

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

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



*Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer (IFREMER)
Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) 17390 La Tremblade, France

Ifremer

Introduction

L'huître plate *Ostrea edulis* était le fleuron de la production ostréicole française jusqu'à l'apparition de deux maladies dues aux protozoaires *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* dans les années 70. Ces maladies ont sévèrement réduit la production d'huîtres plates de **20 000 t par an en 1970 à moins de 2 000 t aujourd'hui** (fig. n°1). Le parasite *Bonamia ostreae* appartient au groupe des Haplosporidies (Phylum des cercozoaires) (Cavalier-Smith 2003). L'hôte naturel est l'huître plate *Ostrea edulis*, les cellules hôtes sont les **hémocytes** (fig. n°2 et 3). Les moyens de lutte contre la bonamiose sont relativement restreints et nécessitent une bonne connaissance du cycle de vie de *Bonamia ostreae*, et plus particulièrement des interactions du parasite avec son hôte.

La mise en contact d'hémocytes et de parasites vivants ou morts nous ont permis de décrire ces interactions *in vitro* en microscopie photonique et cytométrie de flux.

Matériel biologique

-Les huîtres plates *Ostrea edulis* proviennent de la Baie de Quiberon (Morbihan). L'hémolymphe a été prélevée au niveau du muscle adducteur, un pool d'hémolymphe provenant de huit huîtres est filtré à 75µm.

-Le parasite a été purifié selon le protocole de Mialhe *et al* (1988) à partir d'huîtres infectées.

-Le parasite a été inactivé à la chaleur à 100°C pendant 15 minutes.

Plan expérimental

Les hémocytes (500000 cellules par millilitre) ont été mis en contact avec le parasite vivant ou mort pendant deux heures à 15°C, à deux concentrations cinq ou dix parasites par hémocytes. Ensuite les hémocytes ont été marqués par des fluorochromes spécifiques de façon à mesurer les activités suivantes : activité des estérases, production d'espèces oxygénées réactives (EOR), activité phagocytaire et la viabilité des cellules. Les mises en contact ont été réalisées trois fois en tri répliquats.

Résultats

Les observations microscopiques des hémocytes mettent en évidence une internalisation des parasites vivants ou morts (fig. n°4). Le nombre de parasite varie en fonction de la concentration en parasite (fig. n°4a et 4b).

La cytométrie en flux montre que la présence de parasites vivants ou morts induit une diminution significative de l'activité des estérases et de la production des EOR (fig. n°5 et 6). L'activité phagocytaire ne révèle aucune différence entre les différentes conditions testées, environ 40% des hémocytes ont phagocyté trois billes et plus après deux heures de mise en contact (fig. n°7).

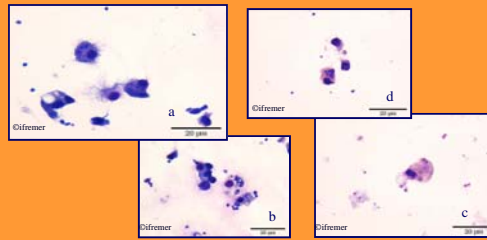


Fig n°4: Coloration à Hémacolor® sur lame histologique après cytocentrifugation et grossissement (x100).
a hémocyte+parasites ratio 1 pour 1, b hémocyte+parasites ratio 1 pour 5, c hémocyte+parasites mort ratio 1 pour 10, d hémocyte+parasites mort ratio 1 pour 10

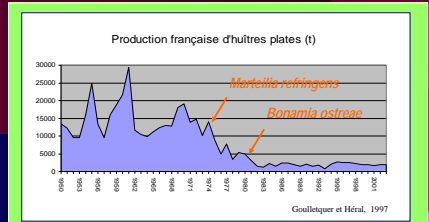


Fig n°1: Production française d'huîtres plates de 1950 à aujourd'hui.

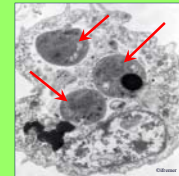


Fig n°2: *Bonamia ostreae* intrahémocytaire observé en microscopie électronique à transmission.

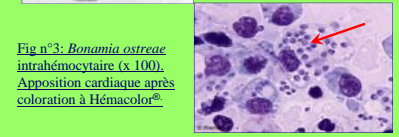


Fig n°3: *Bonamia ostreae* intrahémocytaire (x 100). Apposition cardiaque après coloration à Hémacolor®.

Analyses

Après cytocentrifugation et coloration à Hémacolor®, une observation microscopique a été effectuée pour les différentes mises en contact.

Les activités hémocytaires ont été analysées à l'aide du cytomètre Beckman coulter EPICS XL 4. Les fluorochromes utilisés sont les suivants: l'iode de propidium, la Fluoresceine DiAcetate, le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) et des billes 1 µm marquées à l'isothiocyanate de fluoréscéine.

Les résultats représentent la moyenne des répliquats des trois mises en contact pour chaque activité en fonction de la fluorescence des cellules

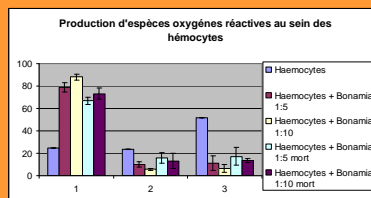


Fig n°5: Histogramme représentant la production des EOR.

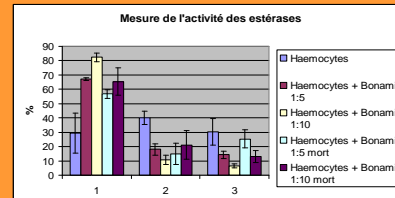
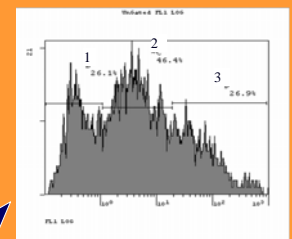


Fig n°6: Histogramme représentant l'activité des estérases.



Cytogramme représentant les trois classes de cellules 1 cellules non fluorescentes, 2 cellules moyennement fluorescentes et 3 cellules fortement fluorescentes.

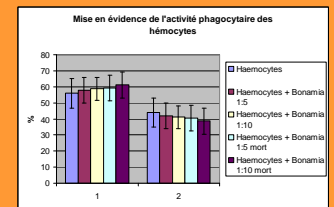


Fig n°7: Histogramme représentant l'activité phagocytaire (1 correspond à des cellules ayant phagocytées moins de 2 billes et 2 à des cellules ayant phagocytées trois billes ou plus).

Discussion

Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution significative des activités des estérases des hémocytes en présence du parasite (vivant ou mort) ainsi qu'une inhibition de la production d'espèces oxygénées réactives. Des résultats comparables ont été décrits chez le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii*, comme la présence d'inhibition de la production d'EOR (Shrestha, 2006). De même *Bonamia ostreae* semble développer des mécanismes similaires afin d'éviter sa dégradation par les hémocytes. Le parasite vivant ou mort n'induit pas de variation de l'activité phagocytaire après deux heures de mise en contact. Les observations microscopiques confirment l'internalisation du parasite vivant ou mort. Ces résultats mettent en évidence les mécanismes développés par le parasite pour éviter sa dégradation par les hémocytes. Cette étude doit être complétée par la réalisation d'une cinétique des activités hémocytaires après mise en contact avec parasite vivant ou mort afin d'apprécier l'évolution de ces activités dans le temps.

Cavalier-Smith, T. and E.F. Chao (2003), "Phylogeny of choanozoans and early eukaryote mega evolution" J. Mol. Evol. 56(5): 540-63.

Mialhe, E., et al. (1988) Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71, pp. 293-299.

Shrestha, S.P., et al. (2006) Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages *in vivo* is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *Int J Parasitol* 36, 433-441