



Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins
(LBEIM)

Rapport d'activité 1992
de
l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion
(URGE)
l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie
Générales
(URPIG)

R e c h e r c h e
A q u a c o l e

B.P. 133 - 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tél. : 46 36 30 07

Fax. : 46 36 18 47



Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins
(LBEIM)

Rapport d'activité 1992
de
l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion
(URGE)
l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie
Générales
(URPIG)

B.P. 133 - 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tél. : 46 36 30 07

Fax. : 46 36 18 47

AVANT-PROPOS

Le Laboratoire de Biologie et d' Ecologie des Invertébrés Marins, placé sous la responsabilité de Maurice HERAL, comportait au mois de décembre 1992 quatre Unités de Recherche :

- ◆ l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (**UREA**), sous la responsabilité de Maurice HERAL,
- ◆ l'Unité de Recherche Régionale Aquacole (**URRA**), sous la responsabilité d' Alain BODOY, et depuis septembre 1992 "par intérim", sous la co-responsabilité de Maurice HERAL et d'André GERARD,
- ◆ l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (**URGE**), sous la responsabilité d'André GERARD,
- ◆ l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (**URPIG**), sous la responsabilité de Tristan RENAULT. Cette Unité a été créée en octobre 1992 pour remplacer l'URPIGM qui a rejoint Montpellier dans le cadre d'une Unité mixte de recherche IFREMER/CNRS.

Ce rapport présente le bilan des activités de l'URGE et de l'URPIG.

Unité de Recherche en Génétique et Eclosionerie

SOMMAIRE

1. OBJECTIFS ET PROGRAMMES	5
1.1. Objectifs	5
1.2. Programmes	5
2. MOYENS ET EFFECTIFS	6
2.1. Infrastructures	6
2.2. Matériel	6
2.3. Personnel	7
2.4. Stagiaires	7
2.5. Budget	7
3. PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1992	8
3.1. Réseau génétique	8
3.2. Sélection	9
3.3. Polyploïdisation	10
3.4. Lignées pures	10
3.5. Marqueurs	10
3.6. Acclimatation	10
3.7. Zootechnie	11
4. FONCTIONNEMENT GENERAL DE L' UNITE	12
4.1. Astreintes	12
4.2. Assistance technique	12
4.3. Assistance scientifique	12
4.4. Formation reçue	12
4.5. Formation diplômante	12
4.6. Formation dispensée	12
4.7. Manifestations	12
4.8. Visites	13
4.9. Missions	13

4.10.	Participation congrès	13
4.11.	Rapports de stage	14
4.12.	Rapport de formation	14
4.13.	Rapport interne	14
4.14.	Congrès	14
4.15.	Publications	14
5.	PERSPECTIVES ET POINTS DE BLOCAGE	15
5.1.	Points de blocage	15
5.2.	Perspectives	15

1. OBJECTIFS ET PROGRAMMES

1.1. Objectifs

Les principaux objectifs de l'Unité, tels qu'ils ont été définis dans les "cahiers d'objectifs" de la DRV/RA, visent essentiellement à développer des programmes chez les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique, de l'acclimatation et de l'hybridation. Les objectifs affichés sont l'obtention de lignées ou de souches présentant des caractères de résistances aux maladies parasitaires et/ou de meilleures performances de croissance et de qualité de chair.

1.2. Programmes

Pour tenter de répondre à ces objectifs tout en tenant compte des moyens matériel et humain mis en œuvre, quatre programmes sont en cours de réalisation :

- Sélection de souches d'huître plate résistantes aux parasitoses,
- Polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial,
- Obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques,
- Acclimatation et hybridations interspécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

2. MOYENS ET EFFECTIFS

2.1. Infrastructures

L'URGE assure la gestion de l'outil éclosion de La Tremblade. Ce bâtiment de 1200 m², est principalement constitué de :

- 6 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Conservatoire de souches, Elevages larvaires, Physiologie),
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire et une salle informatique,
- 1 laboratoire de physiologie pour l'UREA,
- 7 annexes techniques (Local des pompes, Local du bromodoseur, Local compresseurs et commandes électriques, Chaufferie, Groupe électrogène, Garage, Atelier).

Il n'y a malheureusement pas de bureaux pour accueillir le personnel de l'Unité, qui est pour un temps encore indéfini, logé dans des Algécos à l'extérieur du bâtiment.

A cette gestion de bâtiment, il faut encore ajouter tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300 m³ en réserve d'eau de mer,
- 22 pompes de 10 à 300 m³/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation au brome des eaux de rejet.

2.2. Matériel

Le matériel scientifique principal est constitué de :

- 1 microscope BHTU Olympus,
- 1 microscope BHS Olympus asservi à l'analyseur d'images,
- 1 microscope BHS Olympus équipé en épifluorescence (matériel en commun avec l'URPIG),
- 1 stéréomicroscope SZH Olympus,
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers l'ordinateur,
- 1 analyseur d'images SAMBA™ 2005 d' Alcatel TITN ANSWARE avec un logiciel dédié à l'analyse de la ploïdie et , en cours d'acquisition, un logiciel dédié à l'analyse des gels d'électrophorèse,
- 5 micro-ordinateurs : DELL 486P/33, DELL 486P/25, DELL 320N+, Goupil G6 (secrétariat), Goupil G5,
- 1 centrifugeuse JOUAN CR 4-11,
- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton.

2.3. Personnel

L'effectif de l'Unité a été conforté au mois de mars 1992 par l'arrivée de Yamama NACIRI. Spécialiste en génétique quantitative, elle a achevé sa thèse à l' INRA sur la sélection du millet *Setaria italica* en janvier 1992. Son rôle à l' IFREMER sera de veiller au développement des recherches sur la sélection des mollusques (sur des critères de résistances aux maladies notamment).

L' équipe au 31 décembre 1992 était composée de :

personnel scientifique

• Responsable	:	André GERARD	IFREMER
• Cadre	:	Yamama NACIRI	GIE/RA
• Techniciens	:	Jean-Marie PEIGNON	IFREMER
		Christophe LEDU	GIE/RA
		Pascal PHELIPOT	GIE/RA

personnel administratif

• Secrétariat	:	Yvette SIMIAN (1/3 temps)	IFREMER
• Documentation	:	Yvonne FAVINO (1/4 temps)	IFREMER
• Comptabilité	:	Martine GRASSET (1/4 temps)	IFREMER
• Entretien	:	Ginette CAILLETEAU (1/2 temps)	IFREMER

Devant les charges techniques croissantes d'entretien de l'outil éclosion, le personnel de l' URGE a souffert toute l'année d'un manque de personnel logistique. Ce problème devrait être en partie résolu en janvier 1993 par l'embauche d'un technicien logistique dans le cadre d' un Contrat de Retour à l' Emploi.

2.4. Stagiaires

Florent LYS : stage du 2 mars 1992 au 31 mars 1992, sur les techniques de production de naissain en éclosion,

Jean DESILET (CANADA) : stage du 22 mars 1992 au 13 avril 1992, sur les techniques de polyploïdisation appliquées aux mollusques bivalves,

Isabelle PEUDENIER (INTECHMER Cherbourg) : stage du 13 avril 1992 au 13 août 1992, sur les essais d'obtention de lignées pures de mollusques bivalves par gynogenèse,

Karine HOUDUSSE (BTS de Biotechnologie Gif / Yvette) : stage du 1er juin 1992 au 30 juin 1992, sur la polyploïdisation chez les mollusques bivalves,

Claire CORNILLER (INA Paris-Grignon) : stage sur l'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves.

2.5. Budget

(en KF)	Subvention d' Etat	Recettes affectées	Total
Equipement	20	335 ♣	355
Fonctionnement	155		155
TOTAL	175	355	510

♣ Recettes :	contrat Etat-Région Poitou-Charentes	200 KF
	contrat Etat-Région Bretagne	75 KF
	Conseil Général Charente-Maritime	60 KF

3. PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1992

3.1. Réseau génétique

La mise en place de ce réseau a été une des principales activités de l'URGE en 1991 et 1992, le but étant de créer un tissu de laboratoires pluridisciplinaires pour répondre correctement aux objectifs annoncés dans les cahiers d'objectifs.

Au niveau national, ce réseau est organisé autour de deux cellules:

- une cellule de base comprenant l'écloserie de La Tremblade, la nurserie de Bouin, et les claires expérimentales de Bouin et de La Tremblade (URGE et URRRA). Cette cellule assure l'élaboration des principaux plans d'expériences, la production de toutes les souches ou lignées, et le contrôle des performances biologiques dans des conditions de milieu d'élevage et de traitements zootechniques aussi homogènes que possible,
- une cellule plus spécialisée dans le contrôle des performances biologiques incluant la participation de tous les laboratoires régionaux pour tester la variabilité des performances en fonction des conditions de milieu, et de laboratoires d'IFREMER, du CNRS ou d'Universités pour des études précises en physiologie, histologie de la reproduction, immunologie...

Trois réunions ont été organisées pendant l'année 1992 avec les partenaires IFREMER du réseau, afin de définir les programmes, de recenser les besoins en matériel et en personnel dans les différentes stations, de préciser les protocoles, et d'établir les premiers bilans.

Au niveau international et suite à la mission de Y. NACIRI à Bangor, au congrès "Genetics and Evolution of Aquatic Organisms", J. HILBISH (University of South Carolina) et S. ALLEN (Institute of Marine and Coastal Science) nous ont proposé d'organiser, à La Tremblade, un workshop sur la génétique quantitative chez les mollusques bivalves. Ce workshop serait financé pour la part américaine par le National Science Foundation (NSF), un financement est recherché pour la partie française.

Composition du réseau :

Collaborations internes IFREMER

- Laboratoire de Port-en-Bessin
- Laboratoire PMDC de Brest
- Laboratoire de La Trinité/mer
- Laboratoire Diversification Conchylicole de Nante
- Station de Bouin
- Unité de Recherche Régionale Aquacole de La Tremblade (URRA)
- Unité de Recherche en Pathologie Générale de La Tremblade (URPG)
- Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles de La Tremblade (UREA)
- Laboratoire de Palavas
- Unité mixte CNRS-IFREMER de Montpellier
- Unité mixte CNRS-IFREMER du CREMA de La Rochelle (UMR 10)

Coopérations nationales

- Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA) de l'île d'Oléron
- Université de Bretagne Occidentale (UBO) : Laboratoire de Zoologie : M. LE PENNEC (URA CNRS D1513)
- Université de Caen : Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marine : M.MATHIEU
- Université de Poitiers : Laboratoire de Biologie Marine Phytoplancton : D.NEUVILLE
- Université de Montpellier II : Laboratoire de F. BONHOMME

Coopérations internationales

- Plymouth Marine Laboratory (G.B.) : B.L. BAYNE et A.J.S. HAWKINS
- Université de Crète (Grèce) : Laboratoire de E. ZOUROS
- Centre Océanographique de Rimousky (Canada) : F. DUBE
- Institute of Marine and Coastal Science (USA) : S. ALLEN
- Université de Grenade (Espagne) : R. LOZANO
- University of South Carolina (USA) : J. HILBISH
- University of Delaware (USA) : P. GAFFNEY

Soutiens et conseils scientifiques

- INRA Laboratoire de Physiologie des Poissons : D. CHOURROUT
- INRA Laboratoire d'Hydrobiologie : B. JALABERT
- INRA-CNRS-Université Paris-Sud : Ferme du Moulon : A.GALLAIS
- Ecole Normale Supérieure de Lyon : Laboratoire de P. GUERRIER

3.2. Sélection

Le programme de sélection de souches d'*Ostrea edulis* résistantes à la bonamiose a été intensifié en 1992 afin de réduire la durée du cycle d'élevage entre deux générations tout en maintenant une pression de sélection suffisante. Deux actions principales ont été engagées:

- l'inoculation d'une partie de la deuxième génération de la lignée 1985 afin de préparer des géniteurs pour produire une troisième génération en 1993, et, de vérifier dans un dispositif expérimental de la salle de quarantaine leur sensibilité au parasite. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec les pathologistes de l'URPIG et de La Trinité.
- la production en éclosérie d'une deuxième génération de la lignée 1989 et de trois témoins: un témoin éclosérie, un témoin de Quiberon et un témoin de Palavas. Après un passage pendant une courte période à la nouvelle nurserie de Bouin, ces différents lots ont été transférés à La Trinité/mer pour un élevage en eau profonde dans la baie de Quiberon.

Suite au recrutement de Yamama NACIRI, ce programme sera remodelé en 1993, en y appliquant une méthodologie plus rigoureuse et ce qui devrait permettre une valorisation plus poussée des données obtenues.

3.3. Polyploïdisation

Dans le cadre du programme d'obtention de produits conchylicoles performants par polyploïdisation, plusieurs actions fondamentales ont été réalisées en 1992:

- Poursuite de la mise au point d'une nouvelle technique de polyploïdisation basée sur l'utilisation du 6-DMAP (6-diéthylaminopurine). Cette molécule présente de nombreux avantages par rapport à la Cytochalasine B: elle se dissout directement dans l'eau de mer, son effet est parfaitement réversible et ne nécessite pas l'emploi d'un solvant comme le DMSO, elle ne fait pas partie des produits hautement toxiques, et, elle est plus économique.
- Amélioration et extension de la technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique à toutes les phases de la vie du mollusque: analyses sur des populations cellulaires pour les phases embryonnaires, larvaires et post-larvaires, analyses individuelles sur le naissain et les adultes avec possibilité de tri par biopsie sur ces derniers.
- Poursuite de la mise au point de la technique d'induction de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*, la palourde indigène. Les résultats sont désormais très satisfaisants au niveau des taux de triploïdie obtenus (80 à 90%), mais la survie du naissain qui reste toujours aléatoire chez cette espèce, ne nous permet pas pour l'instant, de mettre en place un contrôle des performances dans le milieu naturel.
- Poursuite des opérations de contrôle des performances dans le milieu naturel des populations diploïdes et triploïdes obtenues en 1990 et 1991. Ces actions sont réalisées en collaboration avec les laboratoires Régionaux : de Port-en-Bessin et de La Tremblade pour *Crassostrea gigas*, de La Trinité/mer et de La Tremblade pour *Ruditapes philippinarum*, de La Trinité/mer et de Palavas pour *Ostrea edulis*. Les études histologiques de la gamétogenèse sont effectuées par l'Université de Bretagne Occidentale.
- Une étude des caractéristiques physiologiques de populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* triées après biopsie et analyse d'image, a été entreprise par l'UREA.

3.4. Lignées pures

Les premiers essais d'obtention de lignées gynogénétiques chez *Crassostrea gigas* ont été effectués. L'induction de la gynogenèse est obtenue par irradiation du sperme, pseudo-fécondation par ce sperme inactivé et rétablissement de la ploïdie par induction chimique au 6-DMAP. A partir d'un même lot d'ovules, des populations haploïdes, diploïdes, diploïdes gynogénétiques, triploïdes ont été produites. Les larves gynogénétiques n'ont survécu que 7 jours sans, semble-t-il, pouvoir s'alimenter.

3.5. Marqueurs

La recherche du déterminisme génétique du polymorphisme de la pigmentation chez *Ruditapes philippinarum* s'est poursuivie en 1992 par la production de croisements frères-sœurs et par l'analyse de la ségrégation des caractères dans la descendance. Le déterminisme mendélien de certains phénotypes a été démontré.

3.6. Acclimatation

Un programme d'acclimatation de *Crassostrea virginica* et d'essais d'hybridation avec *Crassostrea gigas* a débuté en 1992 par l'importation d'une souche de *virginica* déjà introduite dans les eaux communautaires (Grande Bretagne). Les 50 géniteurs importés ont été placés dans la salle de quarantaine de l'écloserie selon les normes du CIEM, la première descendance est actuellement en prégrossissement dans la nurserie de Bouin. En 1993, après un contrôle pathologique effectué par

l' URPIG, elle sera prise en charge par l'URRA pour réaliser un contrôle des performances dans le milieu naturel. Les premiers essais d'hybridation avec *gigas* ont fourni dans un premier temps des individus viables mais leur nature hybride devra être vérifiée par électrophorèse. Les données bibliographiques laissent plutôt supposer que ce type de croisement ne fournit pas de larves viables. C'est d'ailleurs ce que nous avons obtenu lors d'un deuxième essai réalisé par stripping pour éviter toute fécondation non contrôlée, pour lequel les larves ne se sont pas développées plus loin que le stade D.

3.7. Zootechnie

Le développement des recherches en génétique doit obligatoirement s'accompagner d'une amélioration des technologies et zootechnies de production.

Au niveau logistique : l'effort de modernisation de l'écloserie engagé en 1991, s'est poursuivi en 1992, afin d'adapter au mieux cet outil aux exigences des recherches dans le domaine de la génétique. Pour accélérer les travaux, et devant le peu de crédits alloués en début d'année pour la station, environ 20% de notre budget investissement laboratoire ont été consacrés à des opérations de logistique :

- constructions d'une paillasse et d'une cloison en salle d'élevage larvaire,
- aménagement d'une laverie en lieu et place de l'ancienne salle du bromodoseur,
- construction d'une plate-forme en béton dans l'ancienne serre pour aménager le conservatoire de souches qui sera composé à partir de 1993 de 25 bacs de 1 m³,
- thermorégulation de l'eau de mer alimentant le conservatoire de souches,
- remplacement d'un des compresseurs d'air alimentant le bâtiment.

Au niveau zootechnie : les tests visant à améliorer l'alimentation des larves de *Crassostrea gigas*, à partir de souches de phytoplancton isolées dans le bassin Marennes-Oléron par le laboratoire de Biologie Marine Phytoplancton de l'Université de Poitiers, se sont poursuivis toute l'année.

Au niveau phytotechnie : en 1991, nous avons mis au point une technique très empirique basée sur des apports d'engrais agricoles pour induire des blooms de *Skeletonema costatum* dans nos bassins de 300 m³. En 1992, une étude a été menée en étroite collaboration avec le CREMA de L'Houmeau, pour essayer d'affiner les amendements en fonction des saisons et d'établir, en conséquence, un mode de gestion des bassins . Les premiers résultats de cette étude seront consignés dans un rapport interne de la DRV au premier trimestre 1993.

4. FONCTIONNEMENT GENERAL DE L' UNITE

4.1. Astreintes

Le fonctionnement de l'écloserie nécessite une présence quotidienne. Le personnel scientifique de l' URGE s'est ainsi partagé 116 demi-journées d'astreinte durant les week-ends et les jours fériés en 1992.

4.2. Assistance technique

- Fournitures de souches de phytoplancton à des écloseries locales.
- Production de phytoplancton pour les expériences menées par l' Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA) dans le cadre d'un programme CEE (modèle de production benthique mollusques).
- Fourniture de larves au Laboratoire de Biologie Marine de l'IUT de La Rochelle.
- Maturation de géniteurs de *Ruditapes philippinarum* pour l' Ecole Normale Supérieure de Lyon (laboratoire de P. GUERRIER).
- Aide logistique aux expériences menées par la DEL, par l'URPIGM, par l'URPIG, et par l'UREA.

4.3. Assistance scientifique

A. GERARD : membre du conseil scientifique du Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA) qui est un centre technique régional, interface entre la recherche et les entreprises, financé par le Conseil Régional de Poitou-Charentes.

4.4. Formation reçue

Y. NACIRI et A. GERARD : stage d'une semaine au laboratoire de Mathématique Statistique Informatique de l' ENITIAA à Nantes sur la méthodologie des plans expérimentaux.

J.M. PEIGNON : stage de lecture rapide.

P. PHELIPOT et G. CAILLETEAU : stage de secourisme.

4.5. Formation diplômante

J.M. PEIGNON : première année de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

4.6. Formation dispensée

A. GERARD : cours aux DEA de Brest et de Rennes option "Biologie Aquacole" et aux étudiants de l' Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

A. GERARD : participation au jury de l'examen du B.T.S.A. option Productions Aquacoles.

4.7. Manifestations

Journée Portes Ouvertes, le 25 avril 1992 et participation au salon ostréicole de La Tremblade.

J.M. PEIGNON : Présentation du contrôle de la ploïdie par imagerie numérique au stand IFREMER du salon "Bordeaux Aquaculture" les 25, 26 et 27 mars 1992.

4.8. Visites

Outre les visites d'étudiants et de professeurs, d'écluseurs professionnels, d'ostréiculteurs, l'URGE a reçu la visite de :

27 janvier 1992 : I. TRANDAFIRESCU (Roumanie) du Romanian Marine Research Institute.

3 février 1992 : étudiants des DEA option "Biologie Aquacole" de Brest et de Rennes, et de l'ENSA de Rennes.

26 février 1992 : délégation de la Région Andalousie constituée de :

M. Francisco ALBA : Directeur Général de la Pêche et de l'Aquaculture,

M. Francisco NIETO : Directeur Général de la recherche et du développement pour la pêche, l'aquaculture et l'agroalimentaire,

M. Lopes COSTELLO : Directeur de PEMARES,

M. Carlos MANZANO : Chef de la section scientifique de PEMARES,

Mlle Paz SANCHEZ : Conseillère technique de PEMARES.

17 mars 1992 : Ecole vétérinaire de Nantes.

Mai 1992 : visite du Professeur C. PETZELT du Laboratoire International de Biologie Cellulaire Marine (Ile d'Yeu).

20 juin 1992 : visite d'une délégation de professionnels organisée par le MEDRAP.

25 et 26 juin 1992 : visite de Z. MASSOUD et C. BAILLY. Présentation des programmes et entretiens constructifs.

20 novembre 1992 : visite d' A. BOGHEN de l' Université de Moncton, Nouveau-Brunswick (Canada).

4.9. Missions

A. GERARD : mission en ANDALOUSIE avec le Vice Président de la région Poitou-Charentes et une délégation du groupe aquaculture de l'Arc Atlantique. Réunion en présence du Ministre Régional de l' Agriculture et de la Pêche d'Andalousie pour mettre en place le projet de coopération inter-régionale dans le domaine des pêches et de l'aquaculture.

A. GERARD et Y. NACIRI : mission à Plymouth pour discuter de la programmation des travaux devant être menés dans le cadre du programme CEE - AIR "*Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in commercially important shellfish*" qui débute en janvier 1993.

4.10. Participation congrès

A. GERARD : Bordeaux Aquaculture mars 1992. Présentation, en collaboration avec La Trinité / Mer, des premiers résultats obtenus sur le programme sélection huître plate (Présentation orale effectuée par A.G. MARTIN).

Y. NACIRI : Bangor (Pays de Galles) "Genetics and Evolution of Aquatic Organisms". Au cours de ce congrès, de nombreux et fructueux contacts ont été pris avec les principaux responsables des laboratoires travaillant sur la génétique des mollusques : S. K. ALLEN (USA), P. GAFFNEY (USA), J. HILBISH (USA), A. KOMARU (Japon), A. BEAUMONT (UK), F. BONHOMME (France), E. GOSLING (Irlande), E. ZOUROS (Grèce), N. WILKINS (Irlande)...

4.11. Rapports de stage

PEUDENIER I., 1992. Essais d'obtention de lignées pures de mollusques par gynogenèse. Institut National des Techniques de la Mer. Soutenance en Septembre 1992.

HOUDUSSE K., 1992. Polypléidisation chez les mollusques bivalves. Juin 1992.

CORNILLIER C., 1992. Etude de l'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves.

4.12. Rapport de formation

J.M. PEIGNON, 1992. Analyse du déterminisme de la coloration et de l'ornementation chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Rapport de première année de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

4.13. Rapport interne

GERARD A., PEIGNON J.M., LEDU C., PHELIPOT P., NOIRET C., BODOY A., HEURTEBISE S. & GARNIER J. 1992. Obtention de souches conchylicoles performantes par polypléidisation (3ème partie). Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. RIDRV - 92-11 - RA/La Tremblade.

4.14. Congrès

MARTIN A.G., GERARD A., COCHENNEC N. & LANGLADE A., 1992. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostrea* : assessment of the resistance of a first selected generation. Bordeaux Aquaculture, Mars 1992.

4.15. Publications

GERARD A., NACIRI Y., PEIGNON J.M., LEDU C., PHELIPOT P., NOIRET C., PEUDENIER I. & GRIZEL H. (acceptée le 9-12-92 sous référence MS 92-075). Detection of the ploidy level at different ages for commercial bivalves by image analysis. *Aquaculture and Fisheries Management*.

GERARD A., NACIRI Y., PEIGNON J.M., LEDU C. & PHELIPOT P. (acceptée le 26-12-92 sous référence MS 92-079). Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture and Fisheries Management*.

DITER A. & LEDU C. (soumise en Septembre 92). Induced haploid, diploid and tetraploid gynogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

DESROSIERS R.R., GERARD A., PEIGNON J.M., NACIRI Y., DUFRESNE L., MORASSE J., LEDU C., PHELIPOT P., GUERRIER P & DUBE F. (soumise le 30-08-92). A novel method to produce triploid embryos in bivalve molluscs by the use of 6-DMAP. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

GERARD A., NACIRI Y., NOIRET C., LEDU C., PEIGNON J.M. & PHELIPOT P. (soumise le 25-11-92, référence MS DG 92-086). Induced triploidy in the European clam *Ruditapes decussatus* (L.) and performance of triploid larvae. *Aquaculture*.

NACIRI Y. & GALLAIS A. (soumise décembre 92). Predicting mean and variance of all possible lines and hybrides from designs with partially inbred progenies. *Theoretical and Applied Genetics*.

5. PERSPECTIVES ET POINTS DE BLOCAGE

5.1. Points de blocage

Les principaux points de blocage évoqués l'an dernier, ont pu être levés en cours de l'année ou sont en voie de l'être :

- embauche de Y. NACIRI pour le poste de génétique quantitative,
- embauche de M. NOURRY pour le poste de technicien à la nurserie de Bouin,
- embauche de E. PLANCHE pour le poste de technicien logistique rattaché à la station de La Tremblade à partir du 1er janvier 1993,
- refonte de la nurserie de Bouin,
- construction des claires expérimentales de La Tremblade.

Toutefois de nouvelles difficultés sont apparues pour le réseau génétique en cours d'année, dont la principale est sans conteste le départ d'A. BODOY à Nantes. L'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA) dont il avait la direction et qui est un maillon essentiel du réseau, se retrouve sans responsable (sauf "par interim") depuis le mois de septembre 1992 et sans cadre sur le site de La Tremblade. Son remplacement est de toute première urgence si l'on ne veut pas désorganiser totalement le réseau et mettre à mal les engagements régionaux ou communautaires.

5.2. Perspectives

En 1993, les principaux axes de recherche consignés dans les cahiers d'objectifs, seront développés. Sont prévus notamment :

- la refonte du programme de sélection de souches d'huître plate, refonte basée sur une méthodologie génétique plus rigoureuse qui conserve néanmoins les acquis biologiques (souches sélectionnées depuis 1985),

- la poursuite du programme Etat-Région de polyploïdisation : des contrôles de performances des populations diploïdes et triploïdes seront effectués dans différents centres ostréicoles français et de nouveaux essais de tétraploïdisation seront menés,

- le démarrage du nouveau programme de cytogénétique réalisé dans le cadre du contrat CEE AIR 1 dont l'objectif principal est de vérifier si une relation existe entre les performances biologiques et l'hétérozygotie chez des triploïdes induits par rétention du premier ou du deuxième globule polaire,

- la poursuite des essais d'obtention de lignées pures par gynogenèse et des recherches sur les marqueurs génétiques,

- la poursuite des essais d'acclimatation et d'hybridations interspécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea* par le contrôle des performances dans le milieu naturel des *virginica* et par l'importation d'une nouvelle espèce,

- l'amélioration des technologies et zootechnies d'écloserie.

Parallèlement dans le cadre des relations internationales, nous essaierons de répondre favorablement à la demande américaine d'organisation d'un workshop en génétique quantitative en 1994, en recherchant pour la partie européenne le financement nécessaire à une telle organisation.

**Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie
Générales**

SOMMAIRE

1 - PERSONNEL	18
2 - THESARDS	18
3 - STAGIAIRES	18
4 - PRINCIPAUX RESULTATS	
4.1. Etude des cas de mortalités anormales en bassins ostréicoles et écloséries	19
4.2. Pathologie expérimentale	20
4.3. Etude des mécanismes de défense de l'huître plate dans le modèle particulier de la bonamiose	20
4.4. Travaux concernant le Lymphocystis Disease Virus (LDV)	21
4.5. Réalisation d'une collection de lignées cellulaires	21
5 - PUBLICATIONS	
5.1. Communications à des colloques	22
5.2. Rapports internes	22
6 - ENSEIGNEMENTS	22
7 - FORMATIONS	22
8 - MANIFESTATIONS ET VISITES	23

PERSONNEL : SCIENTIFIQUES :

Tristan RENAULT (responsable unité), janvier 1992.

Nathalie COCHENNEC, août 1992.

Ginette CAILLETEAU (1/2 temps).

ADMINISTRATIFS :

Yvette SIMIAN, secrétariat, (1/3 temps).

Martine GRASSET, comptabilité, (1/4 temps).

Yvonne FAVINO, documentaliste, (1/2 temps).

2 - THESARDS :

Rose Marie LE DEUFF, bourse IFREMER, Université de Bordeaux (thèse 1995).

3 - STAGIAIRES :

Cyrille HUBERT, stage de maîtrise de Biologie des Organismes et Populations, Université de Rennes I.

Philippe AUDIOT, stage formation complémentaire post BTS, Lycée Technique St-Louis, Bordeaux.

4 - PRINCIPAUX RESULTATS ANNEE 1992.

Remarques préliminaires.

Il est à noter que l'URPIG du laboratoire de la La Tremblade a été créée en octobre 1992. Cependant, nous ferons un bilan synthétique des résultats obtenus depuis le début de l'année 1992, puisqu'une personne (T. RENAULT) y travaille depuis janvier et qu'une autre personne (N. COCHENNEC) a intégré cette unité en août.

Par ailleurs, une partie du temps de travail des membres de cette unité a été utilisée à gérer le départ du DRIM sur Montpellier (partage du matériel disponible à Ronce les Bains, tri des réactifs-diagnostic et du fond de bibliothèque existants au laboratoire).

4.1. Etude des cas de mortalités anormales survenues en bassins ostréicoles et écloséries.

L'étude des cas de mortalités anormales survenues dans différents bassins ostréicoles et en écloséries a constitué un volet non négligeable du travail de l'URPIG au cours de l'année 1992. Ce programme, difficilement quantifiable à l'avance, a été souvent réalisé au détriment d'autres programmes, étant donné les effectifs réduits en personnel de l'unité. Cependant, la nécessité de ce type de travail n'est plus à démontrer et chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la recherche d'une étiologie infectieuse lors d'épisodes de mortalités inexplicables revêt une importance toute particulière, étant donné l'absence, en France, d'agents pathogènes identifiés chez cette espèce et son quasi monoélevage.

* Mortalités massives d'huîtres creuses, *C. gigas*, en juin 1992 sur le banc de Ronce les Bains.

Les analyses effectuées par l'URPIG, en histologie et en microscopie électronique, suite à d'importantes mortalités d'huîtres creuses, *C. gigas*, survenues sur le banc de Ronce les Bains, ont permis d'éliminer l'intervention d'un agent pathogène dans ce phénomène. Il est à noter que l'intervention de l'URPIG s'est déroulée dans le cadre d'une procédure de dépôt de plainte contre X et que le travail de diagnostic réalisé alors avait valeur d'expertise auprès du Procureur de la République.

* Mortalités de larves d'huître creuse, *C. gigas*, en éclosérie.

Suite à des épisodes répétés de mortalité survenant en élevage larvaire d'huître creuse, *C. gigas*, l'éclosérie privée SAPROMER a fait parvenir régulièrement des échantillons (pour chaque ponte) à l'URPIG, à partir de juin 1992.

Les analyses réalisées (histologie et microscopie électronique) ont permis de déceler des lésions au niveau du velum des larves, associées à la présence de particules virales, en position intranucléaire, intracytoplasmique et extracellulaire. Les cellules virosées (fibroblastes) présentent un noyau hypertrophié à nucléoplasme dense et un cytoplasme réduit à une frange périnucléaire.

Les formes virales intranucléaires, ovoïdes au polygonales, possèdent un diamètre moyen de 70nm. Certaines particules sont vides et correspondent à des capsides, d'autres contiennent un nucléoïde dense aux électrons, arrondi ou toroïdal et sont assimilables à des nucléocapsides. Les capsides avec ou sans nucléoïde sont irrégulièrement disséminées dans le nucléoplasme. Les particules intracytoplasmiques et extracellulaires, arrondies, d'un diamètre moyen de 95nm, montrent une enveloppe formée par une membrane unitaire trilamellaire. Elles contiennent des éléments identiques pour la forme et la taille à ceux observés dans le noyau des cellules (nucléocapsides).

Bien que la nature virale exacte des particules observées ne puisse pas être déterminée avec certitude sans caractérisation biochimique et physique, les caractères morphologiques de ces particules (nucléocapside ovoïde ou hexagonal, présence d'une enveloppe), leur taille et leurs localisations dans les cellules (noyau et cytoplasme) suggèrent qu'elles sont probablement très proches des Herpesviridae.

Par ailleurs, en collaboration avec J-L NICOLAS (IFREMER, Brest), il a été possible de reproduire expérimentalement des mortalités sur larves axéniques, par inoculation dans les récipients d'élevage de broyat ultrafiltré d'animaux virosés (frais ou congelés à -20°C) provenant de l'écloserie SAPROMER et de retrouver des particules virales identiques (Herpes-like) sur les larves axéniques mortes. Ces résultats laissent suspecter que le virus détecté peut être considéré comme un nouvel agent pathogène capable d'induire d'importantes mortalités chez les larves d'huître creuse, *C. gigas*.

Des essais de reproduction de ce virus (recherche d'un effet cytopathogène) ont été entrepris sur lignées cellulaires de poissons, dans le but de se dispenser de la production de larves virosées pour poursuivre l'étude de ce pathogène.

4.2. Pathologie expérimentale.

* Participation au programme de l'URGE concernant la sélection des populations d'huître plate, *Ostrea edulis*, résistantes au parasite, *Bonamia ostreae* en assurant la purification et l'inoculation du parasite aux animaux (pression de sélection expérimentale), le suivi des mortalités et le contrôle histologique des huîtres mortes en cours d'expérimentation, enfin le sacrifice de l'ensemble des individus survivants avec prélèvements pour analyser les taux d'infestation parasitaire en fin de manipulation.

* Rôle éventuel de l'huître creuse, *C. gigas*, comme porteur sain du parasite *B. ostreae*.

Des travaux de pathologie expérimentale ont été également menés en vue de confirmer l'impossibilité de reproduire, *in vivo*, au laboratoire par inoculation, la bonamiose chez l'huître creuse, *C. gigas*, et de transmettre ce parasite à des huîtres plates, par l'intermédiaire d'huîtres creuses inoculées. De nombreuses données épidémiologiques (*B. ostreae* jamais observé chez l'huître creuse, *C. gigas*, dans le milieu) ainsi que les résultats obtenus au cours de cette expérience laissent présumer une absence de portage sain de l'huître creuse *C. gigas*, pour le parasite, *B. ostreae*.

Par ailleurs, ce travail en complément de données épidémiologiques existantes a permis de ne pas intégrer l'huître creuse, *C. gigas*, à la liste des couples hôte-pathogène à contrôle obligatoire, dans le cadre des nouvelles directives communautaires régissant les échanges de coquillages entre les pays membres de la CEE.

4.3. Etude des mécanismes de défense de l'huître plate, *O. edulis*, dans le modèle particulier de la bonamiose.

Il était nécessaire de réaliser certains travaux préliminaires, en particulier, concernant le parasite, *B. ostreae*, avant d'entreprendre l'étude proprement dite des mécanismes cellulaires de défense, mis en jeu par l'huître plate, *O. edulis*, vis à vis de ce protozoaire.

Pour cela, des quantifications des protéines parasitaires par la technique de Lowry, ont été tout d'abord réalisées, puis la caractérisation électrophorétique des protéines constitutives majeures du parasite, la recherche de glycoprotéines membranaires ainsi que la définition par la technique de Western blotting, de la spécificité des anticorps monoclonaux anti-parasite, disponibles au laboratoire ont été entreprises.

4.4. Travaux concernant le Lymphocystis Disease Virus (LDV).

Des épisodes de mortalités chez plusieurs espèces d'huîtres ont été associés à la mise en évidence de virus appartenant à la famille des Iridoviridae. Des virus de ce type ont pu montrer une pathogénicité très développée : c'est en effet, le cas pour les virus observés chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* et responsables de la quasi totale disparition de cette espèce, en France, dans les années 70. Dans ce cadre, l'importance du diagnostic et des travaux concernant ces agents pathogènes n'est plus à démontrer. Cependant, nous ne disposons pas actuellement de souche virale spécifique d'huître. Il a donc été choisi de préparer des anticorps et des sondes nucléiques à partir d'un virus de poisson, le Lymphocystis Disease virus (LDV), proche d'un point de vue ultrastructural de ceux décrits chez les mollusques, afin de posséder au laboratoire des outils de diagnostic.

Des profils électrophorétiques en SDS-PAGE ont été réalisés à partir d'extraits protéiques provenant de différents isolats de LDV. Ces échantillons sont, soit des kystes de poissons (dorade et flet), soit des cellules BF₂ en culture, saines et virosées (virus isolé de perche en 1962).

Afin de mieux caractériser les anticorps monoclonaux (préparés par immunisation de souris avec des cellules BF₂ virosées) et les protéines qu'ils reconnaissent, des analyses en Western blotting et en Ouchertloony ont été conduites avec des extraits protéiques de kystes de dorade. Ce travail a été poursuivi par la purification de ce virus en quantité importante à partir de dorades virosées, ce qui permettra de confirmer les résultats obtenus avec les anticorps monoclonaux. D'autre part, pour ce même virus de dorade (kystes), la recherche de glycoprotéines a été réalisée à l'aide de lectines couplées à la peroxydase. Quelques glycoprotéines ont ainsi pu être identifiées. Ces résultats doivent cependant être confirmés à partir d'échantillons de virus purifié.

Le travail de PCR initié en 90 et 91 a pu être poursuivi par le clonage et le séquençage des fragments amplifiés grâce à la collaboration de Claude DELSERT (DRIM, Montpellier).

4.5. Réalisation d'une collection de lignées cellulaires.

La réalisation d'une collection de lignées cellulaires a été entreprise. Ainsi, nous disposons actuellement de six lignées cellulaires de poissons (BF₂, EPC, CHSE, RTG₂, BB et SBL) et de six lignées cellulaires d'insectes (trois lignées de moustiques, deux lignées issues du genre *Spodoptera* et une de l'espèce *Galleria mellonella*). Ces cellules ont été produites en quantité suffisante pour être ensuite congelées dans l'azote liquide et permettre leur remise en culture à tout moment.

La réalisation de cette collection de lignées cellulaires a pour but de pouvoir diagnostiquer les pathologies virales chez les mollusques, par la recherche d'effets cytopathogènes sur cellules.

5 - PUBLICATIONS :

5.1. Communications à des colloques.

BACHERE E., RENAULT T. and MIALHE E., 1992. Research strategy in marine mollusc protozoology. Congrès Européen des Protistologistes de Langue Française. XXXIème Réunion Annuelle - Nedde le Château, 25-27 mai.

RENAULT T., THOUARD E. et WEPPE M., 1992. Mortalités massives en élevage larvaire de *Lates calcarifer* (mise en évidence d'un virus neurotrope). Comptes rendus du projet de recherche 1990-1992, pages 87-128. Groupement de Coopération Scientifique sur les Bases Biologiques de l'Aquaculture. Groupe de travail "Aquaculture Tropicale" - Montpellier, 10 septembre

RENAULT T. La biologie moléculaire et ses applications au diagnostic des pathologies des mollusques bivalves marins. Réunion du Réseau Microbiologie IFREMER - Brest, 18 novembre 1992.

LE DEUFF R.M. Diagnostic des virus responsables de pathologie chez les mollusques bivalves marins. Réunion du Réseau Microbiologie IFREMER - Brest, 18 novembre 1992.

5.2. Rapports internes.

T. RENAULT, N. COCHENNEC et H. GRIZEL, 1992. Rapport d'expériences d'infections expérimentales : *Crassostrea gigas* est-elle porteur sain pour *Bonamia ostreae* ?

T. RENAULT, E. THOUARD et M. WEPPE, 1992. Mortalités massives en élevage larvaire de *Lates calcarifer* (mise en évidence d'un virus neurotope). RIDRV-92-020-RA/COP TAHITI.

6 - ENSEIGNEMENTS :

T. RENAULT : Présentation des pathologies des mollusques bivalves marins à des vétérinaires inspecteurs et techniciens des Services vétérinaires au centre IFREMER de Nantes, 19 mai 1992.

T. RENAULT : Pathologies des mollusques bivalves marins - BTSA productions aquacoles. Lycée Agricole et Aquacole de Quimper Brehoulou. Fouesnant. 15 juin 1992.

7 - FORMATION :

N. COCHENNEC : Techniques histo-cytologiques et histo-cytochimiques, Université P. et M. CURIE - Paris VI, 1 semaine, janvier 1992.

N. COCHENNEC : Immunocytochimie appliquée à la microscopie photonique et électronique, Université Louis PASTEUR, 4 jours, juin 1992.

T. RENAULT : Instruction sur microscope électronique JEM 1200 Ex. Société JEOL, 2 jours, avril 1992.

T. RENAULT : Formation aux techniques de traitements des échantillons pour la microscopie électronique, INRA, Jouy en Josas, Unité de Virologie et Immunologie moléculaires, 8 jours, mai 1992.

R-M. LE DEUFF et T. RENAULT : Formation à l'élevage de larves d'huîtres axéniques, IFREMER Brest (J-L. NICOLAS), 2 jours,

R-M. LE DEUFF : Formation à la technique de séquençage de l'ADN, Laboratoire de Virologie et Microbiologie, Institut de Biologie, Montpellier, 8 jours, novembre 1992.

8 - MANIFESTATIONS ET VISITES

Journées portes ouvertes de la station IFREMER de La Tremblade.

Visite du responsable de la section régionale ostréicole avec quatre ostréiculteurs, en juin 1992 (mortalité de Ronce les Bains).