

Rapport d'activité 1997

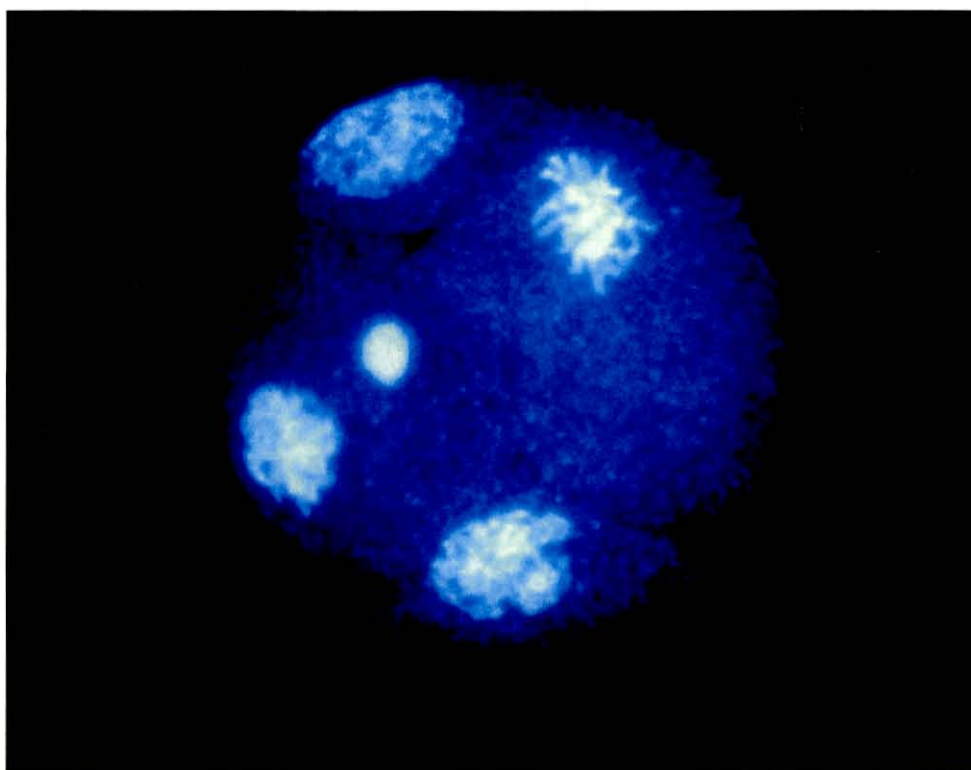
du laboratoire

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

GENETIQUE AQUACULTURE et PATHOLOGIE

DRV / RA / GAP

La Tremblade



Station IFREMER
Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tél. : 05 46 36 98 36

Fax. : 05 46 36 37 51



Rapport d'activité 1997
du laboratoire
GENETIQUE, AQUACULTURE et PATHOLOGIE
DRV / RA / GAP
La Tremblade

Station IFREMER
Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tél. : 05 46 36 98 36

Fax. : 05 46 36 37 51

[http : //www.ifremer.fr/gap/gap.htm](http://www.ifremer.fr/gap/gap.htm)

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
AVANT-PROPOS	4
OBJECTIFS ET PROGRAMMES	5
Objectifs	5
Programmes.....	5
MOYENS ET EFFECTIFS	7
Personnel scientifique.....	7
Personnel administratif et logistique.....	8
Stagiaires	8
Budgets 1997.....	9
Infrastructures.....	10
Matériel.....	10
PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1997	13
THÈME : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER CÔTIÈRE.....	13
<i>Programme : Surveillance et évaluation des ressources côtières</i>	13
Sous-programme : Suivi des maladies des mollusques.....	13
Suivi zoosanitaire et mortalités (cellule de veille de La Tremblade).....	13
REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques).....	14
Laboratoire communautaire de référence.....	15
THÈME : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUICOLES.....	19
<i>Programme : Santé des populations d'élevage</i>	19
Sous-programme : Mécanisme de défense.....	19
Bonamiose.....	19
THÈME : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUICOLES.....	21
<i>Programme : Santé des populations d'élevage</i>	21
Sous-programme : Agents pathogènes et épidémiologie.....	21
Pathologie à virus de type herpès.....	21
Marteiliose.....	24
Perkinsus atlanticus.....	25
Etudes bactériologiques.....	25
Gènes et vecteurs d'expression.....	26
Encéphalite du loup.....	28
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUICOLES.....	31
<i>Programme : Amélioration génétique des espèces aquicoles</i>	31
Sous-programme : Ressources génétiques.....	31
Marqueurs génétiques.....	31
Ressources génétiques des huîtres creuses.....	32
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUICOLES.....	35
<i>Programme : Amélioration génétique des espèces aquicoles</i>	35
Sous-programme : Amélioration & sélection de souches.....	35
Polyploidisation.....	35
Sélection de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i>	36
Sélection de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	39
FONCTIONNEMENT GENERAL DU LABORATOIRE	43
Animation scientifique.....	43
Fonctionnement de REGEMO.....	43

Fonctionnement de REPAMO.....	43
Fonctionnement de REMORA.....	43
Activités d'avis ou d'expertise.....	44
Participation à des groupes de réflexion.....	44
Assistance scientifique.....	44
Assistance technique.....	45
Astreintes.....	45
Coopération internationale.....	45
Manifestations.....	45
Visites.....	45
Accueil de chercheurs.....	46
Missions à l'étranger.....	46
Réunions contrats CEE.....	46
Formation diplômante.....	47
Formations reçues.....	47
Formations dispensées.....	47
Revue d'articles et de projet.....	48
Jury de thèse ou de mémoire d'étudiant.....	48
PUBLICATIONS 1997.....	49
Revue à comité de lecture.....	49
Colloques et congrès.....	50
Autres types de rapports.....	51
Thèses et mémoires.....	52
Mémoires d'étudiants.....	52
Documents techniques, plaquettes, lettres aux médias.....	53
Rapports intermédiaires de contrat ou de convention.....	53
Vulgarisation.....	54



AVANT-PROPOS

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station IFREMER de La Tremblade regroupe les implantations de Mus-du-Loup et de Ronce-les-Bains. Elle est composée de trois laboratoires qui développent des recherches dans les domaines de l'ostréiculture et de l'environnement littoral.

Le laboratoire *Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP)*, spécialisé en génétique et pathologie des bivalves marins, est rattaché au **Département des Ressources Aquacoles** lui même placé sous la **Direction des Ressources Vivantes** de l'IFREMER.

Dans le cadre d'un vaste plan de réorganisation du département Ressources Aquacoles, une restructuration du laboratoire a été décidée en mai 1996. Elle n'a toujours pas été entérinée au niveau administratif car elle doit recueillir l'assentiment de tous les niveaux hiérarchiques. L'absence de décision n'affecte pas la vie scientifique quotidienne mais elle ne simplifie pas sa gestion administrative et humaine.

Avant mai 1996, le laboratoire GAP était composé de 4 Unités de Recherche :

- l'Unité de Recherche en Génétique (URGE),
- l'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (URAPC),
- l'Unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (URAPL),
- l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG),

il a théoriquement été éclaté en trois laboratoires distincts:

- le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP) sous la direction d'André GERARD,
- le laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (RCPC) sous la direction de Philippe GOULLETQUER,
- le laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (RCPL) sous la direction de Jean-Pierre BAUD.

Ce rapport d'activité tient compte de ces remaniements car il doit être avant tout le reflet de la vie quotidienne du laboratoire, il est également structuré de manière à présenter les programmes selon la nomenclature établie dans le cadre du plan stratégique de l'IFREMER (1996-2000).

OBJECTIFS ET PROGRAMMES

Objectifs

Les principaux objectifs du laboratoire, visent essentiellement à développer des programmes chez les mollusques bivalves marins dans les domaines de :

- **la pathologie** : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.

et de

- **la génétique** : obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions ; création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises ; testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture.

Toutefois, la position de laboratoire thématique de référence en matière de pathologie et de génétique implique que certaines de nos études ou actions de recherche débordent du cadre stricte des mollusques.

Programmes

Le plan stratégique 1996-2000 de l'IFREMER fixe quatre axes stratégiques et les actions de développement technologique et industriel de l'Institut. Dans ce cadre, onze thèmes fédérateurs regroupant les grands objectifs et domaines d'intérêt prioritaire de l'Institut ont été définis.

Les axes de recherche du laboratoire GAP s'inscrivent dans deux de ces thèmes, eux-mêmes subdivisés en programmes et sous-programmes dans lesquels on retrouve les projets et actions de programme :

- Thème : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER COTIERE.

Programme 2 : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

Sous-programme 2 : Suivi des maladies des mollusques.

⇒ Contrôle de l'évolution des épidémies pour les maladies à déclaration obligatoire (Bonamiose et Marteiliose).

- ⇒ Etiologie des mortalités anormales survenant en bassins ostréicoles, en écloséries ou nurseries.
- ⇒ Contrôle des produits destinés à l'exportation et à l'importation.
- ⇒ Organisation et réalisation des tâches qui incombent au Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des mollusques bivalves.

- Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

- Programme 3 : Santé des populations d'élevage.

- Sous-programme 1 : Mécanismes de défense.

- ⇒ Bonamiose et mécanismes cellulaires de défense.

- Sous-programme 2 : agents pathogènes et épidémiologie.

- ⇒ Pathologie à virus de type herpès.
 - ⇒ Etude de la Martelliose.
 - ⇒ Etudes bactériologiques

- Programme 4 : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

- Sous-programme 1 : Ressources génétiques.

- ⇒ Acquisition et utilisation des marqueurs génétiques hypervariables chez les espèces marines.
 - ⇒ Conservatoire de souches de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

- Sous-programme 2 : Amélioration & sélection de souches.

- ⇒ Sélection pour une résistance de l'huître plate *Ostrea edulis* à la bonamiose.
 - ⇒ Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères physiologiques.
 - ⇒ Obtention et testage de polyploïdes.

MOYENS ET EFFECTIFS

Personnel scientifique

De nouvelles modifications ont été enregistrées en cours d'année dans l'effectif du laboratoire. Yamama NACIRI-GRAVEN qui avait pris un congé sans solde à partir du mois d'octobre 1996, a finalement donné sa démission à l'issue de celui-ci. Pendant son congé sans solde, elle a été remplacée par Marc BARRE, son remplacement définitif est prévu pour le début de l'année 1998. Nathalie COCHENNEC, en congé de maternité pendant 6 mois, a été remplacée par Cécile LIPPART. Philippe HAFFNER a quitté le laboratoire pour celui de Tahiti en fin d'année, il a été remplacé par Frédéric BLOUIN de retour de Martinique.

En cours d'année, nous avons accueilli deux nouveaux thésards :

- Magalie WAECHTER dans le cadre d'une thèse CIFRE entre l'IFREMER, Grainocéan et l'Université de La Rochelle,
- Arnaud HUVET dans le cadre d'une thèse de l'Université de Tours financée par l'IFREMER.

Enfin, dans le cadre des mandats du "laboratoire de référence pour les maladies des mollusques bivalves", nous avons accueilli en séjour post-doctoral Catherine COLLINS de l'Université de Cork en Irlande pour une durée de 9 mois.

Responsable	André GERARD	IFREMER
Cadres	Marc BARRE Franck BERTHE Pierre BOUDRY Claude DELSERT Emmanuel GOYARD Yamama NACIRI-GRAVEN Tristan RENAULT Anne THEBAULT	GIE/RA en CDD jusqu'au 1/10/97 IFREMER IFREMER GIE/RA (en poste à Sète dans le cadre de l'URM 16) GIE/RA GIE/RA congé sans solde puis démission au 1/10/97. GIE/RA IFREMER
Techniciens	Frédéric BLOUIN Nathalie COCHENNEC Bruno CHOLET Philippe HAFFNER Serge HEURTEBISE Christophe LEDU Cécile LIPPART Pascal PHELIPOT	IFREMER (arrivée 1/11/97) IFREMER IFREMER IFREMER (départ déc. 97) IFREMER GIE/RA Convention SMIDAP/IFREMER puis CDD IFREMER en fin d'année GIE/RA
Doctorants	Bertrand COLLET Arnaud HUVET Sophie LAUNEY Magalie WAECHTER Quinggang XUE	IFREMER/CNRS IFREMER (arrivée 1/10/97) IFREMER/région PC Thèse CIFRE : Grainocéan IFREMER/UBO/CROUS
Post-doctorant	Catherine COLLINS Marc OHRESSER	IFREMER / UE DGXVI Contrat AIR3-ct-94-2487

Personnel administratif et logistique	Le laboratoire ne peut fonctionner efficacement sans une aide administrative et logistique. Ce soutien est assuré par du personnel affecté directement au laboratoire pour le secrétariat, la comptabilité et la bibliothèque ou, par du personnel rattaché au chef de station et mis à disposition des équipes de recherche pour l'entretien et la logistique.
Secrétariat et comptabilité	Yvette SIMIAN (DRV/RA) assure le secrétariat et la gestion des missions du chef de station et du laboratoire GAP. Martine GRASSET (DRV/RA) assure la comptabilité du laboratoire GAP et des comptes logistiques de la station.
Bibliothèques	Florence ALBERT-RIVET (DRV/RA) assure l'organisation des bibliothèques et l'ensemble de la documentation des deux implantations de La Tremblade. Ce travail se fait en étroite collaboration avec les bibliothèques de Nantes (Michelle l'EXCELLENT et Annick RADENAC) et de Brest (Gilles CHATRY).
Entretien et logistique	Emile PLANCHE (DGD) assure l'entretien des bâtiments et plus particulièrement celui des circuits hydrauliques. Il participe activement à tous les travaux d'amélioration des installations aquacoles. Ginette CAILLETEAU (DGD) qui assurait pour le GAP l'entretien des bacs d'élevage, la gestion des commandes et du matériel, a pris sa retraite en février 1997, elle n'a malheureusement pas été remplacée.
Stagiaires	ALMEIDA Manuella (Etudiante en DEA d'aquaculture de l'Université d'Algarve au Portugal) "Diagnostic quantitatif de <i>Perkinsus atlanticus</i> (Apicomplexa, Perkinsea) chez les palourdes <i>Ruditapes decussatus</i> et <i>Ruditapes philippinarum</i> . Séjour de 8 mois au laboratoire entre le 1/10/96 et le 31/05/97. ARZUL Isabelle (4ème année de l' Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes) "Essais de reproduction expérimentale au stade naissant de l'infection à virus herpès de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> ". Stage de 4 mois. BODIN Stéphane (stage de réinsertion professionnelle financé par le CNASEA) "Compétences techniques et biologiques à l'exploitation d'une écloserie de mollusques bivalves". Stage à temps partiel de 65 semaines se déroulant du 9/05/97 au 7/10/98. CROZES Stéphane (BTS 2ème année, lycée Stanilas, Villers les Nancy) "Zootechnie et phytotechnie en écloserie génétique". Stage de 5 semaines. DELANDES Hélène (Maîtrise de Biochimie de l'Université de La Rochelle). "Phylogénie moléculaire des huîtres du genre <i>Crassostrea</i> : approche par les techniques de restriction enzymatique et de séquençage". Stage de 2,5 mois. DENOIX Michael (Post BTS Lycée Technique Saint-Louis, Bordeaux). "Approche <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des interactions hémocytes/parasite <i>Bonamia ostreae</i> , chez l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> . Stage de 4 mois. HUVET Arnaud (DEA de Biologie des Populations, Génétique et Eco-éthologique). "Différentiation génétique de deux huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> et <i>Crassostrea angulata</i> : apport des marqueurs microsatellites ". Stage de 7,5 mois. LAPOUYADE Patrick (DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières" de l'Université de Caen). "Etude d'un milieu gélose semi-sélectif pour la recherche de

Vibrio penaeicida - tests de nouvelles méthodes diagnostiques dans le cadre du programme de recherche sur le syndrome 93 en Nouvelle Calédonie". Stage de 4 mois.

LEMERY Nicolas (Maîtrise de Biologie des populations de l'Université de Poitiers) Contribution à l'obtention de familles sélectionnées de *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme européen GENEPHYS". Stage de 6 semaines.

LHOMME Pierre Yves (D.U.T. Informatique, I.U.T. de Limoges). "Mise en place d'une structure de base de données adaptée aux programmes d'amélioration génétique en aquaculture". Stage de 3,5 mois.

MEDHIOUB Mohamed Nejib stagiaire Tunisien du CIES, séjour d'une durée de 2 semaines au laboratoire.

MEDHIOUB-MOATAMRI Amel stagiaire Tunisienne du CIES, séjour d'une durée de 2 semaines au laboratoire.

MINGUEZ Xavier (Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes de l'Université de Poitiers). "Suivi de croissance d'une génération d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme GENEPHYS. Stage de 3 mois.

RODRIGUEZ David (DEA de Biologie, Module Biologie des Protistes. Université Blaise Pascal Clermont I). "Essais de caractérisation moléculaire des parasites du genre *Marteilia* (Phylum Paramyxea) à l'aide de l'ADNr". Stage de 7 mois.

SEGRETIN Angélique (IUP Génie Informatique. Université de La Rochelle). "Caractérisation de types hémocytaires dans l'hémolymphe de l'huître plate, *Ostrea edulis*, par classification robuste". Stage de 5 mois.

Infrastructures

Le laboratoire GAP est réparti sur deux bâtiments. Le premier est principalement constitué de :

- 6 salles de laboratoire (1 salle des centrifugeuses, 1 salle d'histologie, 1 salle de préparation des échantillons pour la microscopie électronique, 1 salle de cultures cellulaires et 1 salle de bactériologie / électrophorèse, 2 salles réservées à la biologie moléculaire).
- 1 salle de manipulation de radioéléments.
- 1 salle climatisée pour le microscope électronique à transmission.
- 1 laboratoire photo, 1 salle de rangement des produits, 1 laverie.
- 8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

Le deuxième bâtiment de 1200 m², est principalement constitué de :

- 7 salles humides (Quarantaine conservatoire de souches étrangères, Micronurserie, Maturation, Stockage de souches, Elevages larvaires, Physiologie, Haute sécurité sans rejet en mer),
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire de biométrie et une salle informatique,
- 1 laboratoire de physiologie pour le CREMA l'Houmeau et l'URAPC,
- 8 annexes techniques (Local des pompes, Local du chlorodoseur, Local du transformateur électrique et de l'onduleur, Local compresseurs et commandes électriques, Chauffage, Groupe électrogène, Garage, Atelier).

Le laboratoire a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300 m³ de réserve d'eau de mer,
- 23 pompes de 10 à 300 m³/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet,
- 4 bassins de 20 m³ pour la production en masse de phytoplancton.

Matériel

Le matériel scientifique principal est constitué par :

- 1 microscope électronique JEOL JEM 1200 EX,
- 9 microscopes dont deux équipés en épifluorescence,
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers un ordinateur pour les mesures de croissance larvaire,
- 1 analyseur d'images SAMBA™ 2005 d' Alcatel TITN ANSWARE avec un logiciel dédié à l'analyse de la ploïdie et un logiciel dédié à l'analyse des gels d'électrophorèse,
- 1 dispositif vidéo couleur composé d'une caméra 3-CCD, d'un moniteur haute résolution, d'une imprimante vidéo couleur UP-5000, d'un enregistreur photo MAVICA, et d'un magnétoscope médical SONY SVO-9500MDP. Ce matériel facilite grandement l'étude du développement embryonnaire en microscopie à épifluorescence dans le cadre des programmes de cytogénétique. Il permet également l'archivage d'images de toute sorte : développements embryonnaires, élevages larvaires...
- matériel de biologie moléculaire : 7 appareils PCR, 1 scintillateur Packard, des microcentrifugeuses de paillasse, Speed Vac, générateurs, séquenceur manuel, sécheur de gel... pour les études de marqueurs génétiques, la mise au point d'outils de diagnostic en pathologie, le séquençage d'ADN...
- matériel d'histologie : 1 cryotome JUNG, 1 automate LKB à déshydratation et

imprégnation des pièces histologiques, 1 platine inclusion paraffine pour pièces histologiques LKB, 1 système d'acquisition d'images histologiques (KONTRON Elektronik Imaging System).

- 1 ultracentrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse JOUAN CR 4-11,
- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton, 2 congélateurs -80°C, 1 étuve CO₂ FORMA SCIENTIFIC, 3 étuves MEMMERT, 2 autoclaves,
- 1 lecteur ELISA, matériel électrophorèse (cuve et générateurs),
- un réseau informatique ethernet et internet SUN comprenant une vingtaine d'ordinateurs dédiés à la gestion de la station et du laboratoire, au travail scientifique et à l'acquisition de données dont un dispositif d'acquisition d'images numériques des gels d'électrophorèse permettant de traiter les images en tout point du laboratoire via le réseau informatique.

PLANCHE I



Pilote de traitement de l'eau de mer de forage,
Dénitrification et élimination du fer et du manganèse.



Production d'algues phytoplanktoniques.

PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1997

Thème : observation et surveillance de la mer côtière.

Programme : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

Sous-programme : Suivi des maladies des mollusques.

Suivi zoosanitaire
et mortalités
(cellule de veille
de La Tremblade)

Rappel des objectifs

Les principaux objectifs sont définis par les Directives 91/67 CEE et 95/70 CEE, à savoir de :

- contrôler l'évolution des épidémies pour les maladies à déclaration obligatoire,
- connaître l'étiologie des mortalités anormales et apprécier l'importance de l'infection lorsqu'un agent pathogène est en cause,
- déterminer les espèces qualifiées de porteurs sains,
- contrôler les produits destinés à l'exportation et à l'importation, aussi bien entre les pays de l' Union Européenne qu'avec les pays tiers.
- utiliser en routine et de participer aux essais inter-laboratoires sur les nouvelles méthodes diagnostiques.

Résultats 1997

Réseau zoosanitaire CEE (huître plate) et suivi d'autres espèces

Conformément aux directives 91/67 et 95/70 CEE, 997 coquillages provenant des zones 5 (Arcachon), 6 (Marennes-Oléron) et 7 (Baie de Bourgneuf) ont été examinés sur l'ensemble de l'année 1997, soit une augmentation de l'effort d'analyse de 90 % par rapport à 1996. Différentes techniques sont utilisées : 877 analyses sur coupes histologiques, 70 analyses sur frottis et 50 analyses au thioglycolate. Une meilleure répartition entre les zones et une augmentation du suivi d'autres espèces que l'huître ont pu être réalisées en 1997.

- sur l'huître plate (*Ostrea edulis*) : 329 analyses ont été réalisées (432 en 1996), 7 cas de *Bonamia ostreae* et 4 cas de *Marteilia refringens* sur 170 animaux examinés ont été observés dans la zone 6, dans la zone 7 sur 50 animaux analysés, 5 cas de *Marteilia refringens* ont été trouvés. Aucun parasite n'a été décelé en zone 5 sur 89 animaux analysés. En raison des difficultés d'approvisionnement en huîtres plates de gisements naturels pour la zone 5, une autre méthode d'approvisionnement est en cours d'étude.
- sur la moule (*Mytilus edulis*) : 88 animaux de la zone 7, 60 animaux de la zone 6 et 60 animaux de la zone 5 ont été analysés en histologie.

- sur la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) et la palourde européenne (*Ruditapes decussatus*): 120 animaux de la zone 7, 30 animaux de la zone 6 et 100 animaux de la zone 5 ont été examinés par histologie ou milieu thoglycolate.
- Sur coque (*Cerastoderma edule*) : 90 animaux de la zone 7, 60 animaux de la zone 6 et 60 animaux de la zone 5 ont été examinés par histologie, état frais et thioglycolate.

Analyses sur des cas de mortalité.

Sur du naissain ou des larves d'huîtres creuses : 10 lots de la zone 7, 22 lots de zone 6 et 1 lot de la zone 5 ont été analysés par PCR (amorces A3A4-A5A6) surtout et en histologie. On note une diminution par rapport à 1996 (33 lots contre 57), beaucoup moins de cas de mortalité ont été en effet signalés. En Vendée (zone 7), 4 lots se sont avérés positifs pour la détection d'ADN viral de type Herpès et un lot dans la zone 6.

Afin d'étudier l'évolution des mortalités du naissain en poche, un site pilote a été suivi en 1997 à la Pointe de la Fumée (Fouras). Les premières mortalités ont été détectées fin juin. Leur estimation cumulée, de Juin à Aout, était en moyenne de 15%, valeur considérée comme "habituelle" par la profession. Aucune analyse n'a révélé la présence d'*Herpès-virus* sur ces huîtres.

Sur des adultes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* : 3 lots de Vendée, 4 lots de Charente et 4 lots d'Arcachon ont été analysés, sans qu'une origine pathologique des mortalités observées n'aient été retenue.

Des mortalités de coques (*Cerastoderma edule*) ont été observées en 1997 dans la zone 8 (Croisic, la Baule et la Vilaine), le laboratoire GAP de La Tremblade a apporté son soutien à la cellule de veille de La Trinité, les 12 lots analysés par histologie ou par PCR, n'ont pas permis de mettre en évidence le rôle d'un agent infectieux.

Analyse en cas de troubles biologiques :

Trois lots de moules (*Mytilus edulis*) originaires de bouchots de Vendée ont été examinés en histologie pour des problèmes de fixation. Des palourdes (*Ruditapes philippinarum*) ont également été analysées pour des retards de maturation (Vendée) et pour des anomalies du muscle adducteur (Arcachon).

Contrôles zoosanitaires des produits provenant des pays tiers

Un lot de Taiwan, 1 lot d'Irlande de *Crassostrea gigas* et 1 lot d' *Ostrea puelchana* d'Argentine ont été observés en histologie et en microscopie électronique. Les analyses effectuées n'ont pas révélé d'agents pathogènes particuliers.

Soutien aux programmes de recherche

Dans le cadre des programmes menés par l'équipe génétique du laboratoire (projet européen GENEPHYS, programme de sélection d'huître plate et conservatoire de souches du genre *Crassostrea*), 483 animaux (*Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*) ont été examinés par histologie classique ou PCR.

REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques)

Rappel des objectifs

Le réseau de surveillance zoosanitaire de l'IFREMER, REPAMO, répond aux Directives 91/67/CE du 28 janvier 1991 relative aux conditions de police zoosanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture et 95/70/CE du 22 décembre 1995, établissant des mesures communautaires minimales de contrôle de certaines maladies des mollusques

bivalves, et aux décrets d'application relatifs. Les activités du réseau font partie des missions institutionnelles de l'Institut.

Actions réalisées en 1997

La réalisation des analyses permettant de classer les zones pour les maladies à déclaration obligatoire (bonamiose et marteiliose), la surveillance de base pour l'ensemble du cheptel conchylicole français, espèces exploitées, ainsi que les bancs naturels, l'étude des cas de mortalité anormale, le contrôle des produits échangés entre les pays de l'Union Européenne et la France, ainsi qu'entre les pays tiers et la France.

En outre, les laboratoires d'analyse du REPAMO apportent un soutien à divers programmes de recherche de l'IFREMER. Les analyses sont effectuées par trois laboratoires (Palavas, La Tremblade et La Trinité) qui ont en charge leur zone respective du littoral français (méditerranée, atlantique sud et nord Loire). La coordination des trois laboratoires et l'animation du réseau sont assurées depuis le laboratoire de La Tremblade. Le fonctionnement du réseau s'appuie sur des collaborations avec les stations et laboratoires côtiers des départements RA et DEL de l'Institut, notamment, pour la collecte d'information ou l'acheminement des échantillons.

Essais interlaboratoires

Le laboratoire GAP a organisé des essais de répétabilité et de reproductibilité entre les différentes cellules de veille dans le cadre de l'utilisation de la technique de PCR. Des échantillons ont été préparés et envoyés à chaque laboratoire. L'analyse des résultats montre que globalement il y a une bonne concordance intra et inter-laboratoires. Elle a montré également une amélioration de la concordance avec l'utilisation des nouvelles amorces (OHV3-OHV4). Certains défauts de répétabilité et de reproductibilité doivent toutefois être explorés et réduits.

Parallèlement, un protocole commun pour les analyses histologiques (Bonamia, Marteilia, mortalités "anormales", taille minimum du prélèvement) a été adopté par les trois cellules.

Laboratoire
communautaire de
référence

Rappel des objectifs :

Au 1^{er} janvier 1997, le laboratoire a été désigné comme **laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques bivalves**. Les fonctions et obligations du laboratoire de référence sont données par l'annexe B de la Directive 95/70 CE :

1 - Coordonner, en concertation avec la commission, les méthodes utilisées par les Etats membres pour le diagnostic des maladies des mollusques ;

- a) en constituant et entretenant un ensemble de lames histologiques, de souches ou de cultures des agents pathogènes concernés et en les mettant à la disposition des laboratoires agréés par les Etats membres,
- b) en organisant périodiquement des essais comparatifs des procédures de diagnostic utilisées au niveau communautaire,
- c) en collectant et en compilant des données et des informations relatives aux méthodes les plus modernes et les mieux adaptées afin de permettre une meilleure compréhension de l'épizootiologie de la maladie,

d) en se tenant informé des progrès accomplis dans le monde en matière de surveillance, d'épizootologie et de prévention des maladies concernées,

e) en maintenant les compétences relatives aux agents pathogènes des maladies concernées afin de permettre un diagnostic différentiel rapide.

2 - Participer activement au diagnostic des maladies qui se déclarent dans les Etats membres, en recevant les agents pathogènes isolés en vue d'un diagnostic de confirmation, d'une caractérisation et d'études épizootiques ;

3 - Faciliter la formation ou le recyclage d'experts en diagnostic, en vue d'harmoniser les techniques de diagnostic dans l'ensemble de la Communauté ;

4 - Collaborer, en ce qui concerne les méthodes de diagnostic des maladies exotiques, avec les laboratoires compétents des pays tiers dans lesquels ces maladies sont répandues.

Actions réalisées en 1997 :

Constitution des collections de matériel de référence : une lamothèque a été constituée en 1997. Elle comprend aujourd'hui 56 références cataloguées couvrant les principaux agents pathogènes et maladies connus chez les mollusques bivalves. Des blocs histologiques sont annexés à la lamothèque, dans la mesure du possible, afin de pouvoir distribuer des lames de référence. Cette collection de lames peut être consultée sur place.

Une collection de 25 souches bactériennes de référence a, de même, été constituée cette année. Cette collection a pour but de mettre à disposition un ensemble de souches réputées pathogènes ou fréquemment isolées de mollusques bivalves, ainsi que des souches types permettant de procéder à l'identification de souches bactériennes isolées par les laboratoires de diagnostic.

Matériel de référence distribué : au total 18 centres ou laboratoires ont pu bénéficier, à leur demande, d'envois de coupes histologiques (17 demandes) et/ou de souches bactériennes (3 demandes). Pour l'essentiel en 1997, le matériel de référence demandé concernait *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*, parasites de l'huître plate, *Ostrea edulis* ; le virus de type herpès qui affecte l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et l'huître plate, *Ostrea edulis*, ainsi que *Vibrio tapetis*, agent bactérien de la maladie de l'anneau brun de la palourde, *Ruditapes decussatus*.

Réglementation zoosanitaire : le laboratoire a organisé, à l'occasion du premier atelier de travail des laboratoires nationaux de référence une table ronde au cours de laquelle la Directive 95/70/CE a été discutée, notamment, l'article 2 relatif aux procédures d'échantillonnage et de suivi, l'harmonisation des textes de l'Union Européenne et de l'OIE, et la définition de mortalité anormale.

Le laboratoire a d'autre part assuré une représentation lors de la réunion du groupe d'experts organisée par la DG VI de la Commission des Communautés Européennes en mars 1997 à Bruxelles, ainsi qu'à la réunion de la Fish Disease Commission de l'Office International des Epizooties en septembre 1997 à Paris.

Collecte des informations en épidémiologie : chaque pays membre a fourni un état descriptif de ses actions en termes d'épidémiosurveillance et d'épidémiologie pour les mollusques bivalves. Ces données ont été présentées et discutées lors du premier atelier de travail des laboratoires

nationaux de référence qui s'est tenu à La Tremblade en octobre 1997.

Correspondance : le laboratoire traite une importante correspondance par lettres et fax (12) ou courriers électroniques (25), avec les pays membres ou les pays tiers, essentiellement au sujet des procédures techniques de diagnostic, et de stratégies d'échantillonnage en cas de mortalité anormale.

Maintien des compétences du laboratoire : les principales compétences du laboratoire, en matière de diagnostic, relèvent de l'histologie et de la microscopie électronique, de la biologie moléculaire et de la bactériologie. Ces compétences ont été appliquées en 1997 (329 analyses en histologie pour le diagnostic de bonamiose et martelliose, participation au programme national d'épidémiologie soit 1507 analyses en histologie, 730 analyses en PCR, 30 en bactériologie et 50 analyses en thioglycolate, 89 diagnostic en histologie effectués pour les pays membres, et 496 analyses en PCR pour le réseau d'essai pour la détection de l'infection par virus de type herpès).

Développement de méthodes de diagnostic : les principaux résultats concernent la mise au point d'une méthode de détection de l'infection à herpès virus en amplification génique enzymatique (PCR), la caractérisation moléculaire des parasites du genre *Marteilia* à des fins de production de réactifs spécifiques d'espèce, l'application au parasite *Perkinsus atlanticus* d'une méthode de diagnostic quantitatif par culture totale de palourdes, *Ruditapes decussatus*.

Assistance technique aux pays membres et pays tiers : le laboratoire communautaire de référence a été sollicité pour diagnostic sur des *Crassostrea gigas* en provenance d'Irlande, des *Mytilus galloprovincialis* d'Italie, *Ensis siliqua* de Grande-Bretagne, *C. gigas* de Taiwan, *Ostrea puelchana* d'Argentine. Le laboratoire a aussi été sollicité (avis technique, confirmation ou matériel de référence) pour des suspicions d'infection à herpès virus, et de maladie de l'anneau brun.

Formation des experts des laboratoires nationaux : la formation de 17 personnes, des laboratoires nationaux de référence pour l'Union Européenne, d'Argentine, du Portugal, d'Irlande et de Roumanie, a été assurée au laboratoire de La Tremblade.

Information : un système d'information sur internet a été mis à la disposition des laboratoires nationaux de référence à l'adresse suivante :

<http://www.ifremer.fr/gap/>

Ce site internet donne des sommaires bibliographiques et des images des agents pathogènes visés par la Directive 91/67/CE. Il permet aussi d'accéder à quelques actualités, notamment bibliographiques, et à d'autres sites relatifs à la pathologie des mollusques bivalves.

Collaborations développées en ce qui concerne les maladies exotiques : La collaboration relève essentiellement de l'échange d'informations et/ou de matériel biologique pour la constitution des collections. Des contacts ont été établis avec, notamment : Dr Susan Bower (Department of Fisheries and Oceans, Pacific Biological Station, Nanaimo, Canada), Dr Mike Hine (National Institute for Water and Atmospheric research, Wellington, New-Zealand), Pr G. Bureson (Virginia Institute of Marine Science, Gloucester point, USA).

PLANCHE 2



Préparation des échantillons d'huîtres.



Système d'acquisition d'images histologiques.

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Mécanisme de défense.

Bonamiose

Rappel des objectifs

Les objectifs de ce programme pour l'année 1997 étaient les suivants :

- étude des mécanismes de défense mis en jeu par l'huître plate lors de l'infection par le parasite *Bonamia ostreae*,
- soutien au programme de sélection d'huîtres plates résistantes ou tolérantes à la bonamiose.

Résultats 1997

Etude des mécanismes de défense.

Dans ce cadre, l'immunisation de souris BalbC a été réalisée au laboratoire par injection intrapéritonéale de populations séparées d'hémocytes. Après fusion lymphocytaire et tri des hybridomes, **des anticorps monoclonaux** ont été obtenus. Leur spécificité vis à vis des différentes populations hémocytaires a été testée en western blotting et en immunohistochimie sur cellules cytocentrifugées et sur coupes histologiques. Un anticorps spécifique des hémocytes granuleux a été ainsi produit. Cet anticorps marque spécifiquement les granulocytes et aucun autre type cellulaire. D'autres anticorps monoclonaux ont également été produit. Cependant, leur spécificité est moins stricte, puisqu'ils sont capables de marquer des pourcentages variables de cellules appartenant à différents types morphologiques d'hémocyte. L'anticorps spécifique de la population hémocytaire granuleuse a été testé également en cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules marquées par cette technique est identique à celui obtenu par observation de préparations cytocentrifugées, colorées au moyen du kit Hemacolor (Merck). Par ailleurs, le même anticorps a été utilisé pour étudier la distribution des granulocytes chez des huîtres infectées et non infectées par le parasite *Bonamia ostreae*. Les tissus présentant une infiltration hémocytaire massive associée à la présence du protozoaire chez les animaux infectés ne contiennent que peu de granulocytes.

Une approche *in vivo*, permettant d'observer si **le parasite *Bonamia ostreae* est présent dans tous les types cellulaires de l'hémolymphe lors d'une infection naturelle**, a été entreprise. Les premiers résultats obtenus indiquent que des variations importantes des hémogrammes (pourcentages respectifs des différents types hémocytaires pour un individu) peuvent être observées en fonction de l'origine et de l'histoire des animaux. Par ailleurs, si tous les types hémocytaires sont infectés, lors d'infections naturelles, les grands hyalinocytes sont la cible privilégiée du parasite *Bonamia ostreae*.

Une approche *in vitro* a également été réalisée dans le but **d'étudier les interactions entre le parasite et les hémocytes**. Dans cette étude, la difficulté majeure réside dans la variabilité des résultats obtenus. En effet, la capacité des cellules à être maintenue *in vitro*, semble tributaire de l'état des animaux donneurs. Les résultats obtenus indiquent également que les grands hyalinocytes sont les cellules les plus fréquemment parasitées par le parasite *Bonamia ostreae*.

Un essai de **classification des types hémocytaires** a également été effectué. En effet sur la base des caractéristiques morphologiques, trois grands types hémocytaires sont observés chez l'huître plate : les granulocytes, les grands hyalinocytes et les petits hyalinocytes. Cependant, la difficulté d'établir un classement dans ces trois classes de tous les hémocytes et le fait qu'il puisse différer selon l'observateur pour certaines cellules peuvent laisser croire que ces trois types ne sont pas exhaustifs. Ainsi, différents algorithmes ont été utilisés pour tenter de classer les cellules de l'hémolymphe sur préparations cytocentrifugées. Globalement, les résultats obtenus par classification montrent qu'il est difficile de discriminer plusieurs populations hémocytaires sur la base de caractères morphométriques. Il existerait des grands types hémocytaires (cellules granuleuses et cellules agranuleuses), mais avec une multitude de formes intermédiaires inclassables.

Sélection d'animaux résistants

L'équipe de pathologie du laboratoire de La Tremblade a collaboré au programme de sélection génétique de populations d'huître plate, *Ostrea edulis*, "résistantes" au parasite *Bonamia ostreae*, en assurant :

- ⇒ la mise en place, au laboratoire, d'un stock d'animaux fortement infectés,
- ⇒ la purification de ce parasite et l'inoculation de 3000 huîtres (géniteurs et lignées sélectionnées) pour la reproduction expérimentale de la bonamiose,

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Agents pathogènes et épidémiologie.

Pathologie à virus de type herpès **Rappel des objectifs**

Un virus de type herpès est observé chez les huîtres depuis 1991. Des progrès déterminants ont été réalisés en 1995 grâce à la mise au point d'un protocole de purification du virus. En 1997, les objectifs de ce programme étaient les suivants :

- améliorer le seuil de détection de l'ADN viral par la technique de PCR et développer d'autres techniques de diagnostic basées sur la biologie moléculaire (hybridation *in situ*),
- utiliser les techniques développées pour analyser des échantillons de coquillages présentant ou non des mortalités,
- développer un protocole reproductible pour induire l'infection virale au stade naissant chez l'huître creuse.

Résultats 1997

Techniques de diagnostic

La collaboration, entamée en 1996 avec A. Davison du Medical Research Council de Glasgow, a permis d'aboutir à l'obtention d'informations sur la séquence de fragments clonés d'ADN de virus de type herpès infectant les huîtres.

Parmi les fragments séquencés, le fragment le plus long (1089 paires de bases) a été retenu pour construire de **nouvelles amorces pour la PCR**. En effet, une des voies possibles pour améliorer la technique de PCR existante était d'obtenir des amorces présentant une plus grande spécificité pour l'ADN viral que celle des amorces déjà utilisées. Le fragment cloné retenu a été sélectionné sur la base de son absence d'homologie avec les séquences existantes dans les banques de données. Trois couples d'amorces ont été définis en utilisant un site sur le Web (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), à partir de la séquence fournie par A. Davison :

- ❖ OHV1/OVH2 (taille du fragment attendu 765 pb).
- ❖ OHV3/OVH4 (taille du fragment attendu 896 pb).
- ❖ OHV5/OVH6 (taille du fragment attendu 780 pb).

Les trois couples d'amorces ont été testés, en utilisant 5×10^7 et 2500 génomes viraux par tube de réaction, soit respectivement 10 ng et 0.5 pg d'ADN viral, dans les conditions de PCR définies en 1996 au laboratoire de La Tremblade. Cependant, dans ce cas, une seule réaction de PCR est réalisée. Les trois couples d'amorces testés permettent d'obtenir des produits de PCR détectables en gel d'agarose aussi bien pour 5×10^7 génomes viraux que pour 2500. Les fragments amplifiés obtenus possèdent la taille attendue. Par ailleurs, aucune autre bande n'est observée pour les trois couples d'amorces utilisées indiquant l'absence d'hybridation non spécifique. Le couple OHV3/OHV4 a été retenu pour les expériences ultérieures dans la mesure où la bande détectée sur gel d'agarose pour 2500 génomes viraux était plus nettement lisible que pour les amorces OHV1/OHV2 et OHV5/OHV6 ainsi que pour les amorces A5/A6 en

PCR2.

La spécificité des amorces OHV3/OHV4 a été vérifiée en utilisant des échantillons d'ADN d'huîtres creuses saines. Dans ce cas, aucune bande n'est observable en gel d'agarose indiquant que les amorces utilisées ne s'hybrident pas sur l'ADN d'huître.

Au vu des résultats obtenus avec les amorces OHV3/OHV4 pour 2500 copies d'ADN viral, des expériences ont été réalisées afin de définir le seuil de détection correspondant à ces amorces (quantité minimale d'ADN viral détecté de façon systématique). Il est ainsi possible d'observer des bandes nettes en gel d'agarose lorsque 500, 100 et 50 génomes viraux sont distribués dans les tubes de PCR et cela de façon systématique (5 tubes positifs sur 5). Par ailleurs, des bandes de faible intensité, mais détectables sont également obtenues lorsque 25 et 5 copies d'ADN viral sont utilisées par tube de réaction. Le seuil de détection en PCR2 pour les couples d'amorces A3/A4 et A5/A6 utilisés dans un protocole de nested PCR est de 2500 génomes viraux. La détection de l'ADN viral en dessous de ce seuil est possible, mais aléatoire avec ces amorces. **Les amorces OHV3/OHV4 permettent d'abaisser le seuil de détection de matière significative, c'est à dire d'un facteur de plus de 50 (de 50 à 500).**

Afin de vérifier si les résultats obtenus pouvaient être répétés, une première expérience a été réalisée dans laquelle 27 tubes contenant 50 copies d'ADN viral et 27 tubes Témoin négatif (ne contenant pas d'ADN viral, mais de l'eau bidistillée) ont été traités en PCR, en utilisant les amorces OHV3/OHV4. Les résultats obtenus montrent la présence du fragment de taille désiré pour 25 des 27 tubes contenant l'ADN viral (50 copies) et pour aucun des tubes Témoin négatif. Cette expérience indique que le protocole de PCR mis au point au laboratoire de La Tremblade associé à l'utilisation des amorces OHV3/OHV4 permet de réduire de façon répétable le niveau de détection de l'ADN viral par rapport aux amorces A3/A4 et A5/A6.

Des amorces internes (OHV13/OHV14) ont été dessinées au sein du fragment amplifié par OHV3/OHV4. Les tests réalisés, en utilisant le protocole de nested PCR mis au point en 1996 ont permis de mettre en évidence des problèmes de contamination. Devant, ces difficultés et la grande sensibilité de la PCR avec les amorces OHV3/OHV4, il a été estimé que la nested PCR n'était pas une voie à privilégier.

Des échantillons de larves d'huître creuse et d'huître plate, prélevés entre 1992 et 1997 et conservés congelés à -20°C, **ont été analysés** en utilisant les amorces A3/A4 et A5/A6 avec le protocole de nested PCR défini au laboratoire et les amorces OHV3/OHV4 dans une simple PCR (une seule réaction). Les examens réalisés montrent que 9 échantillons sur 16 sont positifs en PCR2 lorsque les amorces A3/A4 et A5/A6 sont utilisées alors que 14 échantillons sur 16 le sont pour le couple d'amorces OHV3/OHV4.

Une sonde marquée à la digoxigénine a été produite en utilisant des nucléotides marqués (dUTP digoxigénine) dans une réaction de PCR utilisant les amorces OHV3/OHV4. La sonde marquée à la digoxigénine, préparée par PCR avec les amorces OHV3/OHV4, a été testée en utilisant un protocole **d'hybridation *in situ*** mis au point au laboratoire de La Tremblade. Il est ainsi possible d'observer un marquage nucléaire et cytoplasmique de certaines cellules sur coupes histologiques d'animaux (naissain) infectés (contrôlés en microscopie électronique à transmission) : cellules des tissus conjonctifs du manteau, des palpes labiaux, etc... Ce sont ces cellules dans lesquelles les particules virales sont détectées en microscopie électronique.

Essais de reproduction expérimentale

Les essais de reproduction de l'infection à virus de type herpes au stade naissain chez l'huître creuse n'ont pas permis en 1997 de reproduire les résultats obtenus en 1996. Des difficultés ont été observées pour obtenir des larves axéniques. En effet, les géniteurs utilisés présentaient une contamination bactérienne forte des gamètes. De ce fait, il a été difficile de produire des larves axéniques expérimentalement infectées, cette étape correspondant au premier maillon dans le protocole utilisé pour tenter d'induire l'infection viral sur du naissain.

Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpes dans le cadre du protocole SMIDAP/IFREMER

Le travail réalisé en 1997 fait suite à celui effectué en 1996 qui a pu être poursuivi en partie grâce au détachement au Laboratoire IFREMER de Ronce les Bains (mai 97 - décembre 97), d'une personne en contrat à durée déterminée rémunérée par le SMIDAP.

Dans le cadre de la démarche régionale des Pays de la Loire pour une production contrôlée de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des animaux issus de huit pontes, produites dans une éclosérie professionnelle, ont été suivis depuis le stade larvaire (J10), jusqu'au stade naissain (J180), après mise sur sites d'élevage. Les familles A, B, C, E, et F proviennent pour chacune d'elles d'un couple de géniteurs différents (un mâle/ une femelle). Les familles S et NS sont issues d'un pool de géniteurs non stressés pour la famille NS et d'un pool de géniteurs stressés pour la famille S.

Un contrôle régulier des mortalités a été réalisé, associé à des analyses en PCR pour rechercher la présence d'ADN viral, à partir de J10 après la ponte. Les prélèvements et les analyses ont été effectués tous les quinze jours en éclosérie et nurserie, jusqu'à la mise en élevage des animaux sur cinq sites : un site en Baie de Morlaix, un site en Baie de Bourgneuf et trois sites en Baie de Pen Bé. A partir de la date de mise en élevage sur site (début juillet 97), des prélèvements ont été réalisés régulièrement pour l'ensemble des familles sur la totalité des sites. Il a été choisi a posteriori de réaliser les examens en PCR pour quatre familles (A, C, D, F), sur des prélèvements ayant été réalisés tous les 15 jours pour l'ensemble des sites d'élevage. Le choix de ces familles a été effectué en fonction de leur comportement vis à vis des mortalités.

Les analyses pour la recherche de la présence d'ADN viral ont été réalisées au moyen de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) suivant le protocole établi au laboratoire IFREMER de Ronce les Bains en 1996, toutefois les nouvelles amorces mises au point entre juin et août 1997 ont été également utilisées.

Les individus issus des huit pontes n'ont pas présenté de phénomène particulier de mortalité au cours de l'élevage larvaire et du grossissement en nurserie. Au stade larvaire, deux prélèvements à J10 pour les familles C et NS se sont révélés positifs pour la recherche d'ADN viral en PCR. Pour autant, il ne s'est pas produit de phénomènes de mortalités sur ces deux familles au stade larvaire, ni plus tard dans le temps. De plus, les analyses ultérieures (à 250µm, 850µm, etc...) n'ont pas révélé la présence d'ADN viral. Une explication possible à ce phénomène serait que lors du prélèvement à J10 (larves de 100 µm environ), le nombre d'animaux analysés dans 50 mg soit important. Puis, lors du prélèvement suivant le nombre d'individus diminue, car la taille des animaux augmente (250µm). De ce fait, si le pourcentage d'animaux porteurs asymptomatique est faible, la diminution du nombre d'individus analysés par prélèvement, ne permet plus de détecter l'ADN viral. De même, le pourcentage faible d'animaux porteurs peut ne pas être

suffisant pour induire des phénomènes de mortalité. Pour les six autres pontes, aucune analyse n'a pu révéler la présence du virus avant la mise en élevage sur site.

A partir de la mise en élevage sur les cinq sites d'élevage (début juillet 1997), les huit pontes ont fait l'objet de comptage de mortalité et de prélèvements systématiques. Au vu du comportement de chaque famille à la fin de la période estivale, quatre d'entre elles ont fait l'objet d'analyses pour la totalité des prélèvements effectués : les familles A et C, issues de géniteurs non stressés et les familles D et F, issues de géniteurs stressés. Deux types de comportements sont mis en évidence quels que soient les sites d'élevage. En effet, pour les familles A, C et F, les pourcentages de mortalité n'excèdent pas 4.8% au 15 septembre 1997. Seule la famille D a subi des mortalités sur tous les sites d'élevage, ces mortalités pouvant aller jusqu'à 65% sur le site en Rivière de Morlaix. L'évolution des mortalités est à peu près identique sur quatre sites (Morlaix, Bourgneuf, Pen-Bé étier et milieu de baie). Par contre pour le site Pen Bé sortie de baie, les mortalités sont plus faibles et sont apparues plus tardivement (14.5% mi-septembre 1997). Les familles A, C et F, ont présenté des résultats positifs en PCR : respectivement 2 pools positifs sur 126 pools pour la famille A, 1 pool positif sur 138 pour la famille C et 1 pool positif sur 126 pour la famille F. Ce petit nombre de résultats positifs peut signifier qu'en absence de mortalité seul un faible nombre d'individus est porteur asymptomatique. Une interprétation grossière de ces résultats permettrait de dire que 2 à 10 animaux pour 1000 seraient porteurs sains dans ces conditions. La famille D quant à elle a subi des épisodes de mortalités importants qui ont débutés début août 1997 et se sont poursuivis jusqu'à mi-septembre en s'amplifiant sur tous les sites à l'exception du site de Pen Bé en sortie de baie (mortalité de 14% mi-septembre). De plus, pour les quatre autres sites, la détection de la présence d'ADN viral est fortement associée aux mortalités (19 pools positifs sur 135 analysés), ce qui n'est pas le cas pour le site à 14% de mortalité finale.

Des analyses statistiques préliminaires (test du X^2) des résultats obtenus par analyse en PCR indiquent que les différences observées entre les familles A, C et F et la famille D, pour les sites de Morlaix et de La Coupelasse sont significatives. Pour les trois autres sites, les différences observées en fonction des familles n'ont pas de signification au plan statistique. Il semble donc que la famille d'origine n'influence les résultats obtenus en PCR que pour certains sites d'élevage (Morlaix et La Coupelasse). Les analyses statistiques n'ont porté dans ce cas que sur les résultats obtenus en PCR et non pas sur les mortalités observées sur le terrain. En effet, le problème de la représentativité des échantillons analysés en PCR peut expliquer les différences observées entre phénomène de mortalité et détection d'ADN viral.

L'expérience menée en 1997 semble confirmer les résultats de 1996. En effet, il semble qu'il y ait un comportement familial, c'est à dire dépendant des parents. Cependant, l'influence du milieu (site d'élevage) reste à définir. La détection d'ADN viral dans les échantillons est fortement corrélée aux phénomènes de mortalité.

Marteillose

Rappel des objectifs

Les deux principaux axes de recherche sont :

- 1- l'étude du cycle de *Marteilia refringens* parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*,
- 2- les affinités taxonomiques des parasites du genre *Marteilia* observés chez les mollusques bivalves.

Résultats 1997

Cycle de *Marteilia refringens*

Les résultats des travaux réalisés sur le sujet, ont conduit à poser l'hypothèse de l'existence d'un hôte intermédiaire dans le cycle du parasite *Marteilia refringens*, ou d'une phase de maturation en milieu extérieur. La confirmation de cette hypothèse nécessitait de disposer d'une part d'un outil de diagnostic du parasite, sensible et indépendant de son stade de développement, (nested PCR) et d'autre part, de pouvoir étudier la maladie en milieu naturel circonscrit (bassins à fond naturel de type "claire" du CREEA).

La recherche d'hôtes intermédiaires potentiels s'est faite au cours de la période de contamination naturelle des huîtres dans le modèle claire. La recherche a porté essentiellement sur la macrofaune, meiofaune, zooplancton, l'eau et le sédiment. Plus de 600 analyses ont été réalisées. La détection a été positive pour le compartiment zooplanctonique qui pourrait donc intervenir dans le cycle du parasite. Ces expériences seront à confirmer en 1998.

Taxonomie des parasites du genre *Marteilia* observés chez les mollusques bivalves.

Le séquençage du produit d'amplification des gènes rRNA à l'aide d'amorces universelles avait démontré la contamination par l'ADN de l'hôte malgré les efforts portés sur le protocole de purification (immunoaffinité). Il semble que l'accrochage d'amorces dites universelles sur l'ADN du parasite soit médiocre par manque d'homologie. Afin de contourner cette difficulté, l'ADN du parasite purifié a été restreint puis cloné. Les clones recombinants ont servi de matrice de PCR en utilisant des couples mixtes d'amorces (universel/plasmide). Un premier fragment de 18S a ainsi été amplifié puis séquencé. La totalité de la séquence a ensuite été obtenue par marche sur l'ADN. Cette première séquence d'un *Marteilia* devrait permettre de préciser la taxonomie du groupe.

Perkinsus
atlanticus

Rappel des objectifs

Mise au point d'une méthode de diagnostic quantitatif de *Perkinsus atlanticus* chez *Ruditapes decussatus*.

Résultats 1997

Dans le cadre de l'étude de facteurs environnementaux sur l'infection par *P. atlanticus* chez la palourde, *R. decussatus*, il apparaissait important de pouvoir disposer d'un outil de quantification de la charge parasitaire des animaux. La méthode utilisée est basée sur la mise en culture en milieu thioglycollate de la palourde entière, puis lyse des tissus et dénombrement des cellules parasitaires après coloration au Lugol.

La méthode s'est avérée très intéressante dans le cadre du modèle de reproduction expérimentale de la maladie. Sa comparaison à l'histologie a permis d'autre part de montrer sa grande sensibilité. Toutefois, la question de possibles résultats faussement positifs, résultant vraisemblablement de la mise en culture de certaines espèces phytoplanctoniques, a été mise en exergue. Le couplage de cette méthode à une méthode spécifique pourrait permettre une étude en épidémiologie descriptive de ce parasite en Europe.

Etudes
bactériologiques

Rappel des objectifs.

L'objectif principal de l'année 1997 était de redémarrer la pathologie bactérienne à La Tremblade en soutien aux activités des écloséries-nurseries de mollusques et ponctuellement aux programmes crevettes développés à Tahiti ou en Nouvelle-Calédonie.

Résultats 1997.

Recherche de bactéries pathogènes en nurserie d'huître creuse (*C. gigas*).

Dans le cadre d'épisodes de mortalité massive en éclosion/nurserie, une étude des flores bactériennes associées a été menée. Des isolements à partir de naissains de *C. gigas* et d'eau d'élevage ont été réalisés sur milieux gélosés (Marine Agar, TCBS). Les colonies macroscopiquement différentes ont été caractérisées phénotypiquement, conduisant à l'identification des souches correspondantes. Un groupe de souches en cours d'identification a été associé à des épisodes de mortalité. Les essais de reproduction expérimentale de mortalité à l'aide de ces souches pures inoculées à des naissains ont permis de reproduire la symptomatologie et la mortalité caractéristiques des épisodes étudiés. La détection en PCR du virus de type herpes au cours de cette étude s'est révélée systématiquement négative.

Identification de souches de *Vibrio peneicida*

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un soutien aux programmes de Nouvelle-Calédonie. L'espèce *peneicida* a été reconnue comme responsable du syndrome 93 de *Penaeus stylirostris*. L'identification de *Vibrio peneicida* peut être fastidieuse. Une méthode de sélection des souches isolées sur milieu gélosé a été proposée basée sur la technique des répliquats à l'aide un tampon stérile. Puis une galerie d'identification phénotypique a été mise en place permettant une distinction rapide des différentes espèces de *Vibrio*. Enfin un anticorps polyclonal anti-*peneicida* a été produit sur souris et transféré au COP.

Gènes et vecteurs d'expression

Rappel des objectifs.

Dernière année du programme européen intitulé "Development of mussel-specific expression vectors suitable for transgenic organisms: Implication in the establishment of mollusc continuous cell lines. (contrat AIR3.94.CT-2487). En 1997, il était prévu de mesurer la spécificité d'expression dans les tissus à divers stades de développement, des gènes dont sont issus les divers promoteurs utilisés dans les vecteurs d'expression.

Résultats 1997

La famille des gènes d'actine de moule

Cette étude a été menée dans le cadre du programme AIR3 CT94-2487. Cette dernière année du programme a permis l'accumulation de résultats dont nous décrivons ici succinctement les conclusions. Nous présentons la caractérisation de la famille des gènes d'actine de moule. La caractérisation du taux de transcription en fonction des tissus et du stade de développement est en cours.

Ce travail fera l'objet d'une présentation plus complète dans le rapport final du programme européen qui sera réalisé courant juin 98 et surtout dans une publication qui est en préparation.

Structure et expression des gènes d'actine.

Détermination des sites d'initiation de transcription des différents gènes d'actine et mesure de leur taux de transcription dans différents tissus et au cours du développement. Essai de culture primaires à partir de larves d'huître plate.

Analyse des régions promotrices des gènes d'actine de moule.

L'analyse de la séquence a permis d'identifier un cadre de lecture dans chaque gène qui est délimité en amont par un codon d'initiation de traduction et en aval par un site donneur de splice qui dans tous les cas interrompt le 42^e codon après son second nucléotide. Cette disposition est retrouvée chez les actines de vertébrés mais rarement chez celle d'invertébrés. Aucun de nos clones génomiques ne contenait de second exon, ce qui place ce second exon à une distance en aval, supérieure à 9 kb.

La région amont est pourvue de motifs semblables aux séquences activatrices des gènes de vertébrés. Parmi ces motifs, on reconnaît la séquence de liaison de l'activateur sp1 dans *mac-1*, -2 et -4.

Le site de liaison du facteur de réponse au sérum (SRE) est également présent dans ces régions promotrices, ce qui constitue une caractéristique commune avec les actines de vertébrés. Un tel motif est connu pour intervenir dans les mécanismes de coordination de la réponse aux stimuli extérieurs.

Identification des cap-sites des différents gènes d'actine

La richesse en pyrimidine de l'ADN de moule a rendu l'analyse des cap-sites des gènes d'actine particulièrement laborieuse. Nous avons néanmoins pu déterminer des séquences leaders, séquences amont non traduites, d'une longueur de 34 à 66 nucléotides selon les gènes. Ces valeurs placent les cap-sites à une distance d'environ 30 nucléotides de séquence répondant à la définition des TATAA box, motifs de démarrage de transcription.

Durant cette étude, nous avons mis en évidence un gène supplémentaire, le gène *mac-5*, dont nous n'avons pas isolé au préalable le clone génomique.

La famille des actines contient deux groupes de gènes de structures différentes

Les gènes *mac-1* à -5 ont une structure classique constituée d'un premier exon codant pour la partie N-terminale de la protéine. En revanche, un de ces gènes, *mac-6*, contient un premier exon très court en amont de l'exon codant pour le N-terminal. Cet exon a été identifié à partir d'ADNc de moule et aucun des clones génomiques n'a été trouvé porteur de cet exon non codant, ce qui laisse présager un premier intron particulièrement long.

Une analyse individuelle menée par PCR et séquençage a montré que le génome haploïde d'un individu contient au moins 3 copies exprimées de *mac-3*. En fait, on a pu identifier 5 copies différentes exprimées de ce gène sur un seul individu, ce qui n'est sans doute pas une limite supérieure. En majorité ce sont des substitutions silencieuses qui distinguent les différentes copies de *mac-3*. Néanmoins, nous avons pu identifier jusqu'à trois séquences d'acides aminés différentes pour un seul individu. Un tel polymorphisme pourrait être le fruit de la multiplication des copies de ce gène, qui permettrait l'accumulation des mutations dans ces copies pourvu qu'une seule copie reste fonctionnelle. Mais la présence de plusieurs séquences polypeptidiques pour un même gène permet de proposer une alternative à cette explication mécanistique. Les substitutions d'acides aminés observés dans la partie N-terminale, notamment dans la région de liaison à la myosine, pourrait permettre une modulation de l'activité de cette actine est donc offrir une activité optimale dans un spectre de conditions physiques plus large. Cette dernière hypothèse présenterait un avantage adaptatif certain pour des animaux très dépendant du milieu environnemental, particulièrement pendant la phase larvaire.

Analyse des séquences N-terminales des actines de moule

L'analyse de la séquence de l'exon-1 des gènes d'actine de moule a montré l'existence d'un polymorphisme nucléotidique de l'ordre du pour-cent. En revanche, une seule séquence peptique a été identifiée pour un même gène sauf comme nous l'avons vu plus haut pour *mac-3*. La partie N-terminale de l'actine est connue pour sa relative variabilité dans une protéine de séquence très conservée phylogénétiquement. La séquence N-terminal de l'actine de moule, comme toutes les actines d'invertébrés, est plus proche de l'actine alpha-cytoplasmique de mammifère que de l'actine squelettique. Elle présente quelques caractéristiques notables:

- *mac-4* contient de façon surprenante une lysine, un résidu basique, au milieu de la série de résidus acides qui forme le site de liaison à la myosine. Une telle anomalie, bien vérifiée chez la moule, n'a été observée chez aucune des actines parmi les quelque 150 séquences actuellement connues.
- *mac-5* et *mac-6* contiennent des substitutions dans des positions jusqu'alors supposées invariables.

Etude de la spécificité d'expression selon les tissus et le stade de développement

L'analyse du taux relatif d'ARN de chaque gène présent dans différents tissus est actuellement menée par la technique de PCR quantitative. Les résultats sont encore trop préliminaires pour être détaillés ici. Cette approche est complétée par des expériences d'hybridation *in situ* sur des coupes de tissus d'adulte, menées par M. Comps (station de Palavas).

Des larves à divers stades de développement ont été obtenues grâce à une collaboration avec le CREUFOP (Université de Montpellier 2). L'ARN de ces larves est en cours d'analyse par la technique de PCR quantitative. Des larves ont également été fixées pour une analyse ultérieure par hybridation *in situ*.

Marqueur génétique intronique

Lors de la comparaison de la séquence du premier intron du gène *mac-1* de plusieurs clones isolés de la banque génomique de moule, nous avons identifié une séquence d'insertion encadrée par un motif en répétition directe. Cette séquence d'insertion s'est révélée polymorphe et a été utilisée dans une étude génétique du complexe d'espèce *Mytilus*. Il a notamment été montré que ce marqueur intronique permet une distinction claire entre des populations de *M. galloprovincialis* et des populations de *M. edulis*. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 1997.

Un programme d'étude du complexe d'espèces *Mytilus* utilisant ce marqueur est actuellement en cours pour clarifier les relations entre des populations de moules très distantes géographiquement. (P. Borsa, Laboratoire Génome et Populations).

Encéphalite du loup **Rappel des objectifs**

Ce programme avait pour but initial de définir les caractéristiques fondamentales du virus de l'encéphalite du loup. Les résultats obtenus ont permis des applications en matière de diagnostic.

Résultats 1997

Caractérisation du virus et de son cycle viral

Il ressort de notre étude que le nodavirus du loup possède les caractéristiques fondamentales de la famille des Nodaviridae mais que son mode d'assemblage, le mode de production de ses deux protéines de capsid et ses étroites spécificités de tissus et d'hôte le distinguent clairement des nodavirus d'insectes. Ces résultats qui devraient contribuer à la naissance d'un nouveau groupe systématique au sein de la famille des Nodaviridae, ont fait l'objet de 2 publications en 1997.

Diagnostic

Les retombées de l'étude du virus et de son cycle ont été la mise au point d'un diagnostic et la production d'outils utilisables dans un but épidémiologique et pour un vaccin.

Le diagnostic que nous avons mis au point au cours de cette étude a fait l'objet d'un transfert vers la société DIAHOSTICS. Toutes les informations matérielles et techniques nécessaires ont été transmises à cette société dès le début de l'année 1997.

Aide au programme d'étude de l'encéphalite du loup

Les éléments techniques et matériels ont été fournis au CNEVA (R. THIERY) et à la station de Palavas-les-Flôts dans le cadre de l'établissement d'un programme d'étude épidémiologique de la maladie et d'essai de vaccination.

Outre les protocoles techniques, le transfert a concerné:

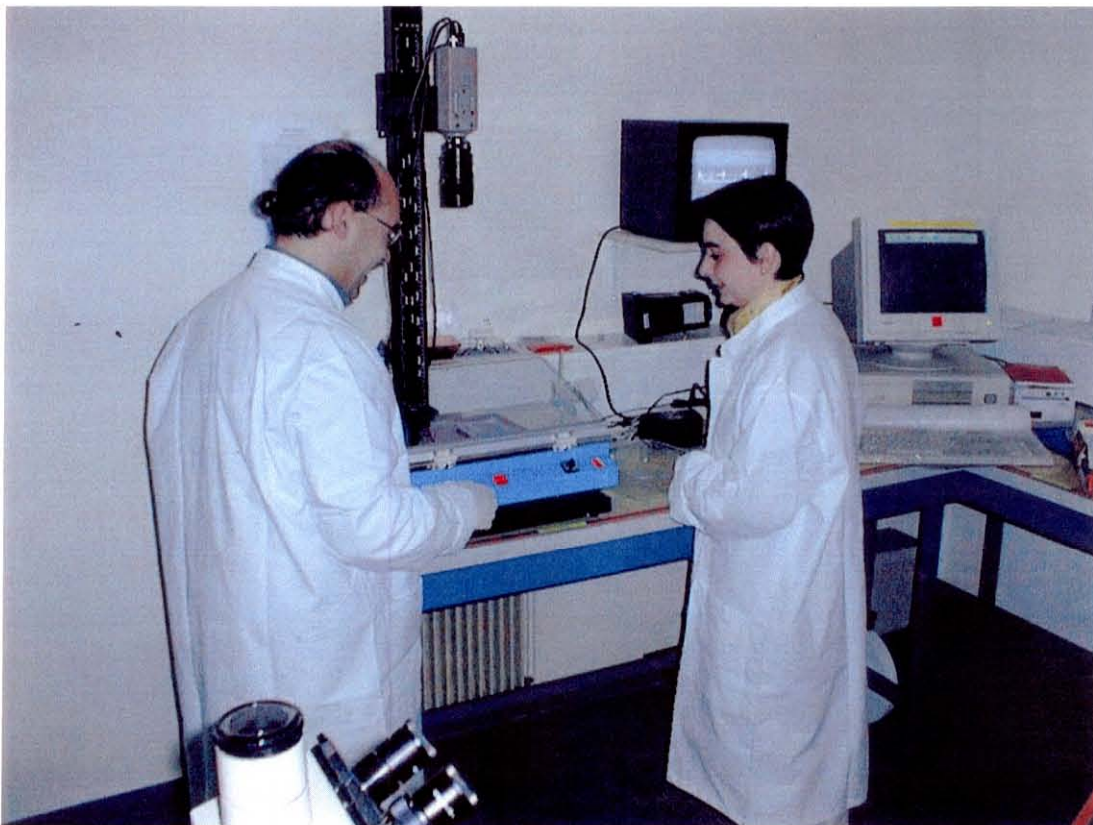
- Une construction contenant la séquence virale et les amorces nécessaires au diagnostic par PCR.
- Deux constructions contenant des fragments du grand segment (RNA1) du génome du nodavirus qui s'hybrident aux ARN 1 et 3.
- un vecteur bactérien d'expression de la protéine de capsid virale pour la production d'antigènes viraux.
- Un vecteur eucaryote d'expression de la protéine de capsid qui pourrait être directement injecté à l'animal.

Par ailleurs, un contact étroit reste établi avec R. THIERY du CNEVA.

PLANCHE 3



Migration sur gel d'agarose



Lecture du gel sur table UV.

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Ressources génétiques.

Marqueurs
génétiques

Rappel des objectifs

L'étude du polymorphisme de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire est un atout considérable dans les différents domaines que sont la recherche de parenté, l'étude des flux de gènes entre et à l'intérieur des populations, l'évaluation de l'importance de la diversité génétique et son maintien, enfin la cartographie génétique.

Le développement de ces marqueurs pour les huîtres, le bar et les crevettes est entrepris en France par l'IFREMER en association avec le laboratoire Génome et Populations de l'Université de Montpellier II dans le cadre de l'URM 16 et par l'intermédiaire de contrats européens avec l'IMBC (Institute of Marine Biology of Crete).

Résultats 1997

La recherche de marqueurs moléculaires des génomes mitochondriaux et nucléaires, en collaboration avec le laboratoire Génome et Population dirigé par François Bonhomme (Université de Montpellier II) et dans le cadre du programme européen "GENEPHYS", s'est concrétisée en 1997 par :

1. L'utilisation en routine au laboratoire de six marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Ces marqueurs montrent un important polymorphisme (entre 14 et 25 allèles selon les locus sur 50 individus de captage naturel en Baie de Quiberon). L'étude des liaisons génétiques de 12 locus microsatellites et 4 locus allozymes (en collaboration avec S. Hubert, UCG Galway) a permis d'identifier 9 groupes de liaisons, dont 4 impliquant au moins deux marqueurs. Ce résultat constitue une première base pour l'élaboration d'une carte de liaison du génome d'*Ostrea edulis* ($2N = 20$).
2. Les séquences de 5 microsatellites, obtenus pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* chez F. Bonhomme dans le cadre du programme européen "Genephy" (1996-2000), ont été transférés au laboratoire. La mise au point de ces marqueurs a été entreprise conjointement à celle des 3 locus précédemment développés par l'équipe d'E. Zouros en Grèce. Les 4 locus désormais utilisés "en routine" montrent un niveau de polymorphisme élevé avec plus de 52 à 56 allèles par locus. Ce fort niveau de variabilité ouvre la possibilité d'études de parenté, telles celle réalisés pour les croisements du programme « Genephy ».
3. L'étude de la différenciation entre populations d'huîtres creuses japonaises (*C. gigas*) et d'huîtres creuses portugaises (*C. angulata*) a été entreprise à l'aide de 4 locus microsatellites. La moyenne du nombre d'allèles par population est égale à 27. Les résultats obtenus sur un ensemble de 12 populations (468 individus au total) confortent l'hypothèse, émise à partir des marqueurs mitochondriaux, d'une origine taiwanaise de *C. angulata*. Les niveaux de différenciation observés entre populations sont relativement faibles (F_{st} global = 0.017, F_{st} par paires entre 0 et 0.044) et équivalent à ceux observés entre populations naturelles d'*Ostrea edulis*. Les populations de *C. angulata* montrent un niveau de polymorphisme équivalent à celles de *C. gigas*. On en

conclue que l'introduction d'huîtres creuses en provenance de Taïwan vers le Portugal au XV^{ème} siècle n'a pas entraîné de réduction notable de la variabilité génétique. Les allèles les plus fréquemment observés chez ce taxon, pour 3 des 4 locus étudiés, sont d'une tailles supérieures à ceux observés chez *C. gigas*. Les causes de ces différences de taille d'allèles (notamment la possible présence d'une insertion au sein du fragment amplifié) seront à rechercher par le séquençage de ces allèles.

4. La recherche de marqueurs mitochondriaux diagnostiques des espèces d'huîtres (programme « Qualité ») s'est poursuivie sur de nouvelles espèces. Le laboratoire dispose actuellement d'échantillons des taxons suivants : *C. angulata*, *C. gigas*, *C. rivularis*, *C. sikamea*, *C. virginica*, *C. iredalei*, *C. belcheria*, *C. margaritacea*, *C. echinata*, *C. gasar*, *C. rhizophorae*, *S. commercialis* et *S. cucullata*, *O. edulis*, *O. stentina*, *O. densalamellosa*, *T. lutaria*. Les profils de restriction de ces espèces du fragment mitochondrial 16S sont étudiés pour 9 enzymes. L'objectif est ici de disposer de marqueurs diagnostiques de chaque espèce. De tels marqueurs pourront être utiles en cas de litige ou d'importation douteuse (cf. programme « qualité des mollusques »). Ils représentent une première étape vers des études phylogénétiques plus fines, pour lesquelles une collaboration avec l'Université de La Rochelle a été initiée.

Ressources génétiques des huîtres creuses

Rappel des objectifs

Les objectifs de ce programme sont :

- l'étude de la structuration des populations sauvages et la diversité génétique disponible dans les populations sauvages et cultivées de *Crassostrea gigas*,
- la constitution d'un conservatoire de souches d'espèce du genre *Crassostrea* à La Tremblade

Résultats 1997

Le "conservatoire de souches" rassemble au sein d'une salle de quarantaine différentes espèces d'huîtres creuses. En 1997, Les espèces suivantes étaient représentées : *C. angulata* (Portugal, Espagne), *C. sikamea* (USA), *C. virginica* (Canada), *C. gasar* (Sénégal), *C. rhizophorae* (Martinique, Guyane), *C. rivularis* (USA), *S. commercialis* (Australie). Il s'agit soit d'individus « G0 » (c.a.d. directement importé du milieu extérieur) ou d'individus « G1 » (issus de la reproduction de G0 au sein de l'écloserie).

Parallèlement à ces différentes espèces, l'accent a été mis en 1997 sur la collecte de populations de *C. gigas* en provenance de diverses origines. Ainsi, des huîtres en provenance de Corée du Sud, de Taïwan, et du Pays de Galles sont désormais présentes au laboratoire. Ces populations G0 seront reproduites au laboratoire en 98 et leur descendances seront comparées. Ce point est en lien direct avec la thèse d'Arnaud HUVET qui a commencé fin 97.

Les croisements réalisés en 1997

Deux essais de productions par croisements intra et interspécifiques de *Crassostrea gigas* et de *Crassostrea angulata* ont été effectués en 1997.

- des mortalités sont survenues dans le premier essai après 15 à 17 jours d'élevage larvaire, la présence d'herpès virus a été confirmée par les analyses des pathologistes.
- le deuxième élevage réalisé en fin de saison de production a rencontré des difficultés au cours de la phase de fixation. La quantité d'animaux produits

n'a pas permis la réalisation d'un suivi de croissance comparée entre les différents lots hybrides et ceux issus de croisements intraspécifiques. Il a toutefois été possible de noter durant la phase larvaire, une croissance plus rapide des lots issus de géniteurs femelles de *Crassostrea angulata*.

Une tentative d'hybridation entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea rivularis* a permis d'obtenir deux lots d'animaux : un lot témoin de *Crassostrea gigas* et un lot "hybride" présentant un taux de survie proche de 6%. L'état hybride du second lot sera vérifié à l'aide d'un marqueur moléculaire nucléaire (fragment 28S en PCR-RFLP) en 1998.

Des larves viables pédivéligères (survie de 11%) ont été obtenues lors d'une tentative d'hybridation entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea sikamea*. Des difficultés ont également été rencontrées lors de la phase de fixation, l'expérience n'a pu être poursuivie.

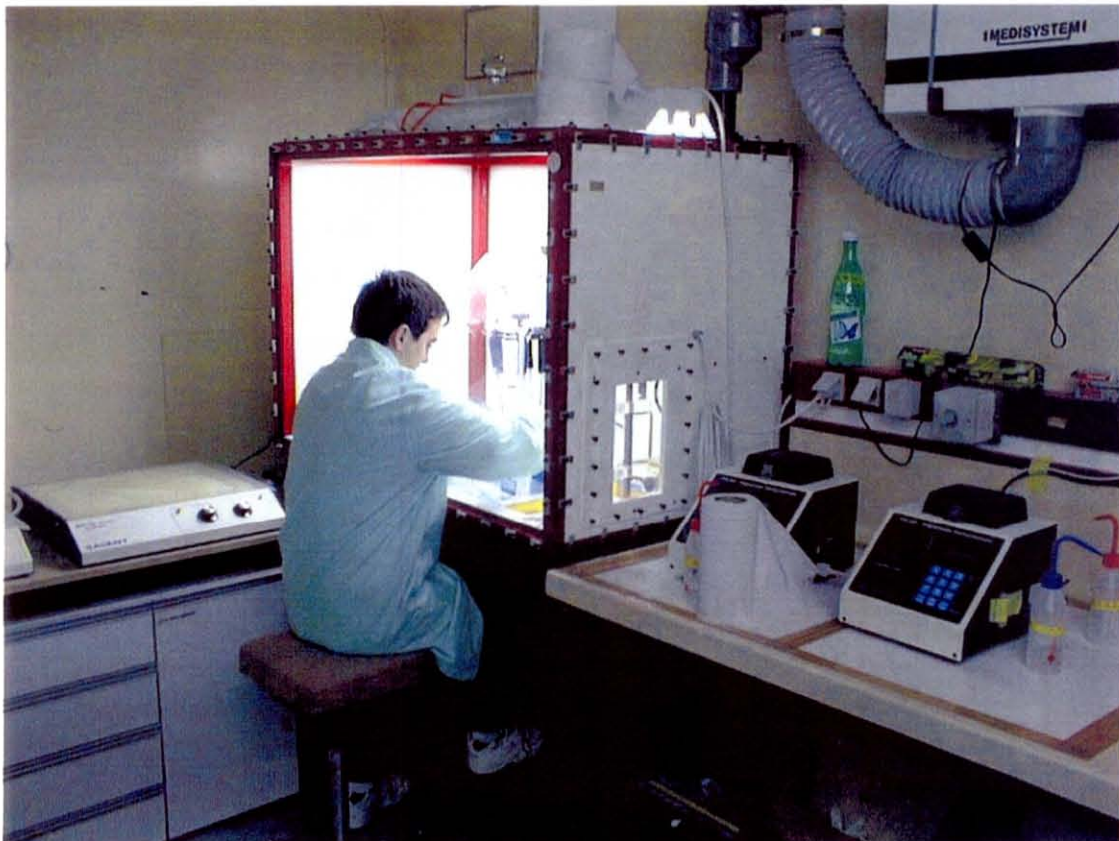
Etude caryologique

Une étude comparative des caryotypes de 6 espèces d'huîtres présentes au sein du conservatoire de La Tremblade (*C. angulata*, *C. sikamea*, *C. virginica*, *C. rivularis*, *C. gasar* et *S. commercialis*) a été réalisée par Drs. Catherine Thiriot et Alexandra Leitao de l'Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer. Les caryotypes obtenus (morphométrie et NORs) ont été comparés à ceux connus chez *C. gigas*. Trois groupes peuvent être distingués par analyse multivariée: (1) *C. gigas*, *C. angulata* et *C. sikamea*, (2) *C. rivularis*, *C. virginica* et *S. commercialis*, (3) *C. gasar*, qui se distingue nettement des autres espèces. Cette étude est actuellement soumise pour publication.

PLANCHE 4



Conservatoire de souches : huîtres *Crassostrea gigas* originaires du Japon.



Génotypage des huîtres par marqueurs moléculaires (microsatellites)

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Amélioration & sélection de souches.

Polyploïdisation Rappel des objectifs

L'objectif principal de ce programme est l'obtention de populations stériles par triploïdisation afin de réorienter le métabolisme énergétique en période estivale vers la croissance somatique et la constitution de réserves glucidiques.

Les tests en milieu naturel des populations triploïdes sont réalisés désormais à une échelle ostréicole, les actions sont coordonnées par des laboratoires régionaux de l'IFREMER et/ou par des structures régionales (SMIDAP, CREA, CEPRALMAR). Le laboratoire de La Tremblade n'intervient qu'en soutien pour la fourniture de lots triploïdes ou pour les analyses des taux de ploïdie par imagerie numérique. Désormais les efforts de recherche sont surtout consacrés à l'obtention de tétraploïdes afin d'obtenir des triploïdes par simple croisement et éviter ainsi le traitement chimique des œufs à chaque génération.

Résultats 1997

Productions de lots diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas*

Une première ponte a été réalisée au mois de mars pour fournir du naissain diploïde et triploïde au laboratoire Conchylicole de Méditerranée pour une opération de suivi dans l'étang de Thau en collaboration avec le CEPRALMAR, et, pour le CREA de l'île d'Oléron pour réaliser des contrôles de performances dans le bassin de Marennes-Oléron. Après une période de prégrossissement dans la nurserie IFREMER de Bouin, 5300 huîtres diploïdes et 12000 triploïdes de 8g environ ont été fournies à Palavas et 12000 diploïdes et 110000 triploïdes au CREA.

Une autre production a été réalisée au mois de mai dans le cadre d'une collaboration avec Taïwan, 250 000 larves pédivéligères diploïdes et 930 000 larves triploïdes prêtes à se fixer ont été expédiées par avion à la mi-juin. Les élevages sont en cours.

Des contrôles des taux de ploïdie par imagerie numérique ont été réalisés dans le cadre de l'expérience menée par le SMIDAP en Baie de Bourgneuf.

Production de lots d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* tétraploïdes

En 1995, des premières larves tétraploïdes viables avaient été obtenues par rétention d'un globule polaire d'œufs issus de femelles triploïdes fécondées par des mâles diploïdes. Suite à des problèmes zoosanitaires affectant tous les élevages en cours, ces larves n'avaient malheureusement pas survécu. En 1996, les élevages menés dans le cadre du projet européen GENEPHYS avaient monopolisé nos installations, les quelques expériences réalisées sur l'induction de la tétraploïdie s'étaient toutes révélées infructueuses.

En 1997, alors que nous avons prévu d'avoir un effort soutenu dans ce domaine, **trois lots de tétraploïdes ont été obtenus simultanément** dès le premier essai d'induction réalisé sur 5 femelles triploïdes. Ce succès ouvre des perspectives très intéressantes pour l'obtention d'huîtres triploïdes stériles ("huîtres des quatre

saisons") car elles pourront désormais être issues de simples croisements entre des individus diploïdes du milieu naturel et des individus tétraploïdes. Ce procédé d'obtention des triploïdes, basé sur des techniques de reproduction bien maîtrisées par les écloséries professionnelles, permettra de supprimer les inductions chimiques actuellement pratiquées et devrait pouvoir garantir 100% d'huîtres triploïdes à chaque génération. Il est important de souligner que ces huîtres tétraploïdes serviront exclusivement de géniteurs et qu'elles seront maintenues en milieu confiné. Leur valorisation au niveau national se fera en concertation avec le CNC et les Ministères concernés.

Sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* **Rappel des objectifs**

L'objectif principal de ce programme est l'obtention de souches d'huître plate *Ostrea edulis* présentant des taux de survie à taille commerciale suffisamment élevés pour relancer la culture de cette espèce. Ce niveau de performance peut être recherché par la sélection d'une résistance ou d'une tolérance au parasite *Bonamia ostreae* ou éventuellement par l'augmentation de la vitesse de croissance (pour arriver à taille commerciale avant que le parasite ne provoque de mortalités). La pression de sélection est exercée :

- par confrontation des huîtres avec le parasite dans le milieu naturel ou par inoculation selon les techniques mises au point par les pathologistes,
- par évaluation des performances de croissance dans différents environnements.

Résultats 1997

1 - Production de populations consanguines

En 1997, dans chacune des 6 fratries issues de pleins frères produites en 96, des couples de pleins-frères ont été constitués. Sur les 12 pontes recueillies, 2 seulement ont été menées jusqu'à la fin de la nurserie du fait de problèmes zootechniques et pathologiques. Fin 97, on dispose donc de 6 lignées en cours de constitution dont 4 en sont à leur première génération de consanguinité, et 2 à leur seconde.

Il est donc envisageable de tenter dans les années à venir de progresser d'une nouvelle génération de consanguinité tous les ans dans chaque lignée.

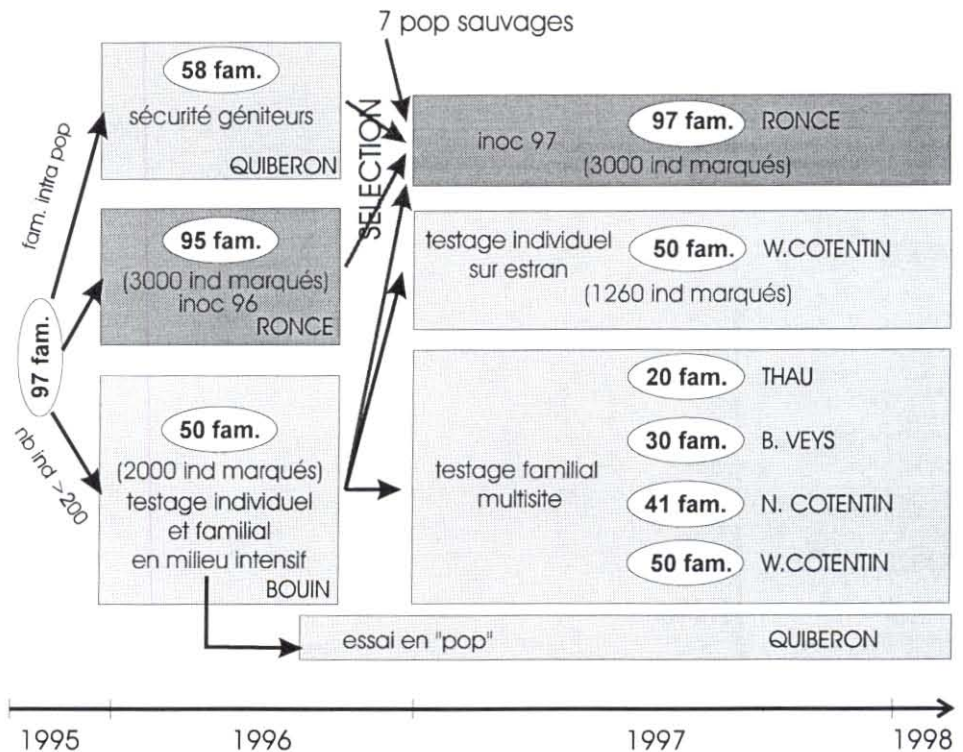
2 - Etude des performances des populations en sélection

Au stade actuel du programme, deux approches complémentaires sont nécessaires et inhérentes à tout programme d'amélioration génétique :

- le schéma de sélection *sensu-stricto*
- l'évaluation du progrès génétique utilisable

❖ sélection *sensu-stricto*

La contrainte du maintien de la plus grande variabilité génétique possible, impose une évaluation des performances sur l'ensemble des familles structurant les populations en sélection. Il est également indispensable de vérifier l'absence d'interaction génotype-environnement (c'est à dire l'absence de variation des classements individuels ou familiaux d'un environnement à l'autre) ainsi que la constance des performances au cours du temps. Dans cet esprit, plusieurs expériences ont été lancées à partir du matériel produit en 1995, elles sont résumées dans le schéma suivant et détaillées à la suite :



↳ *Evaluation des performances de croissance en milieu intensif*

Un dispositif expérimental avait été mis en place au mois d'avril 1996 à la station de Bouin. Après dédoublement en juin 96, 50 familles de 1995 étaient représentées par 200 individus (dont 40 marqués) répartis en 4 raceways béton. Cette expérimentation réalisée en collaboration avec l'équipe de Bouin supposait de leur part une zootecnie sans faille : contrôle quotidien des débits d'eau, d'air et de phytoplancton. Les suivis individuels jusqu'à début 97 ont permis de montrer la linéarité de la croissance ainsi que la forte corrélation entre vitesse de croissance et poids final corrigé des effets bassin. En février 97, une opération regroupant les laboratoires de Port-en-Bessin, Bouin, Ronce et Palavas a permis de peser la totalité des individus, de les étiqueter provisoirement (le temps de calculer leur poids corrigé des effets bassin) et de les répartir suivant la logique des expérimentations listées ci-dessous.

Les résultats font apparaître une forte variabilité inter-familiale au sein de chaque population, mais plusieurs tendances se dégagent : les familles hybrides des 3 populations en sélection sont globalement meilleures que les familles intra-population et ceci bien qu'elles aient été produites plus tard au cours du printemps 95. Les cinq témoins d'écloserie, produits à peu près en même temps que les hybrides, affichent des performances moins bonnes que les familles sélectionnées.

↳ *Sélection des géniteurs de la génération 98*

Afin de sélectionner sur un double critère de croissance rapide et de tolérance à la bonamiose, une sélection par double troncature a été mise en place sur les animaux produits en 1995 et représentatifs des trois populations IFREMER (Pop 85, Pop 89i et Pop 89ni) et sur des témoins d'écloserie, ainsi que sur des animaux sauvages de 7 origines différentes. L'ensemble de ces individus ont été étiquetés puis inoculés par du *Bonamia* en début d'année afin d'éliminer les animaux sensibles au parasite.

Les purifications et inoculations du parasite ont été réalisées en collaboration avec les pathologistes du laboratoire. Les animaux ont été répartis dans 2 race-

ways extérieurs alimentés en eau de mer. Le protocole prévoyait un suivi quotidien des mortalités pendant 6 mois, et la réalisation de frottis cardiaques sur les huîtres mortes afin de rechercher la présence de *Bonamia*. Environ deux tiers des animaux sont morts avant l'hiver. La recherche de *Bonamia* n'a été possible que dans une minorité de cas à cause de la décomposition rapide des huîtres mortes, ce qui interdit de faire toute comparaison inter-familiale de niveau de résistance au parasite. Néanmoins, l'opération a permis l'élimination d'individus sensibles au parasite, ce qui était le but essentiel visé.

↳ *Recherche d'éventuelles interactions génotype-environnement*

Les familles testées à Bouin en 1996 pour leur croissance en milieu intensif ont été réparties en 4 sites d'élevage (3 en Normandie, 1 sur l'étang de Thau). La comparaison des performances de croissance et de survie familiales entre ces 4 sites contrastés devrait apporter un élément de réponse sur l'existence d'interactions G x E. D'autre part, la comparaison des performances de croissance précoce en milieu intensif et des performances en milieu d'élevage traditionnel permettront d'évaluer la pertinence d'une sélection sur ce premier critère.

Une analyse rapide des premiers résultats indique une assez bonne corrélation entre performances familiales de croissance à Bouin en 96 et performances familiales sur la côte Ouest du Cotentin en 97. La survie était excellente sur les deux sites. En revanche, les performances de survie font apparaître que les huîtres de Méditerranée et de Thau survivent mieux à Thau et moins bien en Baie des Veys que les huîtres d'origine Atlantique, sélectionnées ou non.

↳ *Etude de la dynamique individuelle de croissance*

1260 individus caractérisés pour leur croissance en milieu intensif à Bouin en 96 ont été suivis en 97 sur la côte Ouest du Cotentin. L'expérience sera poursuivie en 98 afin de disposer d'un suivi individuel de deux années sur le même site. Une analyse rapide des résultats fait apparaître une corrélation entre performances 96 et performances 97

↳ *Suivi en "population"*

De nouveaux tests de croissance et de survie par "population" dans le milieu naturel en zone infestée par le *Bonamia* ont débuté en baie de Quiberon en juin 1996 ; leur suivi est assuré par le laboratoire RA de La Trinité-sur-mer. On distinguait à l'époque 4 "populations" : la "Population 85", la "Population 89" (mélange des populations 89i, 89ni et des hybrides 89i x 89ni), le "Mixage" (hybrides 85 x 89i et hybrides 85 x 89ni) et les témoins. Les études microsatellites ont montré depuis que cette classification était erronée, si bien que les comparaisons devront se limiter dans cette expérience aux performances des témoins contre celles de l'ensemble des familles sélectionnées. Le suivi trimestriel ne montrait pas encore de différence significative en terme de survie fin 97, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de la dynamique d'infestation par le *Bonamia*. L'expérience a donc été reconduite une année supplémentaire.

❖ *évaluation du progrès génétique utilisable*

En 1997, 7 groupes de reproduction constitués de 5 individus sélectionnés de 1995, non apparentés deux à deux, ayant survécu à l'inoculation précoce de 1996 et appartenant aux 5 meilleures familles pour la croissance ont permis de produire 9 lots multi-parentaux. A la sortie de la nurserie de Bouin (poids moyen > 0.5g), ces lots ont été mélangés en proportions égales pour constituer une population représentative du matériel qui pourrait être diffusé à partir des populations sélectionnées.

Parallèlement, 7 pontes collectives d'individus sauvages ont été élevées jusqu'à la sortie de la nurserie puis ont été mélangées en proportions égales pour constituer une population représentative des productions d'écloseries non sélectionnées.

Les lots "élites" et "témoin d'écloserie" ainsi constitués ont été mis en élevage à l'automne 97 sur deux sites indemnes de *Marteilia* (Etel en Bretagne Sud et Cote Ouest du Cotentin). Ils seront suivis en croissance et survie jusqu'à fin 2000 parallèlement à deux lots de naissain sauvage commercialisés aux printemps 97 et 98 (respectivement captés en 96 et 97). Il sera ainsi possible d'évaluer à petite échelle l'intérêt d'un éleveur pour les productions d'écloserie, sélectionnées et non sélectionnées, par rapport aux techniques traditionnelles.

Cette expérience constitue le prototype d'une opération à plus grande échelle où les différents partenaires de la filière devront collaborer pour faire une évaluation économique des populations en sélection.

3 - Evaluation du polymorphisme génétique

Tous les géniteurs potentiels ayant participé ou non la création de la 3ème génération de la Population 85, de la 2ème génération des 2 populations 89 et de la population témoin, ont été biopsés. Une analyse du polymorphisme de chaque population a été effectuée à l'aide de 5 marqueurs microsatellites.

Toutes les populations sélectionnées présentent un nombre d'allèles très inférieur à la population témoin. Le nombre de géniteurs à l'origine de la Population 85 a été estimé entre 15 et 20. Le niveau d'hétérozygotie dans la deuxième génération de cette population n'étant pas significativement plus faible que celle de la population témoin, l'effet de la consanguinité n'est pas visible dans cette deuxième génération.

En ce qui concerne les populations 89, le niveau de polymorphisme révélé par les microsatellites a permis d'identifier les pontes à l'origine de la première génération de ces populations (alors que celles-ci étaient issues de bacs de pontes collectives contenant une centaine de reproducteurs). Il a ainsi été possible de mettre en évidence que les familles biparentales créées en 1995 ont des niveaux de consanguinité différents.

Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Rappel des objectifs

Ce programme, co-financé par la région Poitou-Charentes dans le cadre du XIème plan pour sa partie investissement et par l'Union Européenne dans le cadre du projet GENEPHYS pour sa partie fonctionnement, associe des partenaires anglais, irlandais, grecs et français. Ce vaste projet a débuté en janvier 1996, sa coordination est assurée par l'IFREMER (coordination générale : A. Gérard, coordination des aspects génétiques : P. Boudry, coordination des aspects physiologiques : S. Bougrier du CREMA L'Houmeau).

Il vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance (respiration, assimilation, digestion, excrétion, rendement métabolique, etc...) et leurs bases génétiques (déterminisme, variabilité intra et inter-populations, hétérozygotie, accidents chromosomiques, etc...). L'objectif final étant d'évaluer les possibilités de sélectionner des huîtres creuses *Crassostrea gigas* possédant de meilleurs rendements métaboliques pour des caractères physiologiques comme la nutrition ou la respiration par exemple.

Résultats de l'année 1997

La première année du programme était principalement dédiée à la production de

matériel biologique, au développement de nouvelles techniques d'estimation des paramètres physiologiques et de nouveaux marqueurs génétiques. La seconde année a surtout été consacrée au recueil de nombreuses données sur la croissance, la physiologie et la génétique issue de l'analyse des mêmes individus.

Suivi des performances de croissance

Un premier groupe d'individus issus des croisements 5X5 effectués en 1996 ont été marqués individuellement à La Tremblade. Le contrôle des performances de croissance a révélé aux stades précoces, une grande ainsi qu'une constance de la vitesse de croissance au cours du temps. Environ 50 % de la variation du poids total observée l'année 2 peut être expliquée par le poids total atteint à la fin de l'année 1. Parmi ces animaux, un échantillon a été choisi pour effectuer les mesures physiologiques décrites au paragraphe suivant.

Parallèlement, deux autres expériences ont été conduites dans la nurserie de Bouin et dans l'étang de Thau. Dans l'expérience menée à Bouin, les 3 populations 5X5 ont été élevées dans différentes conditions de niveau de compétition trophique (faible, moyen et élevé) permettant de fournir de nouveaux résultats sur la variabilité et la plasticité de la croissance. Cette expérience montre que les huîtres maintenues dans des conditions de faible et moyenne compétition trophique ont des performances similaires de croissance et qu'il n'y a pas d'interaction entre le niveau de compétition trophique et la relation entre poids total initial et vitesse de croissance. L'expérience réalisée dans l'étang de Thau est en cours de traitement.

Les vitesses de croissance sont significativement différentes entre les 3 types de croisement 5X5. Ce résultat tend à supporter l'idée d'une base génétique à ces différences observées entre les populations.

Analyses physiologiques

Deux expériences principales coordonnées par le CREMA, ont été effectuées sur la population G1: l'évaluation de la stabilité temporelle des paramètres physiologiques et la détermination des performances physiologiques (fonctions métaboliques, turn-over des protéines, activité des enzymes digestives).

Un dispositif de mesure en continu de l'acquisition de l'énergie (filtration) et des dépenses énergétiques (consommation d'oxygène) a été développé dans le but d'améliorer l'estimation des différents paramètres du bilan énergétique. L'étude de la stabilité temporelle est basée sur les paramètres estimés à l'aide de ce dispositif expérimental. Les mêmes individus ont été et seront ainsi étudiés à plusieurs reprises : Septembre 97, Octobre 97, Décembre 97 puis février 98 et Avril 98. Les valeurs moyennes observées du RTA (Respiratory Time Activity: pourcentage du temps passé par l'animal à consommer de l'oxygène sur la période de mesure) sont en accord avec les travaux antérieurs. Pour le moment, aucune stabilité temporelle des paramètres physiologiques n'a pu être mise en évidence, mais c'est la première fois que de telles estimations sont faites et analysées individuellement. L'analyse globale des 5 séries d'expériences sur les mêmes individus devrait permettre de conclure sur l'existence ou non d'une stabilité temporelle des paramètres physiologiques.

Un autre échantillon de la G1 a été acclimaté à une faible température et une faible quantité de nourriture. Le bilan énergétique de ces animaux a été déterminé par des mesures ponctuelles selon la méthode en flux continu. A l'issue de ces mesures non-destructives, le turn-over des protéines a été déterminé. Les animaux ont ensuite été sacrifiés, échantillonnés et divisés entre les différents

partenaires pour le dosage de l'activité des enzymes digestives et protéolytiques et le typage pour les locus enzymatiques et microsatellites. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les populations pour les paramètres nutrition et activité des enzymes digestives, excepté pour le poids de chair sèche. Par contre les différences individuelles observées pour les enzymes digestives pourraient être expliquées par l'existence de 2 groupes d'animaux. Les huîtres du premier groupe montrent une activité enzymatique plus faible, caractérisée par une affinité plus grande à la nourriture ingérée que les huîtres du second groupe. De la même manière, deux groupes d'individus peuvent être distingués selon la relation entre leur scope for growth et leur poids sec estimé.

PLANCHE 5



Maturation des huîtres plates *Ostrea edulis* dans le cadre du programme de sélection.



Productions larvaires dans le cadre du projet "GENEPHYS".

FONCTIONNEMENT GENERAL DU LABORATOIRE

Animation scientifique

Parmi les nombreuses activités du laboratoire, l'activité d'animation scientifique de réseaux ou de programmes est très prenante. Les animateurs y consacrent beaucoup de temps en organisation, comptes rendus de réunions, coordination de programmes...

- **Berthe F.** : Animation du réseau IFREMER pathologie mollusques (REPAMO).
- **Berthe F.** : Animation du laboratoire de référence pour les maladies des mollusques pour L'Union Européenne et l'Office International des Epizooties.
- **Gérard A.** : Animation des programmes génétiques du département "Ressources Aquacoles".
- **Gérard A.** : Animation du réseau génétique mollusques (REGEMO).
- **Gérard A.** : Coordination de l'URM 16 "marqueurs génétiques".
- **Gérard A., Boudry P.,** : Coordination du programme européen GENEPHYS.
- **Goyard E.** : Animation du réseau mollusques ressources aquacoles (REMORA) jusqu'en septembre 1997.

Fonctionnement de REGEMO

Une réunion plénière a été organisée à Nantes le 12 mars 1997, en présence de représentants du CNC, du syndicat des écloveurs et des écloveurs non affiliés, de représentants d'organismes régionaux (SMEL, SMIDAP, CREEA, CEPRALMAR) et du SYSAAF, et, au niveau de l'Institut, du directeur du département des Ressources Vivantes, des responsables de laboratoires régionaux et des généticiens de La Tremblade. Cette réunion avait un double objectif : faire le point sur les programmes génétiques menés par l'Institut et discuter avec les représentants professionnels et régionaux sur leurs souhaits en matière d'amélioration génétique chez les mollusques bivalves.

D'autres réunions REGEMO, se sont tenues en cours d'année pour discuter d'aspects plus techniques ou organisationnels avec les différents laboratoires régionaux de l'IFREMER, notamment sur les problèmes zootechniques rencontrés dans l'écloserie de La Tremblade et sur les perspectives de valorisation et de transfert des souches génétiques auprès des producteurs.

Fonctionnement de REPAMO

Une réunion plénière a été organisée à Nantes, début 1998. Cette réunion a été l'occasion de dresser un rapide bilan des activités du réseau. L'analyse du premier réseau d'essai inter-laboratoires a été réalisé. Le choix de nouveaux couples d'amorces pour la détection du virus de type herpès a été fait. Cette journée de travail s'est attachée à préciser les différentes actions en cours pour tenter d'expliquer les phénomènes de mortalité anormale de *C. gigas*, rappeler l'organisation et le fonctionnement du réseau, et à dresser les perspectives de travail pour 1998.

Fonctionnement de REMORA

Le Réseau Mollusques Ressources Aquacole (REMORA) a été animé à partir de la station de La Tremblade du 01/09/96 au 01/09/97 alors que le laboratoire de La Trinité-sur-mer assure normalement cette tâche. Cette situation transitoire

Activités d'avis ou d'expertise	<p>s'explique par le délai de remplacement de son animateur, muté de La Trinité-sur-mer à La Tremblade pour y être formé en génétique. La coordination a consisté en 1997 à assurer la continuité de ce programme de suivi à long terme jusqu'à l'arrivée du nouvel animateur à la Trinité-sur-mer.</p> <p>Berthe F. : Expert auprès de la Fish Disease Commission de l'Office International des Epizooties pour les maladies des mollusques (29/09-01/10 1997).</p> <p>Berthe F. : Expert auprès de la DG XIV de l'Union Européenne pour les maladies des mollusques (14/03/97).</p> <p>Gérard A.. : Membre du CIEM groupe WGAGFM (génétique).</p> <p>Gérard A. : Membre de la Commission Scientifique CB2 de l'IFREMER "Chimie, Biologie, Biotechnologie des organismes marins exploités". Cette commission a pour mandat l'évaluation des activités des laboratoires et la rédaction de rapports prospectifs sur les domaines d'intervention.</p> <p>Gérard A. : Membre de la Commission des Bourses de l'IFREMER.</p> <p>Gérard A. : Membre de la Commission d'Evaluation Unique de l'IFREMER</p> <p>Gérard A. : Membre du comité technique du CREEA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole).</p> <p>Gérard A. : Membres du Comité de programme du département "Ressources Aquacoles".</p> <p>Gérard A., Renault T. : Membre du Comité de Direction du département "Ressources Aquacoles".</p> <p>Renault T. : Membre du CIEM groupe WGPDMO (pathologie)</p>
Participation à des groupes de réflexion	<p>Berthe F. : Participation au groupe français de l'"European Association of Fish Pathologist" sur le thème de l'épidémiologie des espèces aquacoles.</p> <p>Berthe F. : Participation au groupe d'organisation d'une conférence internationale pour l'analyse de risque en aquaculture qui se tiendra à Paris début 2000 sous l'égide de l'Office International des Epizooties.</p> <p>Gérard A., Boudry P., Barré M., Goyard E. : Organisation et participation aux différents groupes de réflexion menés au sein de l'Institut dans le domaine de la génétique des poissons, crustacés et mollusques.</p> <ul style="list-style-type: none">⇒ valorisation en amélioration génétique : le cas des souches d'huîtres plates sélectionnées par l'IFREMER⇒ gestion génétique du stock de géniteurs d'ombrine <i>Sciaenops ocellatus</i> en Martinique : stratégie de fermeture et possibilités de sélection⇒ amélioration génétique de la crevette <i>P. stylirostris</i> <p>Thébault A., Renault T., Berthe F., Gérard A. : Participation à des groupes de travail, en présence ou non de professionnels, concernant les problèmes de mortalités d'huîtres dans les bassins conchylicoles et dans les écloséries.</p>
Assistance scientifique	<p>Berthe F. : Assistance en bactériologie aux programmes de pathologie des pénéides menés en Nouvelle-Calédonie : mise au point d'une méthode d'identification bactériologique de <i>Vibrio penicida</i>.</p> <p>Delsert C. : Assistance en biologie moléculaire au sein du laboratoire "Génome et Populations" de la station Ifremer Sète dans le cadre de l'URM 16 et dans de nombreux autres programmes de l'Institut.</p> <p>Goyard E., Barré M., Boudry P. : aide à la conception du programme Ombrine</p>

du laboratoire RA de Martinique : fermeture du stock de géniteurs, gestion de sa diversité et bases d'un programme de sélection.

Assistance technique

- Fournitures de souches de phytoplancton à des écloseries locales et au lycée Aquacole de Bourcefranc.
- Production de phytoplancton pour les expériences menées par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) et le CREMA L'Houmeau.
- Maturation de géniteurs de *Crassostrea gigas* pour le laboratoire DEL d'Arcachon, l'Université de La Rochelle, l'Université de Brest.
- Prégrossissement de naissain naturel de *Crassostrea gigas* pour la station zoologique de Villefranche-sur-Mer.
- Aide logistique aux expériences menées par la DEL et par le LCPC.

Astreintes

Le fonctionnement de l'écloserie génétique nécessite une présence quotidienne. Le personnel scientifique du laboratoire s'est ainsi partagé 114 demi-journées de travail effectif durant les week-ends et les jours fériés en 1997. Afin d'être en accord avec les règles de sécurité, un minimum de deux personnes est requis sur l'implantation, ce travail est assuré par un agent de l'équipe génétique avec un collègue appartenant soit à l'équipe de pathologie, soit au LCPC ou au laboratoire DEL.

Coopération internationale

Boudry P. : Projet de coopération Franco-Australien pour l'élaboration d'une carte de liaison chez *Crassostrea gigas* à partir de marqueurs microsatellites.

Boudry P. : Coopération avec le Taiwan Fisheries Research Institute pour l'échange de matériel biologique en lien avec les programmes conservatoires de souches et popploïdisation.

Manifestations

Participation à l'animation du stand IFREMER au salon ostréicole de La Tremblade, du 25 au 27 avril 1997.

Journées Portes Ouvertes de la station de La Tremblade pendant les journées de "Sciences en fête", le 10 octobre 1997 pour les scolaires, et le 11 octobre pour le grand public.

Visites

Le laboratoire a reçu de nombreux visiteurs tout au long de l'année, professionnels, étudiants, chercheurs français et étrangers. Parmi ces visiteurs, on peut citer :

Février Visite du Dr Tony ANDREW et du Dr Fionnala Mc KELVEY de l'University of Ulster School of environmental (Irlande).

Mai Visite de chiliens de la "Fondation d'océanographie et de biologie marine" sous la direction du Dr Juan C. Castilla.

Septembre Visite du Dr Tracey de Nouvelle Zélande.

 Visite de trois Ukrainiens sous la direction du Dr Valentin Kholodov dans le cadre d'un échange franco-ukrainien organisé par le CEMPAMA.

Octobre Visite du Dr Wolovicz et du Dr Latala dans le cadre de la coopération franco-polonaise.

Visite d'un groupe de l'école de statistiques ITCF

Décembre Visite du Dr Dumitrescu et du Dr Zaharia "Romanian Marine Research Institute" de Constanta dans le cadre de la coopération franco-roumaine

Accueil de chercheurs

Almeida Maria Manuela : (Université d'Algarve-FARO-Portugal) séjour de 6 mois au laboratoire (oct.96-mai 97) pour développer des recherches dans le cadre d'une convention de coopération entre l'Université d'Algarve et l'IFREMER sur l'"étude de l'agent pathogène *Perkinsus atlanticus* chez palourdes *Ruditapes decussatus*, par techniques immunologiques et sérologiques".

Collins Catherine (Université de CORK-Département de Zoologie) séjour post-doctoral d'une durée de 9 mois dans le cadre du laboratoire communautaire de référence.

Lango Fabiola : (étudiante mexicaine en thèse à l'UBO Brest), thèse sur "les paramètres influant sur le déterminisme du sexe chez *Crassostrea gigas*" sous la co-responsabilité scientifique d'André Gérard. Plusieurs séjours à La Tremblade au cours de l'année.

Leitao Alexandra : (étudiante portugaise en thèse de C. Thiriot à l'Observatoire de Villefranche/Mer), plusieurs séjours dans le cadre des actions de recherche prévues dans GENEPHYS.

Missions à l'étranger

Berthe F. : Mission Nosy-Be, Madagascar. Assistance technique à l'écloserie d'Aqualma. Juin

Berthe F. : Mission Brussel, Belgique - groupe des maladies des poissons de la DG XIV mars 1997.

Berthe F., Renault T., Collins C. : Eight International Conference on "Disease of Fish and Shellfish", Edimbourg, 14 au 19 septembre 1997.

Boudry P. : Participation au workshop "Aquaculture species genome mapping" à Dartmouth aux USA du 17 au 20/05/97.

Boudry P. : Coopération IFREMER/NFRDI Ressources génétiques de l'huître creuse. Pusan, Korea, 7-13 décembre 1997. Voyage pris en charge par le MAE et le séjour par le NFRDI.

Boudry P. : Orateur invité au séminaire "Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean" TECAM. Saragosse, Espagne 28-30 Avril.

Gérard A. : Mission d'expertise du département "Ressources Aquacoles" sur les programmes développés à Tahiti du 24/03 au 30/03/97.

Launey S. : 6^{ème} congrès de la Société Européenne de Biologie Evolutive, Arnhem, Netherlands, 24-28 Aout.

Renault T. : Réunion projet ROMEO, Guernesay, 30 octobre 1997

Réunions contrats CEE

Equipe pathologie : Dans le cadre des mandats du "laboratoire communautaire de référence en pathologie des mollusques bivalves", organisation du premier groupe de travail des laboratoires nationaux de référence pour les maladies des mollusques du 06 au 10 Octobre 1997, sur le thème des mortalités anormales et de l'infection à herpès virus (DGVI).

Delsert C. : Réunion finale du programme CEE-AIR3 à Faro (Portugal). 13-18/12/97.

Gérard A., Boudry P., Collet B., Heurtebise S. : organisation de la troisième réunion plénière du projet "GENEPHYS" au CREMA l'Houmeau les 13 et 14 novembre 1997 en présence de tous nos partenaires français et étrangers.

Formation
diplômante

Cochennec N. : Soutenance de son mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes – "La Bonamiose : caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*". A Nantes, le 20 février 1997.

Collet B. : Deuxième année de thèse portant sur "l'Etude des bases génétiques et de la variabilité des caractères impliqués dans la croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas*." Cette thèse s'inscrit dans le contexte scientifique du programme CEE-FAIR "Genephys", elle est suivie conjointement par le GAP La Tremblade et le CREMA l'Houmeau.

Launey S. : Troisième année de thèse portant sur la "Recherche de marqueurs génétiques et l'évaluation de la variabilité génétique dans le cadre d'un programme de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae*".

Xue Q. (Etudiant chinois) 1995-1996 : Deuxième année de formation doctorale - Etude morphologique et fonctionnelle des hémocytes de l'huître plate, *Ostrea edulis*.

Formations reçues

Albert-Rivet F. : Stage de 3 jours de formation à "GESBIB" et à "BRS" à La Tremblade (formation interne).

Chollet B. : "PCR - quelques applications"- 1 semaine - CNRS à Orsay

Boudry P. : Stage de radio compétence à l'APAVE de Nantes (7 jours)

Gérard A. : Stage d'une semaine sur la gestion de projets à Nantes.

Goyard E. : Formation CSAGAD "*Cours supérieur d'amélioration génétique des animaux domestiques-Session Amélioration génétique en milieu aquatique*" sessions 5, 6, 7 et 8 appliquées aux principales filières animales ; février, mai, juin et octobre 1997.

Grasset M. et Simian Y. : stage de formation interne au logiciel de gestion SIOUX (2 jours)

Heurtebise S. : "PCR - quelques applications"- 1 semaine - CNRS à Orsay.

Phélipot P. : Stage d'une semaine "PC : accès à l'environnement".

Renault T. : Formation Expérimentation Animale niveau I, 27 au 30 janvier 1997 – PCR in situ, Université Claude BERNARD Lyon I, 17 au 21 novembre 1997

Simian Y. : stage d'anglais de 4 semaines au CAREL de Royan.

Thébault A. : "PCR - quelques applications"- 1 semaine - CNRS à Orsay

Formations
dispensées

Les cadres du laboratoire ont assuré de nombreuses heures d'enseignement dans le cadre de formation en Université, en école vétérinaire ou dans le domaine professionnel :

Equipe pathologie : Dans le cadre des mandats du "laboratoire communautaire de référence en pathologie des mollusques bivalves", formation des experts des laboratoires nationaux de référence aux techniques de diagnostic des maladies des mollusques bivalves. La Tremblade, 08 et 09 octobre 1997.

Berthe F. : Conduite du diagnostic des maladies en élevage des pénéides tropicales (8 heures de cours et travaux pratiques) dans le cadre de la formation en pathologie aquacole des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Boudry P. : Cours de génétique des populations chez les bivalves marins (4 heures) à la Maîtrise de Biologie de l'Université de La Rochelle.

Boudry P., Goyard E. : Cours de "Génétique et sélection des mollusques bivalves", Formation CSAGAD "*Cours supérieur d'amélioration génétique des animaux domestiques - Session Amélioration génétique en milieu aquatique*" session 7 : "Amélioration génétique en aquaculture" ; Camaret, mai 1997.

Gérard A. : "Notion de génétique et de pathologie" dans le cadre de la formation des "Jeunes ostréiculteurs-DJA" à Beauvoir/mer (4 heures).

Renault T. : Cours sur les pathologies des mollusques bivalves marins, DEA Biologie et Productions Animales, Université de Rennes I, 14 novembre 1997, 4 heures

Renault T. : Cours et travaux pratiques sur les maladies des mollusques bivalves marins, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 17 décembre 1997, 6 heures

Revue d'articles et de projet.

Boudry P. : Revue d'un article pour Marine Ecology.

Boudry P. : Revue d'un projet dans le cadre de l'appel d'offre BRG.

Naciri-Graven Y. : Revue d'un article pour Aquating Living Resources.

Jury de thèse ou de mémoire d'étudiant.

Renault T. : Membre du jury du mémoire EPHE présenté par Nathalie Cochenec à Nantes, le 20 février 1997.

PUBLICATIONS 1997

Revue à comité
de lecture

Baud J.P., A. Gérard, Y. Naciri-Graven., (1997). Comparative growth and mortality of *Bonamia* resistant and wild flat oysters *Ostrea edulis* in an intensive system. I. First of experiment. *Marine Biology*, 130(1), 71-79.

Berthe F., (1997). Diseases of molluscs. In : Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. *Office International des Epizooties* : 181-206

Boudry P., B. Chatain., Y. Naciri-Graven., C. Lemaire & A. Gérard, (1997). Genetical improvement of marine fish and shellfish : a french perspective. *Proceedings of the 5th International Conference for Productivity Enhancement of the Coastal Waters*. Pusan, Korea, May 23-24 1996, 141-150.

Delsert C., N. Morin. & M. Comps., (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Arch. Virol.* **142**, 2359-2371

Delsert C., N. Morin ., M. Comps , (1997). Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *J. Virology* **71**(7), 5673-5677.

Denis M. G., C. Lipart, J. LeBorgne, P. A. Lhur, J. P. Galmiche, M. Denis, E. Ruud, A. Truchaud & P. Lustenberger (1997). Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **74**, 540-544.

Le Néel T., C. Morlet-Renaud, C. Lipart, A. Gouyette, A. Truchaud & C. Merle (1997). Image analysis as a new technique for the study of water uptake in tablets. *S.T. P. Pharma Sciences* **7**(2), 117-122.

Ohresser M., P. Borsa & C. Delsert, (1997). Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **6**(2) : 123-130

Van Dijk H., P. Boudry., H. McCombie., P. Vernet., (1997). Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Oecologia* **18**(1) : 47-60

Sous presse

Almeida M., F. Berthe., A. Thébaud & M. T. Dinis. (in press). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*.

Bierne N., S. Launey, Y. Naciri-Graven & F. Bonhomme (in press). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*.

Boudry P., S. Heurtebise, B. Collet., F. Cornette & A. Gérard (in press). Differentiation between populations of the Portuguese *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*

Boudry P., M. Barré & A. Gérard (in press). Genetic improvement and selection in shellfish: a review based on oyster research and production. *Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean TECAM, Zaragossa, Spain, April 28-30,*

Cochennec N., T. Renault, P. Boudry, B. Cholet & A. Gérard (in press). *Bonamia*-like in the suminoe oyster, *Crassostrea rivularis* (Gould) reared in France. *Disease of Aquatic Organisms*.

Colloques et
congrès

Barré M., Y. Naciri-Graven, P. Boudry, E. Goyard, S. Launey, N. Cochennec, S. Heurtebise, C. Ledu, P. Phelipot & A. Gérard, (1997). Historique, expériences en cours et perspectives du programme de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour la résistance à la bonamiose. Journées Conchylicoles IFREMER Nantes, 18-19 mars.

Berthe F., M. Pernas, M. Zerabib, R. Rodriguez, P. Haffner, P. G. Sauriau, C. Collins & A. Figueras, (1997). *Marteilia* life cycle : exploring the hypothesis of an intermediate host. VII th International Conference "Disease of fish and shellfish", Edimbourg, U.K. 15-19 septembre

Berthe F., (1997). The Community reference laboratory for bivalve mollusc diseases. First workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases, La Tremblade 06-10 octobre 1997.

Berthe F., P. Haffner, M. Zerabib & D. Rodriguez, (1997). Que savons-nous des *Marteilia* ? Journées Conchylicoles Ifremer Nantes 18-19 mars 1997.

Berthe F., A. Thébault & H. Grizel, (1997). La réglementation zoosanitaire et son application à la conchyliculture.

Berthe F., D. Rodriguez, P. Haffner & C. Collins, (1997). Que savons-nous des *Marteilia*? Groupement des protistologues de langue française, XXXVème réunion annuelle, Paris 8-11 mai 1997.

Boudry P., S. Heurtebise, B. Collet, F. Cornette, C. Ledu., P. Phelipot & A. Gérard, (1997). Ressources génétiques chez les huîtres creuses : conservatoire de souche et marqueurs moléculaires. Journées Conchylicoles IFREMER Nantes, 18-19 mars.

Boudry P., M. Barré & A. Gérard, (1997). Genetic improvement and selection in shellfish: a review based on oyster research and production. *Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean TECAM. Zaragossa, Espagne 28-30 avril.*

Boudry P. & M. Barré, (1997). Génétique et sélection chez les huîtres creuses et plates. 19th annual meeting of the Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Perpignan, 2-5 Septembre.

Collet B., P. Boudry, S. Bougrier, S. Heurtebise, P. Phelipot, C. Ledu., B. Morand, M. Héral & A. Gérard, (1997). Etudes des bases génétiques et de la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Journées Conchylicoles IFREMER, Nantes 18-19 mars.

Collet B., P. Boudry., S. Heurtebise, B. Morand & Gérard A., (1997). Relations entre date de fixation, croissance et hétérozygotie aux marqueurs microsatellites chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Poster at the 19eme reunion du Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Perpignan, 2-5 septembre.

Launey S., Y. Vigouroux, Y. Naciri-Graven & F. Bonhomme, (1997). Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate (*Ostrea edulis*) : apport des marqueurs microsatellites. 3ème Colloque "Microsatellites et génétique des populations", Paris, 26-27 juin.

Launey S., Y. Vigouroux, Y. Naciri-Graven, P. Boudry, C. Ledu, M. Barré & F. Bonhomme., (1997). Growth-heterozygosity relationship in oysters: new evidence from microsatellite markers. VIth congress of the European Society for Evolutionary Biology, Arnhem, Netherlands, 24-28 août.

Lango-Reynoso F., P. Boudry, A. Gérard & M. Le Pennec, (1997). Différenciation sexuelle chez les mollusques bivalves. Talk at the 4th Atelier Déterminisme et Différenciation du Sexe. Rennes, 9-10 octobre.

Renault T., R. M. Le Deuff, C. Delsert & A. Gérard, (1997). Study of herpes-like viruses in oysters : virus purification and molecular probe preparation for diagnosis. VIth International Convergence "Diseases of fish and Shellfish", Edimbourg, 15-19 september.

Renault T., R. M. Le Deuff R.M., C. Delsert & A. Gérard, (1997). Study of herpes-like viruses in oysters : virus purification and molecular probe preparation for diagnosis. First Workshop of the National Reference Laboratories for Bivalves Molluscs Diseases, La Tremblade - 6 au 10 octobre.

Thébault A., F. Berthe, T. Renault, (1997). Epidemiological survey for bivalve molluscs disease in France. Report of the meeting of 8th congress of ISVEE. July 1997. Paris.

Thébault A., (1997). Methodological approach of massive mortalities. Report of the workshop on "Abnormal mortalities and Herpesvirus diagnosis" in La Tremblade, October 1997.

Autres types de rapports

Barré M., E. Goyard, P. Boudry, A. Gérard & Y. Naciri-Graven, (1997). Réflexion autour d'une valorisation en amélioration génétique : le cas des lignées d'huîtres plates sélectionnées par l'IFREMER, Rapport Confidentiel diffusé au Comité de Direction du Département R.A.

Barré M., E. Goyard, P. Boudry, A. Gérard, Y. Naciri-Graven, (1997). Réflexion autour d'une valorisation en amélioration génétique : le cas des souches d'huîtres plates sélectionnées par l'IFREMER, Note de synthèse confidentielle diffusée au Comité de Direction du Département R.A.

Berthe F., (1997). Rapport de mission à l'écloserie d'Aqualma, Nosy-Be (Madagascar), 31 décembre au 16 janvier, 8 p.

Collet B., (1997). Etude des bases génétiques de la variabilité des caractères

physiologiques impliqués dans la croissance chez *Crassostrea gigas*. Rapport annuel de thèse deuxième année, 46 p..

Goyard E., Laboratoires Côtiers de l'IFREMER, (1997). REMORA : résultats de l'année 1996. Rapport annuel du Réseau de suivi de la croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises, 34 p.

Pajot R. , P. Trintignac & C. Lipart, (1997).. Démarche régionale pour une production contrôlée de naissains d'huître creuse. 53 p.

Renault T., R. M. Le Deuff, C. Lipart, B. Chollet & P. Haffner, (1997). Programme virus de type herpès - Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade - Mars 1996/Février 1997

Thèses et mémoires

Besnard-Cochennec N. (1997). La Bonamiose : caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes Sciences de la Vie et de la Terre : 173 p.

Mémoires d'étudiants

Almeida M. (1997). Diagnostic quantitatif de *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) chez les palourdes *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum*. Universidade do Algarve - UCTRA - 8000 Faro Portugal, 23 p.

Arzul I. (1997). Essais de transmission de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes - Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole. Mars-Juillet. 48 p.

Délandes H. (1997). Phylogénie moléculaire des huîtres du genre *Crassostrea*. Approche par les techniques de restriction enzymatique et de séquençage. Maîtrise de Biochimie. Université des Sciences de La Rochelle, 37 p.

Denoux M. (1997). Approche in vitro et in vivo des interactions hémocytes/parasite *Bonamia ostreae*, chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Certificat d'études supérieures option Culture cellulaire et microscopie électronique. Lycée Technique Saint-Louis, Bordeaux, 30 p.

Huvet A. (1997). Structuration génétique des populations de bivalves marins. Diplôme d'études approfondies de Biologie des populations, Génétique et Eco-Ethologie. Faculté des Sciences et Techniques de Tours, 16 p.

Huvet A. (1997). Différentiation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : apport des marqueurs microsatellites. Diplôme d' Etudes Approfondies de Biologie des Populations, Génétique et Eco-Ethologie. Faculté des Sciences et Techniques de Tours, 25 p.

Lapouyade P. (1997). Etude d'un milieu gelose semi-sélectif pour la recherche de *Vibrio parva* - tests de nouvelles méthodes diagnostiques dans le cadre du programme de recherche sur le syndrome 93. DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières. Université de Caen, 41 p.

Lhomme P.Y., 1997. Mise en place d'une structure de base de données adaptée aux programmes d'amélioration génétique en aquaculture. D.U.T. Informatique, I.U.T. de Limoges. 50 p.

Minguez X. (1997). Suivi de croissance d'une génération d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme "Genephys 1996-2000". Maîtrise "Biologie des Populations et des Ecosystèmes" - Année Universitaire

1996-1997. Université de Poitiers, 38 p.

Rodriguez D. (1997). Essais de caractérisation moléculaire des parasites du genre *Marteilia* (Phylum Paramyxea) à l'aide de l'ADNr. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie, Module Biologie des Protistes. Université Blaise Pascal Clermont I, 26 p.

Segretin A. (1997). Caractérisation de types hémocytaires dans l'hémolymphe de l'huître plate, *Ostrea edulis*, par classification robuste. Rapport de stage de 3ème année d'IUP Génie Informatique. Université de La Rochelle, 34 p.

Documents techniques, plaquettes, lettres aux médias...

Laboratoire GAP : lettre aux Médias n° 24 de juillet 1997 sur les activités du laboratoire GAP de La Tremblade.

Equipe pathologie (1997) : Diagnostic technique manual for the first workshop of National Reference Laboratories booklet (histology, transmission electron microscopy and PCR).

Berthe F., (1997) (Réd.) Bulletins d'information sur les mortalités anormales, (juillet, août et septembre) à l'usage de l'administration (DPM/CM) et des organisations professionnelles (CNC, SRC).

Berthe F., Mise à jour des informations dans le domaine de la pathologie sur le site Web : <http://www.ifremer.fr/gap/gap.htm>

Renault T., (1997). Note d'information sur les infections à virus de type herpes pour le Tribunal de Grande Instance de Saint-Nazaire - RG : 96 001 697.

Rapports intermédiaires de contrat ou de convention

Boudry P., Y. Naciri-Graven, M. Barré, B. Collet, F. Cornette, S. Heurtebise, C. Ledu, B. Chollet, P. Phelipot. & A. Gérard, (1997). Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souches - Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes. Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 96/RPC-R-65 "Génétique", 33 p.

Gérard A., P. Boudry & S. Bougrier (Coord. GENEPHYS), (1997). Genetic bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. First Progress Report 1st January-31st December 1996. Commission of the European Communities. Contract N°. FAIR 95-421, 128 p.

Gérard A. & al., (1997). Rapport URM 16 année 1996 - Unité de Recherche Marine n°16 - Contrat n° 96 566 400 - Développement et utilisation des marqueurs génétiques hypervariables chez les espèces marines, 41p.

Gérard A. & al., (1997). Rapport URM 16 année 1995-1996. Unité de Recherche Marine n°16. Contrat n°96 566 400 - Développement et utilisation des marqueurs génétiques hypervariables chez les espèces marines. Rapport de synthèse des deux premières années d'activité 1995-1996, 67 p.

Gérard A. & al., (1997). Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : Hybridation et conservation de souches. Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes : année 1996. Contrat Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 96 RPC-R-65 "Génétique", 25 p.

Renault T., F. Berthe, B. Chollet, N. Cochenec, P. Haffner, R. M. Le Deuff., C. Lipart & A. Thébault, (1997). Programme pathologie rapport scientifique 1996. Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998.

Convention 96/RPC-R-70 : 17 p.

Renault T., (1997). Rapport Intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation/Décision d'Aide à la Recherche n°95/07/01 - Février.

Renault T., (1997). Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation/Décision d'Aide à la Recherche n°95/07/01 - Août.

Vulgarisation

Gérard A. & Boudry P. : participation à différentes émissions de radio et de télévision, et à de nombreux articles de journaux (>30) dans le cadre des résultats obtenus sur la tri- et la tétraploïdisation.