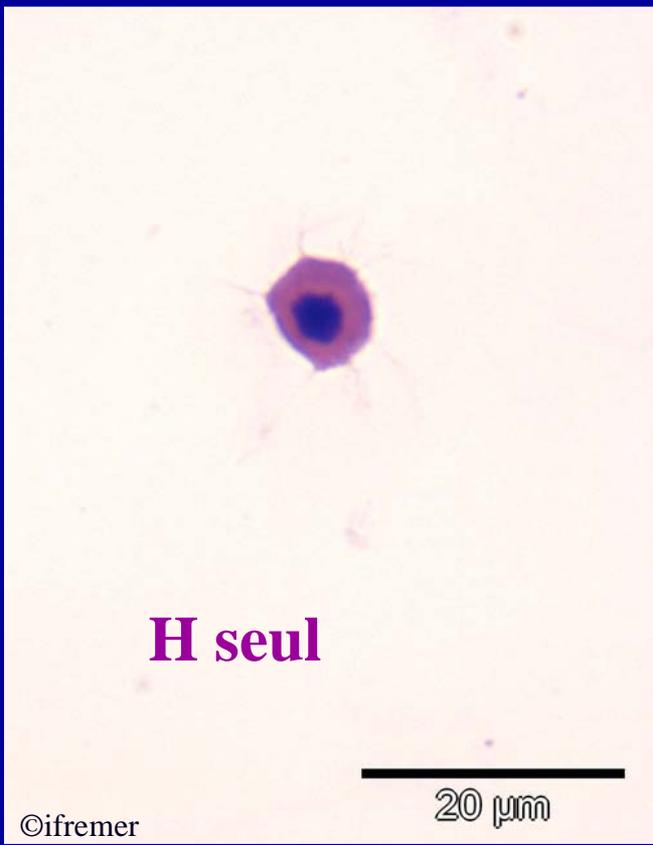


Résultats Mise en contact 2h

Mise en évidence de l'activité phagocytaire des hémocytes



Observations microscopiques



Observations microscopiques

1:5*

1:10*

©ifremer

20 μ m

20 μ m

Discussion

- Protocole établi pour les activités hémocytaires (discriminant;sensibilité).
- Modification des activités en présence du parasite.
- Résultats similaire avec ceux de Cochenec (2001).
- Inhibition d'EOR caractéristique des parasites tel que *Toxoplasma gondii*.
- Production antioxydants afin d'inhiber la production d'EOR par l'hôte (Murray 1985, Sunder et *al.*2006, Brydges et Carruthers 2003, Kwok et *al.*2004)
- Observation microscopique confirme l'internalisation du parasite mort et vivant

Perspectives

- Réalisation d'une mise en contact en cinétique (30min, 2h, 4h, 6h et 12h)
- C.gigas et huîtres résistantes