



FICHES "PROGRAMME"

par laboratoire

MORtalités ESTivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

2004

S O M M A I R E

| | |
|---|------------|
| Présentation..... | 3 |
| Tableau récapitulatif des actions 2004..... | 4 |
| <i>Thème Génétique</i> | <i>8</i> |
| Ifremer - DRV/RA/LGP - La Tremblade..... | 9 |
| SYSAAF - Rennes | 18 |
| <i>Thème Physiologie</i> | <i>21</i> |
| Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M - Argenton et Brest | 22 |
| Université de Caen - LBBM | 48 |
| MNHN - Muséum National d'Histoire Naturelle - Concarneau..... | 58 |
| <i>Thème Immunologie</i> | <i>64</i> |
| Ifremer - Laboratoire CNRS - Montpellier..... | 65 |
| Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR - Plouzané..... | 73 |
| Université de la Rochelle - LBME..... | 84 |
| <i>Thème Pathologie</i> | <i>95</i> |
| Ifremer - DRV/RA/LGP - Laboratoire de Génétique et Pathologie - La Tremblade..... | 96 |
| <i>Thème Ecotoxicologie</i> | <i>111</i> |
| Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR - Plouzané | 112 |
| Ifremer - DEL/PC - Brest et Nantes | 122 |
| <i>Thème Ecologie côtière</i> | <i>134</i> |
| Ifremer - CREMA - L'Houmeau | 135 |
| Ifremer - DEL/DRV/RA/LER/N - Port-en-Bessin..... | 141 |
| Ifremer - DRV/RA/LCB - La Trinité-sur-Mer | 161 |
| Ifremer - DRV/RA/LCPL - Bouin | 178 |
| Ifremer DRV/RA/LER/PC - La Tremblade..... | 185 |
| <i>Structures intermédiaires</i> | <i>193</i> |
| CREAA - Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole - Le Château d'Oléron | 194 |
| SMEL (DEL/DRV/RA/LER/N p.141) | |

Programme Morest 2004

Les orientations principales du programme 2004 sont les suivantes :

WP1 - Mise au point d'outils

La priorité est le transfert des nouvelles méthodologies vers les autres actions de recherche. On notera en particulier que tous les outils de biologie moléculaire qui ont été développés vont s'attacher à caractériser la physiologie et l'immunité des huîtres résistantes "R" et sensibles "S" dans le milieu ou en expérimentation, ainsi que les aspects associés au stress et aux pathogènes. Ils seront particulièrement utiles pour l'étude des juvéniles, qui est aussi prioritaire, et qui sont trop petits pour certaines analyses conventionnelles.

Dans ce volet, la recherche méthodologique se poursuit, en particulier vers la génomique fonctionnelle.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Priorité en génétique :

- un effort est poursuivi pour caractériser les souches "R" et "S" en deuxième année en baie des Veys, la sélection ayant été opérée principalement sur la mortalité des juvéniles en première année.
- une nouvelle génération divergente G4 en phase avec la nature est prévue pour la poursuite des études sur la classe d'âge des juvéniles.
- Les travaux nécessaires à la production de tétraploïdes "R" et "S" sont programmés.

Priorité sur sites ateliers :

- analyse de données : un ensemble de résultats obtenus les années précédentes doit faire l'objet d'analyse de données et de comparaisons statistiques inter annuelles et inter sites.
- les juvéniles : pour le suivi interdisciplinaire et *in situ* des paramètres physiologiques et immunitaire associés aux mortalités, l'accent sera mis sur les juvéniles en 2004, la majorité des travaux ayant jusqu'ici été faite sur des 18 mois pour les raisons techniques déjà évoquées. L'arrivée des outils moléculaires laisse espérer de pouvoir analyser ces huîtres de petite taille.
- le sédiment : la priorité est donnée cette année à l'étude de l'effet sédiment qui sera réalisée sur les trois sites avec un atelier majeur à Auray (Fort espagnol et baie de Quiberon). Une étude de la composition en sulfures et ammonium dans les sédiments sera intensifiée, ainsi que sur l'environnement microbien et écotoxicologique à l'interface eau sédiment.
- une extension de la caractérisation des mortalités des souches "R" et "S" sera réalisée à Arcachon, site important de captage naturel pour vérifier s'il existe une différence dans la date de ponte entre "R" et "S" comme vu à Auray. Ce testage sera suivi de l'étude de la survie des différentes cohortes en 2005 de façon à rechercher s'il existe des possibilités de repérer les huîtres "R" dans le captage naturel.

WP3 - Expérimentations phase 1 - "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités :

Priorités en expérimentation :

- traiter les données sur le modèle d'interaction : les travaux GIGAREPRO 2002 et 2003 sur des huîtres de 18 mois en cycle artificiel à l'écloserie d'Argenton ont permis de montrer les relations entre le niveau trophique, la reproduction, le déficit énergétique, la température et les conséquences immunitaires. Les analyses d'échantillons et de données continuent sur ces expériences.
- les juvéniles : une nouvelle expérience est réalisée sur cette classe d'âge.
- modèle d'interaction et conditions limites : une expérience permettant d'analyser en détail ce qui se passe autour de 19°C est programmée sur du 18 mois "R" et "S" (VALI). Elle permettra de déterminer les valeurs limites énergétiques à partir desquelles les huîtres meurent, de savoir si un stress et/ou une infection bactérienne sont alors nécessaires et quelle est la particularité de réponse des souches "R" et "S".
- les études sur les stress se poursuivent avec l'effet de l'hypoxie et des pesticides.
- les outils de biologie moléculaire sont mis en œuvre pour comprendre ce qui confère le caractère "R" ou "S" aux huîtres.
- modèle d'infection bactérienne ou virale : la mise au point d'un modèle d'infection continue avec une étude des événements moléculaires associés à la mortalité des juvéniles en raceway, des adultes à proximité du sédiment et sur les conditions d'expression des facteurs de virulence.

WP4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales.

- En amélioration génétique il est prévu de prendre un an pour étudier avec la profession, les modalités de dissémination des résultats obtenus.
- En parallèle, on étudiera les possibilités de distinguer dans le naissain de captage naturel les huîtres "R" des "S" par plusieurs méthodes de détection précoce.
- Les techniques consistant à éliminer l'une des composantes du risque par une gestion zootechnique des cheptels pendant la phase de risque se poursuit (température, niveau trophique, sédiment).
- Les interactions mises en évidence en baie des Veys entre les débits et flux annuels des rivières des bassins versants et les mortalités sont étendues aux deux autres sites ateliers. Une réflexion est engagée avec les services de l'état pour mieux gérer ces apports

WP5 - Synergies REPAMO-MOREST

- Le dispositif d'analyse systématique des cas de mortalités, soit dans le cas de déclarations, soit dans le cas de mortalités sur sites Morest est maintenu.

WP6 - Caractérisation de l'environnement

- La priorité est donnée aux estimations de flux des bassins versants, à la quantification des apports de l'élevage et de l'écosystème marin. Un regard particulier sera porté sur l'accumulation de matière organique dans les sédiments, et sur l'apport de sels nutritifs en relation avec la production primaire et de pesticides au niveau du sédiment.
- Modèle 3D mis en place pour relier les apports de sels nutritifs d'origine terrestre et marine à la production primaire. Réflexion pour un couplage de ce modèle à l'effort de reproduction et donc au risque.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils en | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales in situ | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison "R" et "S" au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles "R" et "S" au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire in situ des mortalités "R" et "S" versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison intra site | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé intra site des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité intra site baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé intra site de la maturation/Ponte "R" & "S"</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression "R" et "S" (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites ("R" et "S" 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| <i>- VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| <i>- VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| <i>- VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |

| | | |
|--|-------|--|
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nurserie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| Adultes | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tetraploïdes "R" et "S".....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Eclosieriel Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nurserie :</i> | 4.2.4 | |
| - <i>Nursérie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| - <i>Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| - <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | 4.3.3 | |
| - <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i> | | |
| - <i>baie des Veys Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrants des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |
| <i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i> | 4.5 | |
| WP5. Synergies REPAMO – MOREST - REMORA | | |
| Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes | 5.1 | |
| <i>Mortalités déclarées chez les professionnels</i> | 5.1.1 | |
| <i>Mortalités intervenues dans le cadre de Morest</i> | 5.1.2 | |
| <i>REMORA</i> | 5.1.3 | |
| Epidémiologie des pratiques culturelles | 5.2 | |
| WP6. Caractérisation de l'environnement | | |
| Recensement de données physiologies associées à différents sites | | |
| Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites | 6.1 | |
| <i>Estimation des débits et des flux des bassins versants : (voir 2.2.1)</i> | | |
| <i>2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i> | | |
| <i>Complément débits, MO et pesticides particuliers issus des bassins Versants en baie des Veys</i> | 6.1.1 | |
| Acquisition de données | 6.2 | |
| <i>Herbicides sédiment oulet particulière comparatif eau</i> | 6.2.1 | |
| <i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i> | 6.2.2 | |
| <i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?,</i> | 6.2.3 | |

| | | |
|--|-------|--|
| <i>(Phyto)phytobenthos</i> | | |
| <i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i> | 6.2.4 | |
| <i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Biodépôts baie des Veys</i> | 6.2.5 | |
| <i>Biocenose baie des Veys</i> | 6.2.6 | |
| Modélisation | 6.3 | |
| <i>Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle</i> | 6.3.1 | |
| <i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.2 | |
| <i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis-effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.3 | |
| WP7. Gestion de données, information et communication | | |
| Gestion des données | 7.1 | |
| Information, communication et partage | 7.2 | |
| WP8. Gestion et organisation du projet | | |
| Coordination | 8.1 | |
| Gestion financière du projet | 8.2 | |
| Bilan, programmation, rapports et publications | 8.3 | |
| Evaluation | 8.4 | |

Thème Génétique

Ifremer - DRV/RA/LGP - La Tremblade

Adresse : Station de la Tremblade
Laboratoire de Génétique et Pathologie/ Equipe Génétique -
Mus du Loup
BP 133
17390 - La Tremblade

Responsable du laboratoire : *Philippe Gouletquer*
Responsable de l'équipe : *Pierre Boudry*

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

- **Tâche 2.1.1.** Préparation du matériel biologique pour les manips BETON, CANARD et DYNAMORAY
- **Tâche 2.1.2.** Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine
- **Tâche 2.1.3** Triploïdes RR et SS
- **Tâche 2.2.3** DYNAMO Suite des analyses et traitement des données
- **Tâche 3.5.1** BETON : Juvéniles "S" et "R" nursés à 3 niveaux trophiques puis testage précoce pour suivi multidisciplinaire
- **Tâche 4.1.1.** Conception d'un dispositif et plan de sélection

1. Descriptif de l'activité

Introduction

L'équipe de Génétique du Laboratoire de Génétique et Pathologie (DRV/RA/LGP – La Tremblade) gère les aspects génétiques du programme Morest. Ces aspects englobent notamment :

- l'étude des bases génétiques des variations pour la résistance aux mortalités estivales chez le naissain.
- Le transfert de ces résultats pour la mise en place d'un schéma de sélection.
- La production et l'étude des performances de triploïdes « naturels » (c.a.d. issu de croisements entre diploïdes et tétraploïdes).
- Le « lien » entre les points précédents, c'est à dire l'amélioration génétique des diploïdes et des tétraploïdes afin de produire des triploïdes « naturels » améliorés.
- La caractérisation moléculaire et fonctionnelle des lignées sélectionnées "S" et "R" (taches principalement menées par les laboratoires thématiques concernés : LEMAR, LPI, DRIM...)

L'étude des bases génétiques des variations pour la résistance aux mortalités estivales chez le naissain a été menée dans le cadre de la thèse de Lionel Dégremont soutenue en décembre 2003. En 2004, la priorité dans ce domaine sera mise sur le transfert des acquis et la mise en place d'un schéma de sélection impliquant le secteur productif, en relation étroite avec le SYSAAF.

WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.1 - Effet génétique

Sous-tâche 2.1.1 - Préparation du matériel biologique pour les manip BETON, CANARD et FORMER04 et DYNAMORAY

L'écloserie du Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) produira, comme les années précédentes, des lots destinés à expérimentation dans diverses actions du défi Morest. Cette production est rendue possible par le recrutement d'un CDD (Adeline Fortin) pour une durée de 8 mois.

BETON : Maturation des géniteurs issus de la G3C1 (lots consanguins) afin de produire, début Avril 2004, une G4SD de constitution génétique similaire à la G3SD. Contrairement à la G3SD, cette G4SD sera produite en pool de naissain "Résistant" et "Sensible" diploïdes et triploïdes (+ témoins diploïde et triploïde). Chaque lot sera réalisé en triplicats. Une partie de ce matériel servira pour les manip FORMER04 et DYNAMORAY.

CANARD : Maturation des géniteurs issus de la G3C1 (lots consanguins) afin de produire, en juillet-août 2004, une G4SD de constitution génétique similaire à la G3SD. Contrairement à la G3SD, cette G4SD sera produite en pool de naissain "Résistant" et "Sensible" diploïdes.

Sous-tâche 2.1.2 - Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine

Contrairement aux années précédentes et pour permettre l'avancement d'autres actions, il n'y aura pas de reproduction en consanguinité des lignées "S" et "R" en 2004. Les lots G3C1 et G3C2 produits en 2003 et maintenus indemnes de mortalité à la nurserie de Bouin au cours de l'été 2003 sont actuellement en élevage sur parc (500 individus / famille). Une partie de ces lots sera utilisée pour les productions 2004 (manips BETON et CANARD). Le reste sera maintenu en élevage et devra servir de géniteurs pour les futures générations (2005 ?).

Sous-tâche 2.1.3 - Triploïdes RR et SS (en lien avec la tâche 4.1.1)

Les résultats des années précédentes ont permis de montrer les points suivants :

1. Il est possible de sélectionner pour améliorer la résistance aux mortalités estivales chez le naissain (voir résultats Morest 2002 confirmés en 2003).
2. Le naissain triploïde «naturel» présente, en général, des taux de survie supérieurs à ceux du naissain diploïde (voir résultats Morest 2001, 2002, 2003).
3. Le naissain issu de croisements entre femelles diploïdes "R" ou "S" et des tétraploïdes (non sélectionnés pour ce caractère) montre la transmission du caractère chez les triploïdes (résultats MOREST 2003).

L'objectif de cette tâche est de confirmer le point 3 (ces observations n'ayant été réalisées qu'une seule année) et de produire des lignées tétraploïdes "R" afin de pouvoir produire, à terme, des triploïdes issus de diploïdes et de tétraploïdes sélectionnés.

Plusieurs approches sont menées en parallèle afin de produire des tétraploïdes "R". Une de ces méthodes (Guo et al., 1994) fait l'objet d'un brevet déposé par des chercheurs américains et actuellement contesté par l'Ifremer et par une des éclosiers françaises. Le développement et l'optimisation d'autres méthodes sont donc réalisés sous le sceau de la **confidentialité**.

Compte-tenu de la difficulté de ces approches, il n'est pas envisagé de produire des tétraploïdes "S" (les comparaisons se feront par rapport aux tétraploïdes non sélectionnés).

Sous-tâche 2.2.3 - DYNAMO Suite des analyses et traitement des données

Dans le cadre de la manip DYNAMO, nous avons souhaité évaluer l'impact des conditions environnementales sur le taux d'aneuploïdie d'une population avec une variabilité génétique assez large (pool de la série 3 de la première génération). Un prélèvement a été réalisé avant la mise sur sites afin d'estimer le taux d'aneuploïdie de cette population. Des prélèvements ont été réalisés après deux mois de mise sur sites (fin mai 2002) pour chaque condition environnementale :

1. élevage sur estran à proximité du fond (15 cm) sur site atelier de Perquis,
2. élevage sur estran à 70 cm du fond sur site atelier de Perquis,
3. élevage en marais sur site d'Artouan.

Un autre prélèvement a eu lieu après une période de mortalité (début juillet 2002), et ce, pour chaque site. En 2004, les analyses seront complétées et les données analysées.

WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.5 - Modèle d'infection (et comparaison "R" et "S")

Sous-tâche 3.5.1 - BETON : Juvéniles "S" et "R" nursés à 3 niveaux trophiques puis testage précoce pour suivi multidisciplinaire

Afin de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'influence du mode de nursage sur l'expression des mortalités du naissain ?
- Le testage « précoce » tel que réalisé sur La Tremblade les années précédentes peut-il être utilisé pour suivre de manière quotidienne le phénomène des mortalités et donc les facteurs causant ces mortalités ?

Une manip multidisciplinaire sera réalisée conjointement avec le Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL) et avec l'intervention de nombreux autres partenaires.

Une G4SD, de constitution génétique similaire à la G3SD, sera constituée à partir de géniteurs issus de la G3C1 (lots consanguins). Contrairement à la G3SD, cette G4SD sera produite en pool de naissain "Résistant" et "Sensible" diploïdes et triploïdes (+ témoins diploïde et triploïde). Chaque lot sera réalisé en triplicats. Ces lots seront nursés au LCPL suivant 3 niveaux trophiques (extensif : 5 µg/l de chl_a / semi-intensif : 10 µg/l de chl_a / intensif : 20 µg/l de chl_a). Ces trois niveaux de nursage devraient avoir un effet direct sur le taux de croissance des individus et (à vérifier) sur leur niveau de maturation précoce. De plus et seulement si la taille des animaux le permet, il pourra être envisagé de dresser le bilan énergétique (SFG) des lots, aux trois niveaux trophiques, à la fin du nursage. Les lots seront ré-expédiés à La Tremblade pour testage en raceways extérieurs (cf. les expérimentations « testage précoce » des années précédentes). Un suivi des mortalités sera réalisé avec un pas de temps « serré » (observations quotidiennes – la fréquence des comptages mort/vivant reste à définir en fonction de la difficulté à compter le naissain pré-grossi en extensif qui sera vraisemblablement de très petite taille). Un suivi sera réalisé par les différentes thématiques pathologie, immunologie, expression de gènes candidats.

WP 4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.1 - "Amélioration Génétique"

Sous-tâche 4.1.1 - Conception d'un dispositif et plan de sélection

L'objectif de cette tâche en 2004 sera d'évaluer l'intérêt et la possibilité de la mise en œuvre d'un programme de sélection «collectif» associant le SYSAAF (leader pour cette tâche), l'Ifremer, les éclosoeurs et les structures professionnelles et associatives de développement régionales. Le projet vise à rencontrer les acteurs potentiels ainsi que les représentants professionnels des Sections Régionales de la Conchyliculture pour discuter et identifier :

- les objectifs généraux d'un futur programme «collectif» d'amélioration génétique du naissain d'écloserie,
- le schéma d'organisation générale des tâches entre les acteurs potentiels,
- les points de blocage et les opportunités techniques nouvelles ainsi que les étapes nécessaires,
- les besoins d'investissement (bassins larvaires, raceway de pré-grossissement, structures d'évaluation, etc.),
- les besoins en personnel et la nécessité de la création d'une structure collective propriétaire des animaux,
- le coût de fonctionnement ainsi que les besoins de soutiens publics (Régions, IFOP, MENRT, OFIMER),
- le type de structure collective qui sera propriétaire des lignées à sélectionner et responsable de la diffusion du progrès génétique.

Le principal résultat consistera à savoir si une approche collective s'avère possible pour transférer les résultats acquis dans le cadre de Morest. Ce résultat sera présenté à l'ensemble des participants aux journées Morest en 2004.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|--|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités "R" et "S" versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, stéroïdes</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte "R" & "S"</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression "R" et "S" (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites ("R" et "S" 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - <i>VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| - <i>VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| - <i>VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patholStress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypol/hyperoxie, H2S, NH3...</i> | | |
| Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>"R". et "S". gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (RS 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |

| | | |
|--|-------|--|
| Betonbloom : Juvéniles "R" "S", 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpès | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tétraploïdes "R" et "S".....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Eclosieriel Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nursérie :</i> | 4.2.4 | |
| - <i>Nursérie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| - <i>Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| - <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | 4.3.3 | |
| - <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i> | | |
| - <i>BDV Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrans des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |
| <i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i> | 4.5 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--|
| WP 2 | | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet MOREST (2001 – 2002 – 2003)

Boudry P (2002). Genetic improvement of oysters by selective breeding, review and recent results. Exposé à l'Annual International Conference, Association of Scottish Shellfish Growers, Oban, Ecosse, 17-18 Octobre 2002.

Boudry P (2003). Diversité génétique chez les huîtres cultivées en France : perspectives pour l'amélioration des schémas de sélection. Exposé à la conférence « Récent progrès en recherche aquacole », Institut Océanographique, Paris, 12 mars 2003.

Boudry P (2003)..Base génétique des mortalités estivales du naissain chez *C. gigas* : comment expliquer une héritabilité si élevée ? Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Boudry P (2003). Rappel des principaux résultats génétiques 2001-2002 et présentation du matériel biologique. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P (2003). Mortalité estivales et croissance du naissain de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: étude de familles sélectionnées. Exposé aux Journées Conchylicoles, Ifremer, Nantes, 12-13 Mars 2003.

Dégremont L, Bédier E, Martin JL, Soletchnik P, Joly JP, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P (2002). Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Proceedings of the World Congress on genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23, pp. 481-484.

Dégremont L, Bédier E, Martin JL, Soletchnik P, Joly JP, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P. Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Exposé au 4th World Congress on genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 19-23 Aout 2002.

Dégremont L, Boudry P, Bédier E, Ropert M & P Soletchnik (2002). Caractérisation in situ des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Lots consanguins. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Dégremont L, Boudry P, Bédier E, Ropert M & P Soletchnik. Caractérisation in situ des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Sélection divergente. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Dégremont L, Boudry P, Soletchnik P, Bédier E, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF. Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. Talk at the 95th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, April 13-17, New Orleans, Louisiana, USA.

Dégremont L, Joly J.P, Bédier E, Ropert M & P Soletchnik (2002). Caractérisation in situ des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Dégremont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain and P. Boudry (2002). Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Communication orale 7th WGALP (Montpellier 19-23 août 2002).

Dégremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bédier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, and J.F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 327 (résumé).

Dégremont L., P. Boudry. et E. Bédier (2003). Effet de l'âge et du parcours zootechnique sur les mortalités estivales de cheptels d'écloserie sélectionnés. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Dégremont L., A. Fortin, P. Boudry (2003). Caractérisation sur estran des 3 séries produites en troisième génération : étude de la survie, de la croissance et du rendement. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Dégremont L. Etude des bases génétiques des mortalités estivales et relatives avec la croissance chez les juvéniles de *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen. 322pp.

Lambert C, Soudant Ph, Choquet G, Paillard C, Frouel S, Dégremont L, Delaporte M, Moal J, Boudry P, Soletchnik P, Ropert M, Bédier E, Renault T, Gagnières B, Huvet A, Samain JF (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. Exposé au 95th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, 13-17 Avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA.

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.-P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnaire, A. Huvet and J.-F. Samain (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 339 (résumé).

Moal J, Bédier E, Fleury PG, Langlade A, Lecoguic Y, Dégremont L, Boudry P, Le Coz JR, Pouvreau S, Enriquez-Diaz M, Lambert C, Soudant P, Samain JF (2003). Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. Exposé au 95th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, 13-17 Avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA.

Moal J., E. Bédier, P.G. Fleury, A. Langlade, Y. Le Coguic, L. Dégremont, P. Boudry, J.R. Le Coz, S. Pouvreau, M. Enriquez-Diaz, C. Lambert, P. Soudant and J.F. Samain (2003). Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 345 (résumé).

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Dégremont, E. Bédier, J.F. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, N. Faury, O. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire and J.F. Samain (2003). Characterisation of Summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 354 (résumé).

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Degrémont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.-P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet and J.-F. Samain (2002). Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. (National Shellfisheries Association, Mystic, USA, 14-18 avril 2002).

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

Sur la base de 9h mois par an;

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Pierre Boudry | C | 1,5 |
| Sylvie Lapègue | C | 0,5 |
| Raphaël Brizard | C | 1,1 |
| Florence Cornette | T | 0,5 |
| Pascal Phélipot | T | 1,5 |
| Serge Heurtebise | T | 1 |
| Jean Claude Billy | T | 3 |
| Adeline Fortin | T (CDD) | 8 |
| Karine Bouilly | Thésarde (bourse Conseil Général) | 1 |

SYSAAF - Rennes

Adresse : Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français
Station SCRIBE - Campus Beaulieu
35042 - RENNES

Responsable : **Pierrick HAFFRAY**

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé du projet : Sortie de crise - Transfert des résultats auprès des écloséries commerciales

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

Les actions conduites en 2003 ont permis une première analyse de faisabilité de la mise en œuvre de programmes de sélection des géniteurs sur le caractère de mortalité estivale par les écloséries commerciales. A l'issue de la journée technique du 21 octobre et compte tenu de la lourdeur et de la spécificité du travail de sélection, de la taille économique limitée des écloséries et de l'intérêt collectif de tels investissements, les écloseurs ont souhaité que l'étude des modalités d'une approche collective soit discutée avec les représentants de la filière et les associations de développement en 2004. Cette conclusion a été présentée lors des Journées Morest de la Rochelle.

L'objectif de l'action qui sera conduite par le SYSAAF en 2004 sera de continuer à assurer l'interface avec les écloséries commerciales et d'initier une analyse de la faisabilité d'un programme «collectif» d'amélioration génétique du produit d'écloserie en interface avec l'Ifremer, les écloséries commerciales, les structures régionales de développement de l'aquaculture et les Sections Régionales de la Conchyliture (SRC) participant à Morest.

WP4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.1 - "Amélioration" génétique

Sous-tâche 4.1.1 - Intérêt et faisabilité d'un programme collectif d'amélioration génétique de la qualité du naissain d'écloserie

Résumé de votre action dans la tâche :

L'objectif de la participation du SYSAAF à Morest en 2004 sera d'évaluer l'intérêt et la possibilité de la mise en œuvre d'un programme de sélection «collectif» associant l'Ifremer, les écloseurs et les structures professionnelles et associatives de développement régionales.

Matériel et méthode de votre action

Le projet vise à rencontrer les acteurs potentiels ainsi que les représentants professionnels des Sections Régionales de la Conchyliculture pour discuter et identifier :

- les objectifs généraux d'un futur programme «collectif» d'amélioration génétique du naissain d'écloserie,
- le schéma d'organisation générale des tâches entre les acteurs potentiels,
- les points de blocage et les opportunités techniques nouvelles ainsi que les étapes nécessaires,
- les besoins d'investissement (bassins larvaires, race-way de pré-grossissement, structures d'évaluation, etc.),
- les besoins en personnels et la nécessité de la création d'une structure collective propriétaire des animaux,
- le coût de fonctionnement ainsi que les besoins de soutiens publics (Régions, IFOP, MENRT, OFIMER),
- le type de structure collective qui sera propriétaire des lignées à sélectionner et responsable de la diffusion du progrès génétique.

Résultat attendu

Le principal résultat consistera à savoir si une approche collective s'avère possible pour transférer les résultats acquis dans le cadre de Morest. Ce résultat sera présenté à l'ensemble des participants aux journées Morest en 2004.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Ce travail sera réalisé en étroite concertation avec l'équipe « Génétique » du laboratoire Ifremer de La Tremblade, les associations de développement Régionales et les Sections Régionales de la Conchyliculture.

Calendrier d'exécution 2004

| | Mois sur 2004 | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Rencontre des partenaires | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Réunion de bilan collective | | | | | | | | | ■ | | | |
| Présentation des résultats aux Journées Morest 2004 | | | | | | | | | | | ■ | |
| Rédaction du compte-rendu de relevé des discussions | | | | | | | | | | | | ■ |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Haffray P., 2003. Validation et valorisation des premiers résultats de Morest par les écloserieurs : opportunités, points de blocage et propositions. Journées Morest des 26-27-28 novembre à La Rochelle. Présentation orale.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|------------------|----------------|---------------------|
| Haffray Pierrick | Ingénieur | 1 H/mois |
| Chapuis Hervé | Ingénieur | 0.5 H/mois |

Demande budgétaire

La demande budgétaire sur 2004 représente une augmentation moyenne de l'ordre de 50 % de celle demandée les années précédentes due à l'augmentation :

- du temps ingénieur nécessaire à la conduite de cette action qui nécessitera de nombreux déplacements (le salaire du Directeur du SYSAAF qui participera aux réunions avec les partenaires n'étant pas pris en compte),
- des frais de déplacement et d'organisation de réunions de travail avec les partenaires.

Projet de budget 2004 en euros HT

Salaires

| | |
|--|-------------|
| 1 homme mois de Pierrick HAFFRAY | 7 400 euros |
| 0,5 homme-mois d'Hervé CHAPUIS (Généticien SYSAAF) | 3 100 euros |

Déplacements

| | |
|---|-------------|
| 4-5 réunions collectives (3 personnes) | 2 000 euros |
| Rencontre structures professionnelles ou associatives | 2 500 euros |

Frais de gestion (10 %) 1 500 euros

Total demandé à Morest 16 500 euros HT

Thème Physiologie

Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M - Argenton et Brest

Adresse : Ifremer Centre de Brest
Laboratoire DRV/RA/UMR/PE2M
BP 70
29280 - PLOUZANE

Responsable : J.L. NICOLAS, J. MOAL et S. POUVREAU

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

- Tâche 1.2 - Développement d'outils en physiologie,
- Tâche 1.4 - Développement d'outils en pathologie,
- Tâche 2.2 - Etude intrasite de la dynamique des mortalités en baie de Quiberon (FORMER04),
- Sous-tâche 2.2.7 - Effet du sédiment et interaction avec les mortalités de juvéniles (DYNAMAURAY),
- Sous-tâche 2.2.7bis - Caractérisation des familles "R" et "S" (18 mois) à Auray - Influence de la proximité du sédiment sur la composition ionique de l'hémolymphe ; recherche de gènes impliqués dans les mortalités et dans la différence phénotypique "R" et "S",
- Sous-tâche 2.2.9 - Effet du sédiment en baie des Veys (DYNBDV),
- Tâche 3.1 - Gigarepro 2003 : Energétique et nutrition,
- Sous-tâche 3.2.1 - Gigarepro 2004,
- Sous-tâche 3.2.2 - Energétique et température, conditions limites. Expérimentation pluridisciplinaire (VALI),
- Sous-tâche 3.2.3 - Effet de la qualité sur la ressource trophique,
- Tâche 3.4 - Effet de la nourriture sur la dynamique de constitution des réserves (RESERV),
- Sous-tâche 3.5.1 - Testage précoce en raceways en béton de naissain "S" et "R" en fonction du mode de nursage (BETON),
- Sous-tâche 3.5.2 - Conditions d'expression de la virulence
- Tâche 5.1 - Analyse bactériologique des lots Morest en cours de mortalité.
- Sous-tâche 6.3.2 - Allocation d'énergie et modèle d'écophysiologie générique chez *Crassostrea gigas*

1 - Descriptif de l'activité

WP 1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.2 - Physiologie

- Mise au point d'un dosage type ELISA par anticorps anti-protéines ovocytaires pour suivre la gamétogénèse chez les femelles,
- Mise au point du dosage biochimique de la glycogène synthase,
- Développement d'un marqueur moléculaire et protéique (hypoxie inductible facteur) pour la réponse de *Crassostrea gigas* aux phénomènes d'hypoxie,
- Participation (coll. GPIA) pour la mise au point des micro-arrays pour la comparaison "R" et "S", ainsi que pour la mise au point de la technique de RNA interférence,
- Mise au point d'une méthode d'analyse de la microflore du sédiment en particulier pour suivre les populations de vibrios et *Pseudoalteromonas*.

Tâche 1.4 - Pathologie - Variation de la virulence de bactéries pathogènes en fonction de paramètres abiotiques

Une métallo-protéase a été isolée dans les ECP (Extracellulaire products) de *V. aestuarianus*. Elle possède un fort pouvoir pathogène. La séquence encore partielle de son gène devra être complétée. Il pourra alors être intégré dans un vecteur d'expression pour produire cette enzyme et pouvoir fabriquer un anticorps contre celle-ci. Etant probablement un des facteurs de virulence essentiel chez ce pathogène son expression (par PCR en temps réel, par dosage enzymatique ou par ELISA) sera mesurée chez les huîtres au cours de l'infection. Son dosage permettra également d'étudier sa modulation en présence de différents facteurs environnementaux : NH₃, sulfure, anoxie, milieu nutritif (hémolymphe,...)

Il sera précisé les effets des ECP de la souche O1/32 sur les hémocytes de l'huître (effet dose sur le respiratory burst, la létalité, la phagocytose...)

WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.6 - FORMER04 - Étude intra site de la dynamique des mortalités en baie de Quiberon

L'objectif de cette tâche est de poursuivre les actions initiées en 2003 afin de prendre en compte, dans l'étude des mortalités estivales, la spécificité des pratiques culturales en eau profonde pratiquées en Bretagne Sud et de comparer les dynamiques de mortalité survenant dans l'environnement particulier de l'eau profonde (semis au sol, exondation, nourriture, température) et dans celui de l'estran suivi en 2003 avec BERAY, et en 2004 avec DYNAMAURAY (Tâche 2.2.7).

Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental vise à suivre la dynamique des mortalités sur du naissain d'un an (captage naturel) placé à deux hauteurs par rapport au sédiment. Dans la mesure du possible, du naissain 3N sera ajouté au dispositif. Un suivi pluridisciplinaire sera effectué dans la mesure de la possibilité des prélèvements et des mesures sur du naissain et vise à encadrer au maximum les phénomènes survenant pendant la période critique de mortalité, autour de la 2^{ème} quinzaine de juin sur le site d'Auray.

A chaque sortie 30 individus (pour chaque catégorie et niveau) seront prélevés à leur sortie de l'eau et congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures de l'état énergétique (CEA, Sucres), la gamétogenèse (classe de lipides neutres), l'alimentation (analyse des acides gras et stérols). Ces échantillons pourront aussi servir ultérieurement et en fonction des résultats à l'analyse de certains gènes du métabolisme énergétique.

Résultat attendu

Comparer la physiologie des animaux situés sur estran et en eau profonde en particulier l'état énergétique, la gamétogenèse et l'alimentation.

Relier la mortalité à une éventuelle toxicité du sédiment. La comparaison des suivis en eau profonde et sur estran (Tâche 2.2.7) permettra par ailleurs de vérifier la relation existant sur les deux sites entre mortalité, maturation et conditions environnementales.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LCB - La Trinité-sur-Mer : Echantillonnage et Biométrie
- Ifremer - DEL/PC - Nantes : Analyse chimique sédiment
- Ifremer - DEL/PC - Brest : Écotoxicologie

Calendrier d'exécution 2004

Le calendrier des prélèvements sera réparti de mars à octobre, avec une fréquence variable selon le type de suivi, avec un resserrement du pas d'échantillonnage autour de la période critique, soit de la mi-août à fin septembre.

Sous-tâche 2.2.7 - Effet du sédiment et interaction avec les mortalités de juvéniles (DYNAMAURAY)

La tâche DYNAMAURAY vise à poursuivre d'une part (1) les études DYNAMO02 et DYNAMO03 menées au LER-PC et ayant conduit à la mise en évidence, dans les conditions d'estran, de stress environnementaux liés à la présence du sédiment; et (2) d'autre part les caractérisations *in situ* ayant conduit à des relations entre la maturation et la mortalité. L'ensemble de ces actions ont été menées chez des huîtres de 18 mois, or les sites de Marennes-Oléron et de la rivière d'Auray sont caractérisés par des mortalités de naissain: l'objectif de la tâche est de vérifier, pour des animaux de cette classe d'âge, les hypothèses de stress et de relation entre maturation et mortalité.

De plus, ce matériel va également être utilisé pour cribler les clones (de la banque soustractive R/S) par la technique de macro-arrays entre lots "R" et "S" juste avant un épisode de mortalité estivale.

Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental vise à suivre la dynamique des mortalités sur du naissain d'un an (captage naturel) placé à deux hauteurs par rapport au sédiment. Dans la mesure du possible, du naissain 3N sera ajouté au dispositif. Un suivi pluridisciplinaire sera effectué dans la mesure de la possibilité des prélèvements et des mesures sur du naissain et vise à encadrer au maximum les phénomènes survenant pendant la période critique de mortalité, ie autour de la 2^{ème} quinzaine de juin sur le site d'Auray.

A chaque sortie 30 individus pour chaque catégorie et niveau seront prélevés à leur sortie de l'eau et congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures de l'état énergétique (CEA, Sucres), la gamétogenèse (classe de lipides neutres), l'alimentation (analyse des acides gras et stérols). Ces échantillons pourront aussi servir ultérieurement et en fonction des résultats à l'analyse de certains gènes du métabolisme énergétique. L'analyse histologique de la gonade sera effectuée pour estimer la cinétique et l'intensité de reproduction. Pour la biologie moléculaire, 2 prélèvements sont programmés avant mortalité pendant la période critique : un dès la température de 19°C atteinte et le second à la marée suivant soir environ 15 jours plus tard. Prélèvement de 20 huîtres par condition, ouvrir l'huître et la plonger dans sa valve inférieure dans l'azote liquide. Des dissections seront ensuite réalisées pour extraire l'ARN de chaque tissu analysé.

Résultats attendus

- Vérifier sur du naissain les hypothèses développées sur le 18 mois, à savoir l'existence d'un stress environnemental aigu et l'implication de la gamétogenèse dans les phénomènes de mortalité.
- Caractériser la physiologie du naissain de captage naturel sur estran au moment des mortalités,
- Comparer la physiologie des animaux situés à différents niveaux par rapport au sédiment,
- Analyser l'impact de la maturation sur l'état énergétique (2N/3N),
- Recherche et identification (1) des bases fonctionnelles du différentiel R/S et (2) des mécanismes physiologiques déréglés amenant à la mort estivale sur les juvéniles "R" et "S" de la G4 (2004)

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LCB - La Trinité-sur-Mer : suivi biométrique,
- Ifremer - DEL/PC - Nantes : Analyse chimique sédiment,
- Ifremer - DEL/PC - Brest : Écotoxicologie,
- GPIA, Université de Caen LBBM : partage du matériel ARN.

Sous-tâche 2.2.7bis - Caractérisation des familles "R" et "S" (18 mois) à Auray - Influence de la proximité du sédiment sur la composition ionique de l'hémolymphe ; recherche de gènes impliqués dans les mortalités et dans la différence phénotypique "R" et "S".

Cette tâche fait suite aux études DYNAMO (2002) et DYNAMOR (2003) et propose comme les précédentes une approche multidisciplinaire de l'étude des mortalités estivales de *Crassostrea gigas* en relation avec celle du micro-environnement au niveau des tables ostréicoles. L'étude associera un suivi zootechnique à une étude sédimentaire fine autour de la période de mortalité (autour de la mi-juin).

Un des objectifs de cette tâche est de confirmer les différences de composition de l'hémolymphe pouvant traduire des états hypoxiques différents pour des huîtres de phénotype différent et situées à différents niveaux par rapport au sédiment au moment des mortalités. Le deuxième objectif est d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les "R" et les "S" juste avant le phénomène de mortalité.

De plus, ce matériel va également être utilisé pour cribler les clones (de la banque soustractive R/S) par la technique de macro-arrays entre lots "R" et "S" juste avant un épisode de mortalité estivale.

Matériel et méthodes

Le cheptel sera constitué d'huîtres diploïdes de 18 mois (pool SD3 "R" et "S") positionnées sur table de mars à août, à des hauteurs de 15 cm et 70 cm. Un stock de 400 "R" et 400 "S" est nécessaire pour l'ensemble.

Pour l'étude de l'hémolymphe, les animaux seront prélevés juste avant l'émersion (10/lot) et transportés au sec et au froid. 7 dates de prélèvements sont envisagées en fonction des possibilités : 22/04 ; 17/05 ; 30/06 ; 10/06 ; 17/06 ; 24/06 ; 1/07. Un envoi supplémentaire de 50 "S" et 50 "R" est prévu en avril et en juin pour tester l'influence de la température d'exondation sur les paramètres étudiés.

Pour la biologie moléculaire, 2 prélèvements sont programmés avant mortalité pendant la période critique : un dès la température de 19°C atteinte, et le second à la marée suivant soir environ 15 jours plus tard. Prélèvement de 20 huîtres par conditions, ouvrir l'huître et la plonger dans sa valve inférieure dans l'azote liquide. Des dissections seront ensuite réalisées pour extraire l'ARN de chaque tissu analysé.

Résultats attendus

Les paramètres de l'hémolymphe peuvent traduire un état d'hypoxie et peuvent discriminer des phénotypes dont la régulation acide-base (comportement respiratoire) diffère dans un environnement similaire.

Recherche et identification (1) des bases fonctionnelles du différentiel R/S et (2) des mécanismes physiologiques déréglés amenant à la mort estivale.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LCB - La Trinité-sur-Mer : suivi biométrique
- GPIA, Université de Caen - LBBM : partage du matériel ARN

Sous-tâche 2.2.9 - Effet du sédiment (DYNBDV)

La tâche DYNBDV vise à poursuivre à intégrer la dimension effet du sédiment en baie des Veys, ce qui n'a jamais encore été observé par comparaison aux résultats acquis en 2003 dans le bassin de Marennes Oléron. A l'instar des autres sites, ce matériel va également être utilisé pour la comparaison moléculaire des "R" et "S", c'est à dire pour cribler les clones (issus de la banque soustractive R/S) par la technique de macro-arrays entre lots "R" et "S" prélevés en période critique, juste avant un épisode de mortalité estivale.

Matériel et méthodes

Un suivi pluridisciplinaire est programmé sur les lots G3SD "R" et "S" et ce à la fois à 15 et 70 cm du sédiment. Pour la biologie moléculaire, 2 prélèvements sur l'ensemble de ces lots sont programmés avant mortalité pendant la période critique : un dès la température de 19°C atteinte et le second à la marée suivant soir environ 15 jours plus tard. Prélèvement de 20 huîtres par conditions, ouvrir

l'huître et la plonger dans sa valve inférieure dans l'azote liquide. Des dissections seront ensuite réalisées pour extraire l'ARN de chaque tissu analysé.

Résultats attendus

Comparer la physiologie des animaux situés à différents niveaux par rapport au sédiment
Recherche et identification (1) des bases fonctionnelles du différentiel R/S et (2) des mécanismes physiologiques déréglés amenant à la mort estivale.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche,

- Ifremer - DEL/DRV/RA/LER/N - Port-en-Bessin : suivi biométrique
- GPIA, Université de Caen - LBBM : partage du matériel ARN

WP 3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.1 - Gigarepro 2003

L'analyse des échantillons et des données acquises, lors de l'expérimentation Gigarepro2003, est à poursuivre à la fois sur les enzymes digestives pour comprendre la baisse significative de rendement d'assimilation au cours de la période critique (juin-juillet) montrant un SFG négatif ; et aussi sur les gènes du métabolisme des sucres pour appréhender l'effet de la quantité de nourriture de sa privation (jeun) sur son fonctionnement et sur les différents apports de glucose. Par ailleurs, les analyses sur les relations énergie-immunité sont à poursuivre (thèse M.Delaporte)

Sous-tâche 3.2.1 - Gigarepro2004

Introduction (rappel des résultats 2003 et objectif 2004)

Les expérimentations 2002 et 2003 (Gigarepro 2002 & 2003, WP 3.1) ont consisté à analyser, sur un cycle semi-annuel, l'effet du niveau trophique sur l'état reproducteur, l'état physiologique, l'état immunitaire et l'état microbiologique de population d'huîtres **âgées de 1 an** en début d'expérimentation (pool génétique reconstitué en 2002 et Familles "R" et "S" en 2003).

D'un point de vue bioénergétique, l'analyse des résultats 2002 & 2003 n'est, pour l'instant, que partielle mais il ressort déjà (Pouvreau et al., 2002 ; Pouvreau et al., 2003) qu'un milieu nutritif riche au printemps favorise, en été, l'hypertrophie des gonades chez *Crassostrea gigas* tout en réduisant l'efficacité de ponte, ce qui se traduit par un prolongement de la période de gamétogenèse active. Cette période se caractérise aussi par **une efficacité d'assimilation diminuée et un métabolisme accru**, ce qui engendre en période estivale une scope for growth négatif. Ce bilan est d'autant plus négatif que le développement des gonades est élevé. Si à ce déficit énergétique s'ajoute un «stress» supplémentaire, la probabilité d'apparition de mortalités augmente. Nous toucherions donc là un réel «talon d'Achille» chez cette espèce : à la fin de la période de gamétogenèse active et avant la ponte, l'animal semblerait ralentir toute fonction de nutrition malgré un besoin métabolique accru entrant dans une période d'affaiblissement passager. Réalisé pour l'instant sur du 18 mois, notre expérimentation 2004 en condition contrôlée vise à confirmer ou infirmer sur du **naissain naturel (12 mois)** ce schéma paradoxal de détresse physiologique. Cette approche en condition expérimentale sera aussi vérifier conjointement en condition naturelle (Tâche WP 2, M. Alunno-Bruscia, Comm. Pers.).

Les 2 objectifs de gigarepro 2004 sont donc les suivants.

Objectif premier : vérifier le ralentissement estival de la nutrition

L'éventuel «ralentissement» des activités de nutrition (notamment baisse de l'efficacité d'assimilation) en pleine période de gamétogenèse va à l'encontre de la plupart des lois de nutrition, généralement connues pour augmenter avec la température (e.g. Bougrier et al. 1995). Ces lois entraînent d'ailleurs un dysfonctionnement des modèles bioénergétiques (e.g. Ren & Ross, 2002) en période de maturation chez *Crassostrea gigas*. Par contre, ce résultat rejoint des observations antérieures sur l'activité ciliaire réduite en période de gamétogenèse (Mori, 1979), ainsi que les résultats obtenus par Soletchnik et al. (1997) sur la baisse de l'efficacité d'absorption.

Objectif second : Vérifier l'augmentation estivale du métabolisme basal

Les vitesses de réaction chimique et donc les taux physiologiques sont fonction de la température (e.g. loi d'Arrhenius, Kooijman 2002). Ainsi, il est classiquement observé une augmentation de la respiration standard d'un organisme avec la température. Mais, chez *Crassostrea gigas*, la gamétogenèse est concomitante de l'élévation de la température. Quel est donc la part de métabolisme lié à la gamétogenèse de l'huître creuse dans cette augmentation ? Cette fraction peut-elle devenir prédominante au point d'engendrer un effondrement bioénergétique ?

Protocole général de la tâche et calendrier d'exécution 2004

Plan d'expérience

La figure 1 expose schématiquement le plan général d'expérience. Ce plan vise à suivre temporellement la physiologie de la gamétogenèse d'une même population de naissain placée dans trois conditions trophiques différentes (CN0/CN1/CN3). Le niveau de nourriture de chacune de ces conditions sera fixé de manière à pouvoir produire 3 niveaux d'effort de reproduction. Le niveau CN0 vise à obtenir des animaux « à gamétogenèse très réduite » en période estivale (lot témoin « sans reproduction »).

A deux périodes clés de l'expérimentation (début de gamétogenèse et gamétogenèse active), un échantillon de la population subira un gradient thermique de 15 à 25 °C de manière à déterminer la part du métabolisme basal de celle du métabolisme lié à la gamétogenèse.

L'intégralité de l'expérience se déroulera à la **Station Expérimentale d'Argenton** sur la durée d'un cycle de gamétogenèse (d'Avril à Août). En considérant une mortalité faible, les besoins s'élèveraient à environ **3000 individus** (1000 par condition).

Liste des paramètres mesurés

La liste des paramètres suivis est non exhaustive et dépendra de la participation des intervenants. Au minimum, les paramètres suivants seront mesurés (UMR PE²M, LCB, CREMA, LGP) :

Croissance générale

Biométrie invasive (S. Pouvreau, Y. Bourles)

Gamétogenèse

Suivi biométrique et histo aux périodes clés (S. Pouvreau, Y. Bourles, AG)

Méthode ELISA (à confirmer)

État énergétique

Scope for growth (filtration, biodéposition, absorption, respiration) (SP, YB, DT, MAB)

Force musculaire (P.G. Fleury, mais date incertaine)

Activité enzymatique

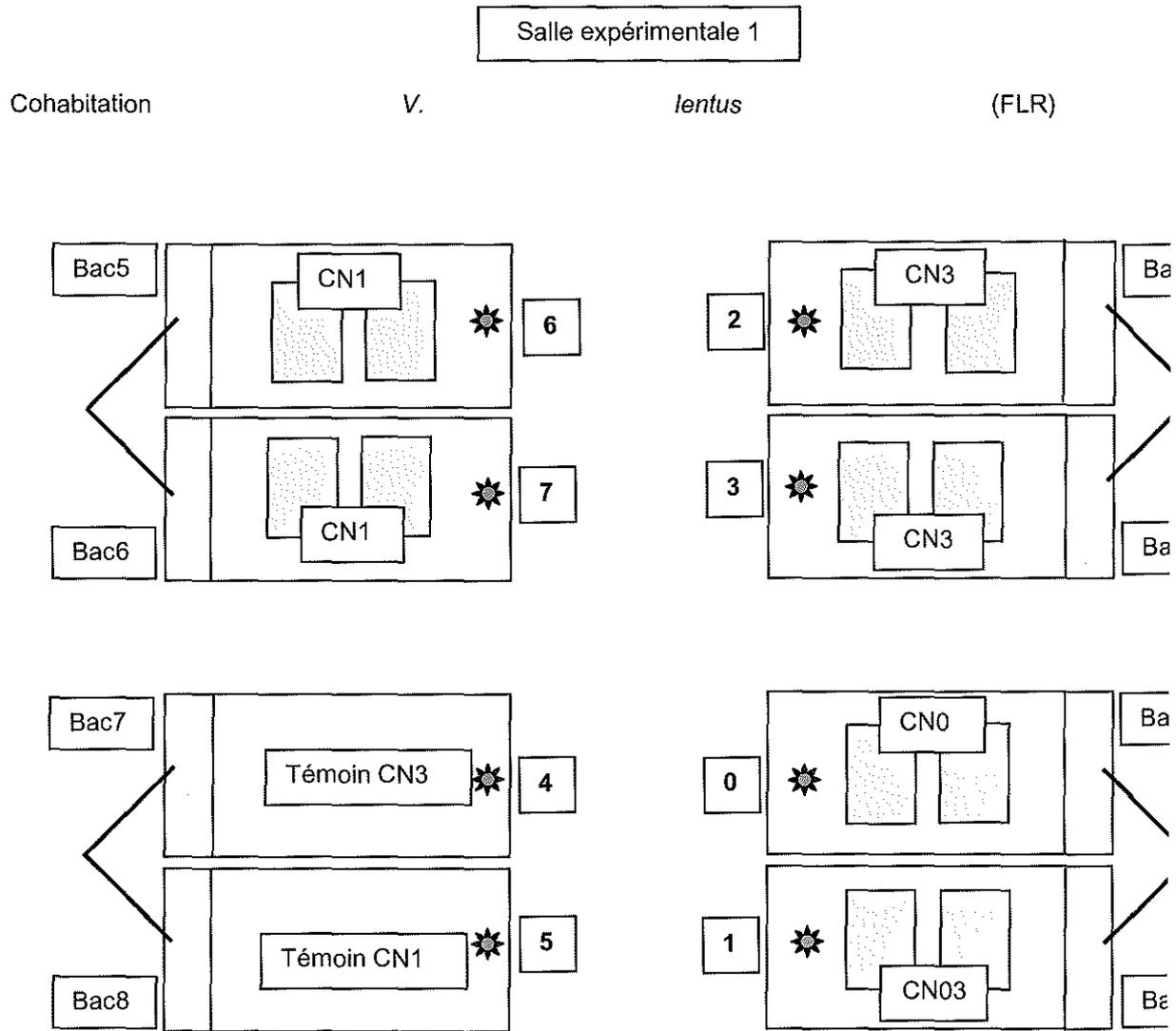
Activité amylasique (à confirmer)

Allocation de matière (en fonction taille de naissain)

Allocation soma/gonade par isotopie naturelle ($\delta^{13}\text{C}$) probablement impossible sur naissain (SP, YB). Allocation générale possible.

État microbiologique

Inventaire floristique en cas de mortalités significatives (J.L. Nicolas, M. Garnier)



Légende :

- CN0 : Cycle saisonnier de Température / Niveau Trophique 0
- CN1 : Cycle saisonnier de Température / Niveau Trophique 1
- CN3 : Cycle saisonnier de Température / Niveau Trophique 3
- : Point de prélèvement de MAREL-Argenton pour suivi horaire de Température, Salinité, Oxygène, pH, Turbidité, Chlorophylle a, Phosphate, Nitrates, Silicates.

Paramètres zootechniques :

- Thermopériode saisonnière (réf : Bassin de Marennes Oléron)
- Photopériode saisonnière
- Salinité : 36 ‰
- Oxygène : Saturation
- Apport Journalier de nourriture : CN0 : 2 % / CN1 : 4% / CN3 : 12% gPs⁻¹ algues / gPs⁻¹ chair d'huîtres soit approx. 2 / 5 / 15 µg.l⁻¹ chlo a.
- Composition pondérale du mélange :
 - 50 % *Isochrysis aff. galbana* Clone T Iso
 - 25 % *Chaetoceros calcitrans*
 - 25 % *Skeletonema costatum*
- Renouvellement EDM : 0.5 l h⁻¹ gPs⁻¹
- Volume utile par huître : 2.5 l gPs⁻¹

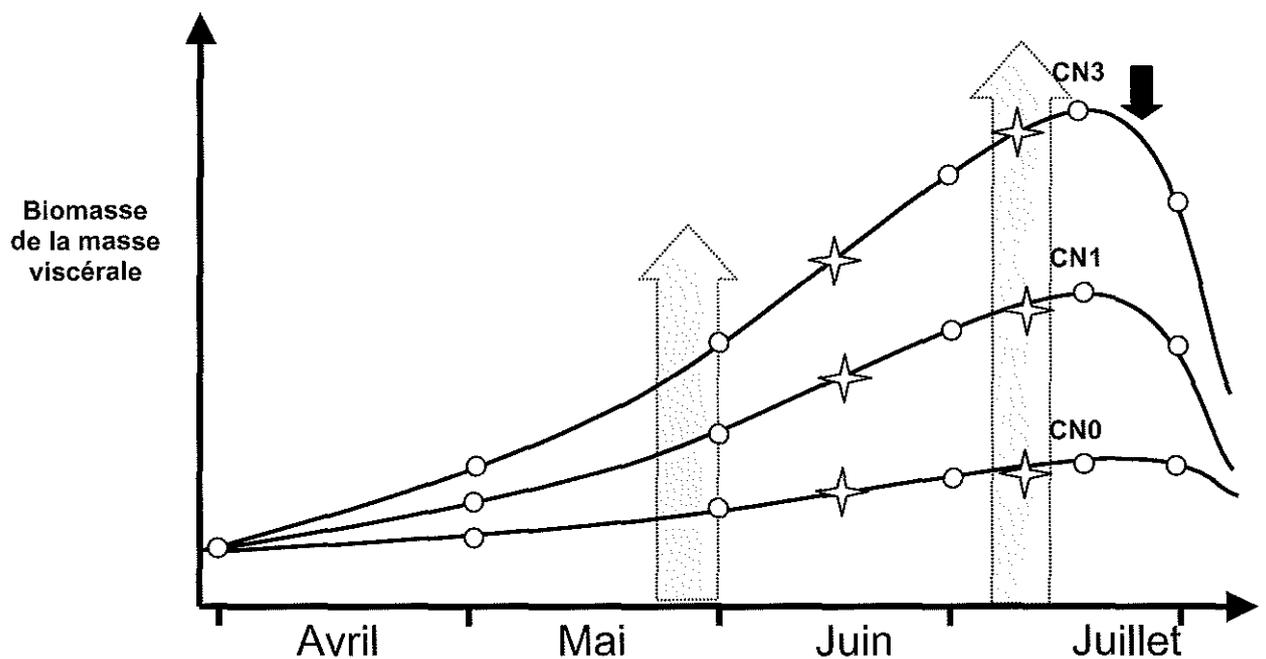


Figure 2 : Déroulement temporel de l'expérimentation. Les ronds blancs indiquent les points de relevements du suivi temporel (Biométrie, Histologie, SFG, n=30-40 et Force musculaire n=20), la flèche noire indique le déclenchement de la ponte, la ligne pointillée la limite des 19 °C, l'étoile blanche les infections expérimentales par *V. lentus* (n=240). Les flèches grises indiquent les deux expérimentations de mesures du métabolisme respiratoire vs température.

Dates proposées pour le suivi :

- T0 : 1 avril 2004
- T1 : 1 mai 2004
- T2 : 1 juin 2004
- T3 : 1 juillet 2004
- T4 : 15 juillet 2004
- T5 : 30 juillet 2004 (post ponte)

Liste des actions des contributeurs

pour l'instant, 3 laboratoires ifremer : DRV/RA/UMR/PE2M, DRV/RA/LGP, DRV/RA/LCB

- Gestion zoo et phytotechnique,
- Croissance générale, Biométrie invasive, Gamétogenèse,
- État énergétique,
- Activité enzymatique,
- Allocation de matière (Isotope),
- État microbiologique.

Résultats attendus

En bioénergétique

Confirmation d'une détresse physiologique d'ordre bio-énergétique en période de gamétogenèse sur du naissain.

Caractérisation des conditions exogènes propices à la mortalité sur du naissain.

Relation métabolisme respiratoire / gonadogénèse pour différentes températures sur du naissain (respiration vs gonadogénèse / vs température).

En microbiologie

Inventaire des pathogènes éventuels

Vérification de la sensibilité en présence de *V. lentus*

Bibliographie

Pouvreau S., S. Pierre, M. Enriquez, P. Le Souchu, J.P. Connan, B. Le Roy, C. Mingant (2002). Analyse bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition contrôlée : implication dans le syndrome des mortalités estivales. Rapport Intermédiaire de Contrat; Programme Morest. Ifremer Brest, DRV/RA/LPI. 56 p.

Fleury P.G., & Gaillard N. (2001). Application de la Force musculaire des huîtres au programme Morest. Journées Morest, Ifremer, Nantes, printemps 2001.

Fleury P.G., Mazurié J., Bouget J.F. & Vollen T. (2001). Comparaison de tests physiologiques simples d'estimation de la "vitalité" de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Journées conchylocoles Ifremer, Nantes 4-5 avril 2001.

Soletchnik P., D. Razet, P. Geairon, N. Faury, P. Gouletquer (1997) Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour* 10, 177-185.

Mori K (1979) Effects of artificial eutrophication on the Metabolism of the Japanese Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361-369

Bougrier S., P. Geairon, J.M. Deslous-Paoli, C. Bacher, G. Jonquières, (1995). Allometric relationships and effects of temperature on clearance rate and oxygen consumption of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134 : 143-154.

Pouvreau S., M. Enriquez-Diaz, P. Le Souchu, J.P. Connan, B. Le Roy, C. Mingant, J. Moal, M. Delaporte, J.R. Le Coz, J.F. Samain (2003) Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas* : experimental approach. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA.

Ren JS, AH Ross (2001). A dynamic energy budget model of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Ecol. Modelling* 142, 105-120.

Kooijman S.A.L.M (2002) Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological System. Cambridge Univ. Press. 424 pp

Besoins spécifiques pour LGP (FLR) :

Injection CN1, CN2, CN3 par vir- (125) vir+ (31+32)

CN1: 15 animaux * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 60 animaux

CN2: 15 animaux * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 60 animaux

CN3: 15 animaux * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 60 animaux

Mise en cohabitation avec CN1, CN2, CN3

inj CN1: 15 CN1, 15 CN2, 15 CN3 * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 180 animaux

inj CN2: 15 CN1, 15 CN2, 15 CN3 * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 180 animaux

inj CN3: 15 CN1, 15 CN2, 15 CN3 * 2 pools bacteries * 2 aquariums= 180 animaux

Soit si on fait la manip une fois au mois de juillet besoin de 240 animaux de chaque conditionnement
Soit le double si c'est possible (soit juin, juillet)

Besoins spécifiques pour LCB (PGF)

Mêmes animaux que CEA (n=20) si CEA est faite

Sous-tâche 3.2.2 - Energétique et température, conditions limites. Expérimentation pluridisciplinaire (VALI)

Les résultats acquis au cours des exercices précédents du programme Morest ont permis de proposer un modèle explicatif des mortalités estivales. Ce modèle montre, chez les huîtres, l'apparition d'un déséquilibre énergétique au cours de l'été, pendant la période de maturation, déséquilibre accentué autour de 19°C et d'autant plus prononcé que le niveau trophique est élevé. L'objectif de VALI est de confirmer, sur des animaux sélectionnés comme résistants "R" ou sensibles "S", amenés à maturité et à 19°C, si ce déséquilibre énergétique peut à lui seul expliquer les mortalités ou si la conjonction de ce déséquilibre et d'un stress «standard» et/ou d'une infection bactérienne est nécessaire.

Aujourd'hui, le ou les stress provoquant les mortalités estivales n'est pas identifié. Cependant la proximité du sédiment est un facteur aggravant. Bien qu'aucune anoxie n'ait été signalée, un relargage de sulfures et d'ammoniaque est noté au moment des mortalités. Le stress choisi est une hypoxie chronique pour représenter cette situation d'un micro-environnement défavorable pour l'efficacité de respiration des huîtres.

Matériel et méthodes

Des animaux de 18 mois SD3 "R" et "S", normalement en gamétogénèse active, élevés à Auray seront transférés début juin en éclosérie à Argenton. Après une période d'adaptation de 15 jours à 19°C, 4 lots seront constitués pour chaque catégorie "R" et "S" : 2 lots témoins avec ou sans antibiotique, 2 lots subissant un stress chronique journalier d'hypoxie de 4 heures avec ou sans antibiotiques. Deux expérimentations d'infection par cohabitation sont programmées : une première expérience à J3, 48h00 après le déclenchement du stress hypoxique, et à J14 après deux semaines. Ces deux expériences permettront d'évaluer la sensibilité à l'infection d'huîtres matures sélectionnées comme sensibles ou résistantes et ayant subi ou non un stress hypoxique.

Un suivi multiparamétrique (physiologie, immunologie cellulaire et moléculaire, bactériologie,...) des animaux maintenus à 19°C sera réalisé au début, à J3 et à J13 et permettra de mieux comprendre les phénomènes. Au cours de la deuxième infection, un suivi de l'immunologie et de l'expression de certains gènes sera effectué.

Un suivi des paramètres hydrologiques des bacs sera effectué régulièrement afin de contrôler l'application des conditions expérimentales de normoxie et hypoxie et d'enregistrer les paramètres nécessaires à l'évaluation d'un bilan écophysiological de la population dans le bac (Oxygène, turbidité, fluorescence chlorophyllienne, NH₄).

Les mesures de glucides, lipides et CEA permettront d'évaluer le coût énergétique du stress. L'analyse de l'expression de gènes (différentiel entre "R" et "S", métabolisme énergétique, respiratoire immunologie) conduira à identifier les voies métaboliques ou de défense les plus impliquées dans la réponse à l'hypoxie et à l'infection bactérienne.

Résultats attendus

- Estimer les compartiments énergétiques au cours de la période critique puis mesurer l'effet du stress hypoxique sur l'épuisement de ces compartiments, rechercher un lien entre leur niveau et la survie des lots "R" et "S",
- Estimer si une infection bactérienne est nécessaire,
- Description de l'effet d'un stress et d'une infection bactérienne sur l'expression de gènes préalablement caractérisés pour leur différentiel entre lots "R" et "S" (issus de la SSH réalisée en 2003) et de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- GPIA, UBO-LEMAR Plouzané : partage du matériel ARN

Sous-tâche 3.2.3 - Effet de la qualité de la ressource trophique

L'importance de la quantité de l'apport trophique sur les paramètres immunitaires de l'huître a été documentée au cours de plusieurs expériences dans le cadre de Morest et de la thèse de Mlle Maryse Delaporte. La qualité du régime alimentaire en particulier la composition en acides gras essentiels a été aussi reportée comme un élément régulateur du système immunitaire chez les vertébrés. Chez l'huître des régimes monoalgaux, fournisseur d'acides gras spécifiques ont modifié des paramètres immunitaires. Le rôle de l'EPA 20:5 (n-3) a été testé par supplémentation d'une émulsion à un régime algal (collaboration avec les US, Institute of Virginia, University of Portland) en 2003. Nous nous proposons en 2004 d'étudier le rôle de l'acide arachidonique 20:4(n-6) dans la réponse immunitaire.

Matériel et méthode

Des huîtres seront conditionnées avec l'algue T-iso déficiente en AA 20:4(n-6), supplémentée par un apport externe de cet acide gras.

L'efficacité du conditionnement sera vérifiée par l'analyse de la composition lipidique des membranes des branchies. Une analyse des eicosanoïdes sera effectuée pour comprendre leur implication dans la réponse immunitaire. L'évolution des paramètres immunitaires sera suivie à court (jours) et moyen terme (semaines).

Résultat attendu

L'évolution des paramètres immunitaires en fonction de la qualité des apports trophiques (acides gras) doit nous permettre de mieux appréhender les interactions entre environnement et système de défense des huîtres creuses.

Partenaires : UBO-LEMAR (équipe HIP) - Plouzané

Tâche 3.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

Effet de la nourriture sur la dynamique de constitution des réserves (RESERV)

Objectif

- Analyser la mise en réserve du glycogène et son utilisation au niveau cellulaire et moléculaire,
- Analyser l'effet de la disponibilité trophique de l'environnement sur le métabolisme du glycogène et plus largement des sucres,
- Analyser l'effet des réserves énergétiques sur la reproduction et la survie suivante.

Matériel et méthodes

Les animaux concernés par ces expérimentations sont des huîtres de 18 mois (ponte mars 2003), "R" et "S" dont la mise en poches et la mise sur site en baie des Veys (site Morest) s'effectueront début mars 2004.

Sur ces animaux, un conditionnement trophique sera réalisé. Deux conditions d'alimentation seront testées (lot à jeun et alimentation forte). Ce conditionnement aura une durée d'un mois et sera répété à 3 périodes de l'année (automne 2004, printemps et été 2005). Ces expérimentations seront réalisées dans le SYCAMAR du Syndicat Mixte de l'Équipement du Littoral (SMEL - J.L. Blin) en collaboration avec S. Pouvreau pour ce qui est des conditions d'alimentation à appliquer. Pour chaque expérimentation, un échantillonnage se fera au début et à la fin du conditionnement avec à chaque fois un point sur les animaux laissés sur estran en parallèle. Au cours des conditionnements, un suivi précis de la mortalité sera effectué par le SMEL.

Sur ces huîtres, le métabolisme glucidique sera mesuré à travers les mesures *in vitro* d'entrée du glucose et de stockage de glycogène, l'expression quantitative des gènes marqueurs de ce métabolisme (partenariat avec A. Huvet) et enfin l'approche différentielle du protéome du tissu de réserve.

Prélèvements

- Dissection des tissus palpes et gonade-manteau dans chaque condition (alimentation + et alimentation 0) en parallèle aux prélèvements réalisés pour le cellulaire (bioessais, cryo),
- Conditions = Estran To, Estran Tfinal (30 jours), Condition Alimentation (+) Tfinal (30 jours), Condition Alimentation (0) Tfinal (30 jours) et ce réparti sur 3 périodes de l'année (octobre 2004, avril et juin-juillet 2005).

Résultats attendus

- Déterminer l'impact des conditions trophiques sur les inversions du métabolisme glucidique observées de façon saisonnière chez l'huître,
- Analyser l'effet de l'apport trophique sur le métabolisme des sucres, sur la régulation des gènes et des enzymes impliqués dans ce cycle,
- En fonction des saisons, rechercher des voies préférentielles d'apport de glucose en fonction de la quantité de nourriture disponible dans l'environnement,
- Rechercher des liens entre quantités de réserves en glycogène, survie et reproduction suivantes.

Calendrier d'exécution des tâches

- Mars 2004 : Mise sur site (baie des Veys, site Morest) des huîtres concernées.
- Octobre 2004 : conditionnement trophique automnal, durée 1 mois.
- Avril 2005 : conditionnement trophique printanier, durée 1 mois.
- Juillet 2005 : conditionnement estival, durée 1 mois.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Université de Caen LBBM : responsabilité de cette Tâche, analyse cellulaire et protéique,
- SMEL Normandie : réalisation des conditionnements trophiques.

Tâche 3.5 - Modèle d'infection

Sous-tâche 3.5.1 - Testage précoce en raceways en béton de naissain "S" et "R" en fonction du mode de nursage (BETON)

Objectif

Rechercher les gènes différentiellement exprimés (dans ceux identifiés par SSH en 2003) entre lots "R" et "S" juste avant (et pendant) un épisode de mortalité estivale (technique utilisée: macro-arrays) pour aider à identifier (1) les bases fonctionnelles du différentiel R/S et (2) les mécanismes physiologiques déréglés amenant à la mort estivale.

Matériel prévu dans le cadre de programme EU Genefirst pour screening sur micro-array et/ou réalisation de SSH.

Rechercher les causes de mortalité des juvéniles.

Matériel et Méthodes

- Juvéniles "R" et "S" (G4SD), lots triploïdes "R" et "S" et lots diploïdes et triploïdes standard issus de 3 conditions différentes de nursage (intensif, semi-intensif et extensif)
- Prélèvements sur 1 point avant mortalité (dès la température de 19°C atteinte), 1 pendant (le jour ou les premières moribondes apparaissent) et 1 après mortalité (quelques jours après l'épisode de mortalité). Les prélèvements seront réalisés en individuel ainsi que les extractions d'ARNm pour ensuite réaliser des pools pour les analyses (prélèvement de 20 à 30 huîtres par conditions suivant disponibilité ; micro-dissections branchie, manteau, cœur, gonade, glande digestive, palpe, muscle sur des animaux vivants des lots "R" et "S" issus de la condition intensive ; prélèvements dans l'azote liquide valve supérieure ôtée pour les autres lots.
- Les lots "R" et "S" seront transférés à Brest vers la mi-juillet et placés dans des bacs de 30L à 20°. L'eau sera régulièrement renouvelée et ils seront nourris. Les mortalités seront notées quotidiennement. Les moribondes seront analysées en bactériologie. Elles seront conservées au congélateur pour des analyses d'herpès si besoin est (absence de bactérie).

Résultats attendus

- Comparer la physiologie des animaux "R" et "S" à l'état diploïde et triploïde au cours de la période critique amenant aux mortalités estivales
- Recherche et identification (1) des bases fonctionnelles du différentiel R/S et (2) des mécanismes physiologiques déréglés amenant à la mort estivale.
- Mieux connaître le rôle des bactéries dans le déclenchement ou si les huîtres meurent lorsqu'elles sont protégées par un antibiotique

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LGP - La Tremblade : production des lots puis réalisation de l'expérimentation en bassins bétonnés.
- Ifremer - DRV/RA/LCPL - Bouin : nursage et conditionnement trophique des lots.
- GPIA : prélèvements communs et partage du matériel ARN, réalisation de macro et micro arrays en communs.

WP5 - Synergie REPAMO-MOREST

Rappel :

Les données depuis 2001 montrent la présence fréquente de bactéries chez les huîtres moribondes. Autant en structures fermées (Ecloseries, Nurseries), les bactéries opportunistes sont quasi-systématiques autant en milieu ouvert seule en la baie des Veys ces bactéries virulentes sont retrouvées. Dans les autres cas on se trouve en présence :

- soit d'un grand nombre de souches de bactéries sans dominance de l'une d'entre elles. Dans ce cas il est probable que ce n'est qu'un envahissement par des souches banales. Les infections expérimentales confirment leur faible virulence voire leur absence de virulence,

- soit d'une faible charge bactérienne ou d'une quasi-absence de bactéries.

Enfin dans les huîtres saines des lots en cours de mortalité comme des autres la situation est contrastée : elles hébergent généralement dans leur hémolymphe des bactéries mais à des quantités ne dépassant 10^5 Bact/ml. Elles ne révèlent généralement rien d'une mortalité en cours ou récente, excepté dans quelques rares cas.

Objectifs

Continuer à quantifier et à faire l'inventaire des bactéries qui se développent dans l'hémolymphe des huîtres moribondes pour les huîtres des expérimentations Morest. Pour les huîtres des professionnels, le REPAMO prend en charge les analyses bactériologiques.

Conserver les tissus mous au congélateur pour une analyse éventuelle d'herpès.

Méthodes

Dans la mesure où des huîtres (moribondes de préférence) de lots en cours de mortalité seront envoyées, des analyses bactériologiques de l'hémolymphe seront effectuées. La détection du virus herpès chez les juvéniles pourrait se faire ultérieurement sur les tissus conservés au congélateur.

WP6 - Caractérisation de l'environnement

Tâche 6.3 - Modélisation

Sous-tâche 6.3.2 - Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (thèse 2005)

Objectif

Allocation et bilan d'énergie sont déterminants pour la croissance et la survie de l'huître creuse et dépendent des conditions environnementales propres à chaque site Morest (Marennes-Oléron, baie des Veys et rivière d'Auray). Par ailleurs, les modèles déjà existants sont limités par leur domaine d'application et/ou ne distinguent pas les processus de gamétogenèse/croissance. Les concepts des modèles de croissance basés sur une équation de bilan énergétique sont bien connus (e.g. Barillé et al., 1997 ; Grant et Bacher, 1998 ; Ren et Ross, 2001). Leur limitation apparaît à 2 niveaux. Ils sont en général dépendant du site et difficilement applicables de manière générique sans modifier la paramétrisation, voire la formulation des lois d'écophysiologie. Par ailleurs, leur formulation est bien souvent trop complexe et disproportionnée : par exemple, la physiologie de la nutrition est particulièrement détaillée, alors que celles de la respiration ou de l'allocation sont négligées. Enfin, certains processus n'ont été que peu étudiés expérimentalement et la formulation mathématique est liée à l'application de concepts insuffisamment validés ou tirés de la littérature existante sur d'autres espèces - c'est le cas notamment (1) de la gamétogenèse et des lois d'allocation d'énergie, (2) de la physiologie respiratoire et du coût de la défense immunitaire et (3) des différentes sources de nourriture potentielle. La connaissance de ces lois est pourtant cruciale pour la compréhension, la prédiction de la croissance générale et de l'état physiologique (prédiction de période critique).

L'objectif de cette tâche, qui a démarré en 2003, vise dans un premier temps à créer une dynamique permettant, à terme, la construction d'un modèle générique chez l'huître creuse, puis chez les mollusques bivalves.

Réalisation en 2003

L'année 2003 a donc permis de créer cette dynamique. Tout d'abord, en interne Ifremer, un atelier de sensibilisation à la modélisation et de formation à un logiciel (STELLA) a été mis en place en novembre 2003. Il a permis en outre de faire le point sur les modèles existants en bioénergétique des mollusques filtreurs. Cet atelier a été également ouvert aux participants du PNEC sur la capacité trophique de la baie du Mont Saint-Michel, qui ont des actions de modélisation concernant l'écophysiologie et la croissance des filtreurs cultivés et sauvages en relation avec les conditions trophiques.

Réalisation en 2004

Ensuite en externe, un deuxième atelier a vu le jour (**mars 2004**). Piloté par M. Alunno-Bruscia, il a consisté en une première rencontre franco-néerlandaise avec des chercheurs du NIOZ travaillant sur les modèles bioénergétiques. Cet atelier a permis de mettre en évidence l'énorme intérêt qu'il y a à développer des modèles bioénergétiques de type kappa modèle (Kooijman, 2000).

Une deuxième rencontre est prévue pour septembre 2004, à Texel au Pays Bas.

Enfin, et afin de concrétiser cette démarche de modélisation générique pour les années 2004-2007, une demande de bourse de thèse Ifremer sur cette problématique a été effectuée en novembre 2003. Si cette demande est acceptée, cette thèse devrait démarrer en décembre 2004 et constituera le moteur de cette tâche.

Barillé L., Héral M., Barillé-Boyer A.-L., 1997. Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquat. Living Resour.*, 10, 31-48.

Grant J., Bacher C. 1998. Comparative models of mussel bioenergetics and their variation at field culture sites. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219 (1-2), 21-44.

Kooijman S.A.L.M., 2000 . Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge Univ. Press. 424 p.

Ren J.S., Ross A.H., 2001. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling*, 142,105-120.

Annexe - Sujet de la Thèse GENERIC :

Conception et mise en application d'un modèle générique de croissance, de gamétogenèse et de survie de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*)

Generic

Generic model of ENERgetics In *Crassostrea gigas*

Plusieurs modèles déterministes de croissance des mollusques bivalves, développés au cours de ces dix dernières années, existent dans la littérature (e.g. [1], [2], [3], [4]). Ces modèles, basés sur un budget d'énergie dynamique, concernent généralement des bivalves cultivés et reposent sur une équation de bilan énergétique intégrant des lois d'écophysiologie pour les fonctions de nutrition et de respiration. Certains d'entre eux possèdent une formulation des lois d'allocation permettant une prédiction différentielle de la croissance somatique, gonadique voire coquillière (e.g. [3]). Sur un plan scientifique, ces modèles permettent d'améliorer et de vérifier notre connaissance du fonctionnement d'un bivalve. Sur un plan pratique, ils servent à prédire les performances de croissance de

bivalves en fonction de l'évolution du milieu environnant. Ces modèles peuvent être utilisés seuls, ou en adéquation avec des modèles plus globaux à l'échelle d'un élevage, voire d'un écosystème.

L'intérêt de tels modèles est indéniable, mais il ressort d'une façon générale qu'ils sont très sensibles, et que leurs prédictions sont généralement spécifiques aux sites d'étude. En d'autres termes, leur caractère générique n'est pas fonctionnel. En ce qui concerne l'huître creuse *Crassostrea gigas*, ce caractère générique fait cruellement défaut dans de nombreuses thématiques de recherche. Ce constat ressort notamment lors de la «Formation en modélisation destinée aux écophysiologistes» organisée au CREMA du 17 au 20 novembre 2003. Un besoin de modèle générique a été clairement exprimé, aussi bien pour des aspects d'écologie et d'écophysiologie (DRV) que pour des aspects d'écotoxicologie et de bio-accumulation (DEL).

Au niveau européen, l'intérêt et le besoin d'un modèle générique a été formulé en mai 2003 au travers d'un projet de collaboration scientifique bilatérale avec le NIOZ (Royal Netherlands Institute of Sea Research) dans le cadre d'un Plan d'Action Intégré franco-néerlandais (PAI Van Gogh). Le projet proposé intitulé «DEBIB» (Dynamic Energy Budgets in Bivalves) vise à élaborer un modèle générique de croissance et de reproduction de bivalves marins, basé sur un budget dynamique d'énergie (modèle DEB) intégrant un ensemble de fonctions écophysiologiques. Le présent sujet de thèse a été inscrit dans le cadre de ce PAI financé par le Ministère des Affaires Etrangères pour le côté français.

Dans le cadre du défi Morest et du chantier PNEC sur la Capacité trophique de la baie du Mont Saint-Michel et du Programme sur la maîtrise des écloséries, il est nécessaire de comprendre et de quantifier les relations entre les conditions environnementales et les performances de croissance, de gamétogenèse et de survie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* pour répondre aux questions suivantes :

- Déficit énergétique et affaiblissement en période estivale sur les côtes françaises (Morest),
- Variabilité des performances de croissance en baie du Mont Saint-Michel (PNEC),
- Optimisation du conditionnement des géniteurs en éclosérie (Maîtrise des écloséries).

Dans le cadre de ses différents projets, l'application des modèles existants (e.g. [1], [4]) reste problématique et les simulations fournissent des résultats aberrants, en parti liés à une formulation insuffisante des processus liés à la gamétogenèse, au métabolisme respiratoire et à l'utilisation des sources de nourriture (voir «Formation en modélisation destinée aux écophysiologistes», CREMA L'Hourmeau, 17-20/11/2003).

Il s'agit donc de réaliser pour la première fois chez *Crassostrea gigas* un modèle générique dont le rôle sera de contribuer à plusieurs thématiques et programmes de recherche, qui concernent aussi bien la conchyliculture que l'étude de l'environnement. Ce modèle sera utilisé entre autre dans la thèse sur la modélisation de la production primaire en baie des Veys, demandé en parallèle. Il bénéficiera d'un cadre scientifique européen par le biais d'un PAI Van Gogh 2004-2005.

Etat de l'art

Les concepts des modèles de croissance basés sur une équation de bilan énergétique sont bien connus (e.g. [1], [2], [3], [4]). Leur limitation apparaît cependant à deux niveaux : ils sont en général dépendants d'un site, et difficilement applicables de manière générique sans en modifier la paramétrisation, voire l'expression mathématique des lois d'écophysiologie. Par ailleurs, leur formulation est bien souvent trop complexe et disproportionnée : par exemple, la physiologie de la nutrition chez *Crassostrea gigas* est particulièrement détaillée, alors que celles de la respiration ou de l'allocation sont négligées. Enfin, certains processus n'ont été que peu étudiés expérimentalement et la formulation d'équations est liée à l'application de concepts insuffisamment validés ou tirés de la littérature existant sur d'autres espèces. C'est le cas notamment 1/ de la gamétogenèse et des lois d'allocation d'énergie, 2/ de la physiologie respiratoire et du coût de la défense immunitaire, 3/ de la nutrition à partir d'autres sources de nourriture que le phytoplancton. Il est naturel de penser que des lois physiologiques relativement robustes gouvernent le groupe des bivalves, et qu'un modèle générique au moins au sein du même espèce soit réalisable (e.g. [5]).

Pour élaborer un modèle plus approprié, nous nous baserons sur une approche de budget dynamique d'énergie en utilisant le modèle DEB développé par Kooijman ([6]). Ce modèle permet de quantifier les flux et l'allocation d'énergie à l'intérieur d'un individu pendant son cycle de vie. Par rapport à d'autres modèles, le DEB présente plusieurs avantages : i/ il est applicable à différentes espèces ; ii/ c'est un modèle mécaniste et dynamique qui repose sur des principes simples, et iii/ qui ne comporte qu'un nombre restreint de paramètres. Enfin, il a déjà été validé pour comparer différentes espèces de poissons plats, et plus récemment de bivalves.

[Barillé L., Héral M., Barillé-Boyer A.-L., 1997. Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquat. Living Resour.* 10 : 31-48.

Grant J., Bacher C. 1998. Comparative models of mussel bioenergetics and their variation at field culture sites. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219 : 21-44.

Pouvreau S., Bacher C., Héral M. 2000. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia. *Aquaculture* 186 : 117-144.

[Ren J.S., Ross A.H., 2001. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecol. Model.* 142 : 105-120.

Lefebvre S., Pomarède M., 2003. Modèle conceptuel et mathématique d'un système intégré d'aquaculture marine associant poissons, microalgues et mollusques-bivalves, étudié dans le programme GENESIS. Phase 1 : Simulation théorique en vue d'une validation expérimentale. Rapport de contrat UCBN-IFREMER n° 01/5 210 767, 29 p.

Kooijman, S.A.L.M. 2000. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge University Press, Cambridge.

Cardoso, J.F.M.F., van der Meer, J., van der Veer, H.W. 2001. Interspecies comparison of energy flow in some North Atlantic bivalve species by means of dynamic energy budgets. *ICES, CM* 2001/J :43, 23 p.

Programme envisagé

A1 - Synthèse bibliographique des lois, des fonctions écophysologiques, et des modèles bioénergétiques chez les bivalves. Analyse générale des modèles bioénergétiques dans le règne animal,

A2 - Synthèse des données de milieu, de croissance, de gamétogenèse sur différents sites (naturel, contrôlé) disponible à l'Ifremer,

B - Études expérimentales complémentaires en écophysologie en mettant l'accent sur les lacunes identifiées notamment en terme d'allocation énergétique,

C - Conceptualisation, modélisation et validation du modèle générique de croissance et de gamétogenèse en différents sites d'élevage ; connexion avec la thèse modélisation baie des Veys.

D - Applications pour les programmes Morest, PNEC et Maîtrise des écloséries.

| | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 |
|----------------|------|------|------|------|
| Étapes A1 + A2 | | | | |
| Étape B | | | | |
| Étape C | | | | |
| Étape D | | | | |

Résultats attendus

- Modèle générique d'allocation énergétique entre soma, reproduction, coquille chez l'huître creuse.
- Prédiction de la croissance, de la reproduction et de l'état physiologique des huîtres en fonction des conditions trophiques et environnementales en relation avec les mortalités estivales. Prédiction de période(s) critique(s).
- Incorporation du modèle huître dans les modèles d'écosystème Marennes-Oléron, baie des Veys (Morest, thèse demandée conjointement à cette demande), baie du Mont Saint-Michel (PNEC).
- Application du modèle à d'autres écosystèmes : Thau, Arcachon et milieu contrôlé (Argenton, Bouin), Mer de Wadden.
- Application aux problèmes de bio-accumulation (collaboration avec la DEL).

Responsables es scientifiques Ifremer et directeur de thèse (si différents)

- Directeur de Thèse : P. Gouletquer (Ifremer - DRV/RA/LGP, La Tremblade)
- Responsables scientifiques: M. Alunno-Bruscia (Ifremer - CREMA/L'Houmeau) & S. Pouvreau (Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M/Argenton)
- Comité de thèse : C. Bacher (Ifremer/DEL/EC), Y.-M. Paulet (UBO-LEMAR), H.W. van der Veer (NIOZ), A. Gangnery (Ifremer - DEL/DRV/RA/LERN)

Laboratoire d'accueil

Ifremer - CREMA l'Houmeau(<http://www.ifremer.fr/crema/>)
Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M/Argenton (<http://www.ifremer.fr/drvrapi/>)

Programme de rattachement

- Morest (projet Ifremer sur l'Etude des Mortalités estivales d'huîtres creuses en France <http://www.ifremer.fr/com/communiqués/05-12-03-morest.htm>)
- PNEC et projet de restructuration conchylicole de la baie du Mont Saint-Michel
Programme d'Action Intégrée Van Gogh 2004-2005 (collaboration bilatérale franco-néerlandaise)
Maîtrise des écloséries (projet Ifremer)

Collaborations étrangères

NIOZ (Royal Netherlands Institute for Sea Research, Pays-Bas; <http://www.nioz.nl/>)

Cofinancement envisagé (ou possible)

Région Poitou-Charentes

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison "R" et "S" au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles "R" et "S" au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités "R" et "S" versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois "R" et "S" SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2SINH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte "R" & "S"</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression "R" et "S" (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites ("R" et "S" 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| <i>- VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| <i>- VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| <i>- VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Effet de la qualité de la ressource trophique | 3.2.3 | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |

| | | |
|---|-------|--|
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>"R". et "S". gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques ("R" "S" 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| <i>Juveniles</i> | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles "R" S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP5. Synergies REPAMO – MOREST - REMORA | | |
| Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes | 5.1 | |
| <i>Mortalités déclarées chez les professionnels</i> | 5.1.1 | |
| <i>Mortalités intervenues dans le cadre de MOREST</i> | 5.1.2 | |
| <i>REMORA</i> | 5.1.3 | |
| Epidémiologie des pratiques culturelles | 5.2 | |
| WP6. Caractérisation de l'environnement | | |
| Recensement de données physiologies associées à différents sites | | |
| Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites | 6.1 | |
| <i>Estimation des débits et des flux des bassins versants :..... (voir 2.2.1)</i> | | |
| <i>2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i> | | |
| <i>Complément débits, MO et pesticides particulières issus des bassins Versants en BDV</i> | 6.1.1 | |
| Acquisition de données | 6.2 | |
| <i>Herbicides sédiment oulet particulière comparatif eau</i> | 6.2.1 | |
| <i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i> | 6.2.2 | |
| <i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?, (Phyto/phytobenthos</i> | 6.2.3 | |
| <i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i> | 6.2.4 | |
| <i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9</i> | | |
| <i>Biodépôts BDV</i> | 6.2.5 | |
| <i>Biocénose BDV</i> | 6.2.6 | |
| Modélisation | 6.3 | |
| <i>Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle</i> | 6.3.1 | |
| <i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.2 | |
| <i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.3 | |
| WP8. Gestion et organisation du projet | | |
| Coordination | 8.1 | |
| Gestion financière du projet | 8.2 | |
| Bilan, programmation, rapports et publications | 8.3 | |
| Evaluation | 8.4 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WPI Tâches | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1.2 Physiologie | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 Pathologie | | | | | | | | | | | | |
| 2.6 FORMER-04 | | | | | | | | | | | | |
| 2.7.DYNAMAURAY | | | | | | | | | | | | |
| 2.9.DUNBDV | | | | | | | | | | | | |
| 3.1.1.GIGA Repro 2003 | | | | | | | | | | | | |
| 3.2.1 Giga Repro 2004 | | | | | | | | | | | | |
| 3.2.2.VALI | | | | | | | | | | | | |
| 3.2.3.Source trophique | | | | | | | | | | | | |
| 3.4. RESERV | | | | | | | | | | | | |
| 3.5. BETON | | | | | | | | | | | | |
| WP 5 Diagnostic | | | | | | | | | | | | |
| WP 6 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003)

Publication avec comité de lecture

Huvet A., C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, J.F. Samain and J. Moal (2003) Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* **228**, 321-333.

Sellos D., J. Moal, L. Degremont, A. Huvet, J.Y. Daniel, S. Nicoulaud, P. Boudry, A. Van Wormhoudt et J.F. Samain (2003) Structure and polymorphism of the amylase genes in the oyster *Crassostrea gigas* : Tissues specific expression and allelic polymorphism as population genetic markers. *Mar. Biotech* **5**, 360-372.

Communications pour colloque ou groupe de travail

Bacca H., C. Fabioux, J.Y. Daniel, S. Pouvreau, J. Moal, J.F. Samain et A. Huvet (2003) Le métabolisme énergétique du glycogène : recherche de marqueurs moléculaires pour l'étude des relations entre réserves, cycle reproducteur et survie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Journées Conchylicoles 2003, 12-13 avril 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 6.

Bacca H., A. Huvet, J.Y. Daniel, J. Moal et A. Van Wormhoudt (2003) Expression saisonnière des gènes du métabolisme des sucres chez *Crassostrea gigas*. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Barret J. (2003) L'aquaculture, une source de protéine pour demain ? Conférence au Palais de la Découverte. 12 avril, Paris., France.

Brizard R., P. Boudry, R. Robert, S. Pouvreau, G. Maise, C. Labbé, J.L. Roger et P. Haffray (2003). Optimisation et standardisation d'une méthode de cryopréservation des spermatozoïdes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Journées conchyliques, 12-13 mars 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 17.

Dégremont L., E. Bédier, P. Soletchnik, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain et P. Boudry (2003) Mortalités estivales et croissance du naissain de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude de familles sélectionnées. Journées Conchyliques, 12-13 avril 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 2.

Dégremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bédier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal and J.F. Samain, Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 327.

Delaporte M. (2003) Experimental approach of the summer mortality in *Crassostrea gigas*. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Delaporte M., J. Moal, P. Soudant, C. Lambert, S. Pouvreau, M. Enriquez, L. Dégremont, P. Soletchnik, B. Gagnaire and M. Ropert and al (2003). Impact of environmental and nutritive conditions on defence mechanisms of oysters during an annual cycle. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal Shellfish research*, **22** (1), 327.

Delaporte M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quéré, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard and J.F. Samain (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Abstract in *The journal of Experimental Biology*, **206**.

Delaporte M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, F.L. Chu, C. Langdon et J.F. Samain (2003) Relation entre nutrition et immunologie chez deux espèces de bivalves : l'huître *Crassostrea gigas* et la palourde *Ruditapes philippinarum*. Congrès GERLI 2003 "Diversité moléculaire et physiopathologies" du 2 au 5 septembre 2003, Paris, France.

Fu-lin E. Chu and J.F. Samain (2003) An integrated approach to bivalve domestication : introductory remarks. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal Shellfish research*, **22** (1), 324.

Garcia C., I. Arzul, F. Berthe, B. Chollet, J.P. Joly, N. Kerdudou, L. Miossec, M. Robert and J.L. Nicolas (2003). Potential pathogens associated with abnormal mortalities. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal Shellfish research*, **22** (1), 331.

Gay M., G. Lancelot, B. Chollet, T. Renault, N. Cochenec, F. Berthe, F. Le Roux, P. Gouletquer, C. Lambert, G. Choquet, C. Paillard and M. Gouy (2003). Characterization of *Vibrio* isolated from *Crassostrea gigas* spat suffering from summer mortality outbreaks. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 331.

Géret F., B. Gagnaire, D. Ménard, T. Renault, A. Le Roux, J. Haure, G. Bocquené and T. Burgeot (2003) Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to pesticide exposition under experimental conditions. Congrès PRIMO, Mai 2003, Floride, USA.

Hégaret H., G. Wikfors, P. Soudant and J.F. Samain (2003) Algal food quantity and quality affect immune function in oysters stressed by high temperature. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal Shellfish research* **22** (1), 334.

Labreuche Y., M. Garnier et J.L. Nicolas (2003) Etude des facteurs de virulence de bactéries pathogènes d'huître. Journées Conchylicoles 12-13 mars 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 7.

Labreuche Y. (2003) Recherche de facteurs de virulence de *Vibrio* pathogènes de bivalves et modulation de leur expression en fonction de paramètres abiotiques. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Lambert C, P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnaire, A. Huvet and J.F. Samain (2003) Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 339.

Mathieu M, K. Costil, B. Dubois, C. Heude, A. Huvet, K. Kellner and S. Pouvreau (2003) Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in relation to physiological parameters. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 343.

Moal J., E. Bédier, P.G. Fleury, A. Langlade, Y. Le Coguc, L. Dégremont, P. Boudry, J.R. Le Coz, S. Pouvreau, M. Enriquez-Diaz, C. Lambert, P. Soudant and J.F. Samain (2003). Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 345.

Moal J. (2003) Modèle - Volet physiologie : Synthèse sur la reproduction et le bilan énergétique. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Nicolas J.L. (2003) Synthèse sur les pathogènes diagnostiqués chez les huîtres moribondes ou dans les lots en cours de mortalité. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Pouvreau S., M. Enriquez-Diaz, P. Le Souchu, J.P. Connan, B. Le Roy, C. Mingant, J. Moal, M. Delaporte, J.R. Le Coz and J.F. Samain (2003) reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas* : experimental approach. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 351.

Pouvreau S. (2003) An experimental approach of the summer mortality event in *Crassostrea gigas*. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Prudence M., A. Huvet, J.Y. Daniel, A. Van Wormhoudt, J. Moal et J.F. Samain (2003) Localisation et conditions de l'expression des gènes de l'amylase de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, conséquences de leur polymorphisme sur le phénotype. Journées Conchylicoles, 13-14 mars 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 4.

Samain J.F., P. Boudry, L. Dégremont, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, J. Moal, M. Mathieu, C. Lambert, J.M. Escoubas, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, T. Burgeot and C. Bacher (2003) Le soutien d'une filière aquacole par la recherche : l'exemple de la conchyliculture française et du programme MOREST (Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas*). Publication spéciale colloque DESANS 26/05-5/06/03 Noumea, Nouvelle Calédonie (sous presse).

Samain J.F., P. Boudry, L. Dégremont, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, J. Moal, M. Mathieu, C. Lambert, J.M. Escoubas, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault and T. Burgeot (2003) Les mortalités estivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (programme MOREST). Colloque Institut Océanographique. In « Récents progrès en recherche aquacole » Oceanis, le 18 avril 2003, Paris, France.

Samain J.F. (2003) Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* : questions physiologiques. Journées Conchylicoles, 12-13 mars 2003, Nantes, France, Livre des résumés, p 39.

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Degremont, E. Bedier, J.F. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, N. Faury, O. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire and J.F. Samain (2003) Characterisation of Summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 351.

Soletchnik P, M Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Dégremon, E. Bédier, J.F. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, N. Faury, O. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire and J.F. Samain (2003) Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France. Relation to environmental parameters. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA. Abstract in *Journal of Shellfish research*, **22** (1), 354.

Bacca H., A. Huvet, J.Y. Daniel, J. Moal, A. Van Wormhoudt (2003) Expression saisonnière des gènes du métabolisme des sucres chez *Crassostrea gigas*. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Delaporte M. (2003) Experimental approach of the summer mortality in *Crassostrea gigas*. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Huvet A. (2003) Développement de nouveaux outils : obtention d'EST chez *Crassostrea gigas* : résultats de banques soustractives entre familles résistantes et sensibles au cours d'un épisode estivale de mortalité. Journées Morest, 26-28 Novembre 2003, La Rochelle, France.

Dégremont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, P. Boudry (2002) Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). 7th World Congress on Genetics, 19-23 août 2002, Montpellier, France.

Dégremont L., J. Moal, J.Y. Daniel, P. Boudry, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, A. Huvet, S. Bougrier, J.F. Samain (2002) Catalytic and physiological traits associated to amylase gene polymorphism in *Crassostrea gigas* oyster under two trophic conditions. Annual conference of the European Society for Marine Biotechnology, 12-14 mai 2002, Nantes, France.

Delaporte M., J. Moal, J.F. Samain, P. Soudant, G. Choquet (2002) Effect of dietary fatty acid composition on lipid profiles of haemocytes membranes in oysters and clams and its impact on immune functions. 94th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2002, Mystic, Connecticut; USA (E110)

Haure J., A. Huvet (2002). Réponses biologiques de *Crassostrea gigas* dans un milieu hypoxique. Journées Ifremer, Morest, Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France.

Hégaret H., G.H. Wikfors, P. Soudant, M. Delaporte, J. Moal, J.F. Samain (2002) An experimental investigation of dietary fatty acids and sterols and the immunology of the American oyster, *Crassostrea virginica* : A well-fed oyster is a healthy oyster, n'est-ce pas ? 22th Milford Aquaculture seminar, February 2002. Milford, Connecticut. USA

Huvet A., J.Y. Daniel, P. Favrel, J. Moal, J.F. Samain (2002) Le métabolisme énergétique du glycogène : recherche de marqueurs moléculaires pour l'étude des relations entre réserves, cycle reproducteur et survie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. 126^{ème} congrès de la Société Zoologique de France, 16-18 septembre 2002, Plouzané, France. (Poster)

Huvet A., A. Van Wormhoudt (2002). Caractérisation moléculaire des enzymes-clés du métabolisme énergétique des sucres pour comprendre son rôle dans l'adaptation de *Crassostrea gigas*. Journées Ifremer Morest, Mortalité Estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France

Moal J., A. Huvet, M. Delaporte, J.F. Samain (2002) Présentation des résultats en physiologie. Journées Ifremer, Morest, Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France.

Nicolas J.L., M. Garnier, I. Arzul, T. Renault, M. Gay, F. Leroux (2002) Synthèse pathologie implication des pathogènes dans les mortalités. Journées Ifremer Morest, Mortalité Estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France.

Nicolas J.L., M. Garnier, M. Gay, F. Leroux (2002) Implication of pathogenic bacteria in summer mortality of oyster. 94th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2002, Mystic, Connecticut, USA.

Pouvreau S. (2002) Synthèse WP3 : Analyse des facteurs responsables des mortalités estivales de l'huître creuse, Approche expérimentale. Journées Ifremer Morest, Mortalité Estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France.

Pouvreau S., M. Delaporte, M. Enriquez, A. Huvet, C. Lambert, J. Moal, P. Soudant, J.P. Connan, B. Le Roy, P. Le souchu, C. Mingant (2002) Tâche WP 3.1. : Effet du niveau trophique sur l'état de santé de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Journées Ifremer Morest, Mortalité Estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France.

Samain J.F. (2002) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Environnement et actions 2002. Journées du Département Ressources Aquacoles, Thème écosystèmes, 17-18 juin 2002, La Tremblade, France.

Samain J.F., A. Huvet (2002) Présentation du défi Morest au Salon conchylicole, La Trinité sur Mer, France (Poster).

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Dégremon, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet, J.F. Samain (2002) Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. 94th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2002. abstract Journal of Shellfish research, **21 (1)** : 407. Mystic, Connecticut. USA

Mémoires d'étudiants (DEA, ISPA, IUT, Maîtrise, Ingénieurs)

Bacca H. (2003) Rapport Bibliographique. DEA Biologie et Productions animales, option Biologie aquacole, Université de Rennes 1, ENSAR - Sciences animales, 27 p.

Bacca H. (2003) Etude de l'expression des gènes du métabolisme du glycogène : intérêts pour l'étude des relations entre réserves, cycle reproducteur et survie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapport de stage, DEA Biologie et Productions animales, option Biologie aquacole, Université de Rennes 1, ENSAR - Sciences animales, 20 p.

Bacca H. (2002) Impact de la mortalité sur le polymorphisme des gènes de l'amylase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* au stade naissant. Maîtrise de Biologie des Organismes et des populations de l'Université de La Rochelle 20 p. + annexes.

Pierre S. (2002) Analyse bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition contrôlée : Implication dans le syndrome des mortalités estivales. Rapport de Diplôme Universitaire, Univ. Brest. 35 p

Rapports intermédiaires de contrat ou de convention

Pouvreau S. S. Pierre, M. Enriquez, P. Le Souchu, J.P. Connan, B. Le Roy, C. Mingant (2002). Analyse bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition contrôlée : Implication dans le syndrome des mortalités estivales. Rapport Intermédiaire de Contrat; Programme Morest, 56 p.

Samain J.F., A. Huvet, J. Moal et F. Dupé : Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Partie 1 : description des objectifs scientifiques, techniques et plan de travail. Programme général 2001-2005 et exercice 2002. Synthèse des propositions de l'ensemble des partenaires impliqués. 44p.

Samain J.F., A. Huvet, J. Moal et F. Dupé : Mortalité estivale de l'huître creuse *C.gigas* Partie 2 : description par workpackage. Programme général 2001-2002 et exercice 2002. Mars 2002. 90p

Samain J.F., A. Huvet, J. Moal, F. Dupé (2002) Morest : résumés des actions 2001 (Mai 2002) 60 p.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-----------------------|----------------|---------------------|
| Moal Jeanne | C | 9,0 |
| Nicolas Jean-Louis | C | 4,0 |
| Pouvreau Stéphane | C | 5,0 |
| Le Coz Jean-René | C | 9,0 |
| Huvet Arnaud | C | 9,0 |
| Garnier Matthieu | T | 5,0 |
| Quéré Claudie | T | 2,0 |
| Connan Jean-Paul | T | 5,0 |
| Quéau Isabelle | T | 6,0 |
| Le Souchu Pierre-Yves | T | 3,0 |
| Mingant Christian | T | 3,0 |
| Leroux Annick | T | 9,0 |

Université de Caen - LBBM

Adresse : LBBM, UNIVERSITE DE CAEN,
Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines (UMR/PE2M)
Physiologie et Ecophysiologie des mollusques marins

14032 CAEN CEDEX

Responsable : Michel MATHIEU

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé des actions dans le projet : WP2 et WP3

1 - Descriptif de l'activité

Le Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen, UMR Ifremer P2M s'engagera en 2004 dans la continuation de son implication dans le programme Morest par 2 types d'approches. La première s'applique à l'étude de la reproduction des huîtres "R" et "S" sur le site atelier de la baie des Veys (sous-tâches 2.2.2 et 2.2.7). La seconde vise à la caractérisation moléculaire des huîtres "R" et "S", fondée sur l'utilisation des outils mis au point les années précédentes (sous-tâches 3.4.1, 3.4.3 et 3.4.4).

Introduction

Ces 3 dernières années, nous avons réalisé un suivi histologique des huîtres issues des familles "R" et "S" en baie des Veys et à Auray. L'importance de l'échantillonnage réalisé et des travaux d'histologie qui en résulte n'a permis à l'heure actuelle qu'une exploitation partielle des données. Ce travail sera donc poursuivi en 2004. D'ores et déjà, certains points semblent validés, en particulier la caractérisation de quelques facteurs déterminants dans le déclenchement des phénomènes de mortalités : des données complémentaires sont nécessaires pour préciser les différences dans le déroulement des gamétogenèses entre les familles "R" et "S" dans des sites d'élevage très différents.

Grâce aux outils mis au point les années précédentes, nous pouvons en 2004 proposer une première approche de caractérisation moléculaire des familles "R" et "S". Plusieurs gènes candidats, caractérisés au laboratoire, impliqués dans des processus de régulation de la croissance, du développement, de la reproduction et du métabolisme énergétique seront testés. De même, plusieurs gènes impliqués dans les défenses cellulaires et les adaptations aux stress seront pris en compte de la même manière.

Pour ce qui concerne le métabolisme glucidique, support énergétique de l'effort de reproduction, des animaux des familles "R" et "S" seront soumis à deux niveaux trophiques (faible et élevé), et les expressions des gènes codant pour des transporteurs de glucose seront mesurées (en parallèle avec l'expression des gènes codant pour les enzymes-clefs étudiée à Ifremer Brest). Une approche protéomique viendra compléter cette étude.

Pour les gènes codant pour des facteurs de régulation, ils appartiennent aux familles des TGF β et de leurs récepteurs, des CHI-lectines, des récepteurs à la GnRH, et seront étudiés (mesure d'expression) sur des huîtres "R" et "S" élevées en baie des Veys. Plusieurs organes seront étudiés séparément.

En ce qui concerne la recherche d'information sur l'expression de gènes impliqués dans les adaptations au stress, et qui pourraient discriminer les "R" et les "S", nous avons sélectionné également des membres de la famille des TGF β (implication dans les défenses immunitaires), et le récepteur de la calcitonine (réponse au stress osmotique)

WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.2 - BERAY - Suite du traitement des données et acquisition de données complémentaires sur la reproduction de "R" et "S" (naissain et huîtres de 2^{ème} année) en baie des Veys

Sous-tâche 2.2.7 - DYNAMAURAY - Suivi intensif pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes-sédiment à Auray

Présentation

En 2001 et 2002 (respectivement, 2 et 3 dates), nous avons étudié, uniquement en baie des Veys, la reproduction de familles Morest "R" et "S" au stade naissain (histologie qualitative). En 2003 (5 dates), nos travaux d'histologie quantitative ont porté sur des pools "R" et "S" d'huîtres dans leur 2^{ème} année et placées à Auray et en baie des Veys (Tâche BERAY), 2 prélèvements ponctuels ayant, en outre, été réalisés sur du naissain d'Auray. **En 2004, le traitement de ces données doit être poursuivi et des informations complémentaires doivent être acquises.**

Matériel et Méthode

En 2004, notre matériel d'étude sera composé de pools des **2 classes d'âge** : naissain (G4R et G4S) et huîtres dans leur 2^{ème} année (indemnes de mortalités en 2003 ; G3R-IM et G3S-IM). Ces pools, placés **à Auray et en baie des Veys** (secteur de Géfosse), seront analysés en **histologie quantitative** après une étude biométrique et, dans le cas des huîtres de 2^{ème} année, de dissections. Sur des effectifs d'environ 20 individus par prélèvement, l'effort de reproduction et l'ampleur de la ponte et/ou résorption pourront être ainsi évalués. En complément, quelques prélèvements sur du naissain de captage naturel mis en baie des Veys sont envisagés à des fins d'histologie qualitative.

Résultats attendus

Les précédents résultats ont montré que le cycle de reproduction en baie des Veys (BDV) est retardé par rapport à Auray où les plus fortes températures de l'eau sont atteintes plus précocement. Nous avons observé, notamment sur les lots du programme SUMO, que les pics de mortalité surviennent juste avant et pendant la période de ponte. De plus, l'occurrence des mortalités dépendrait d'un seuil de température (19°C ?). Si les huîtres se reproduisent dès la première année, il semble néanmoins qu'au sein de la baie des Veys le naissain acquiert plus tardivement la pleine maturité sexuelle (stade IIIB) que les huîtres plus âgées. **L'absence de mortalités juvéniles en baie des Veys (contrairement à Auray) pourrait être expliquée par l'absence de simultanéité entre la température seuil et le stade de maturité critique. Le travail prévu en 2004 a pour objectif de tester cette hypothèse.**

En juillet 2001 et 2002, le naissain des familles "R" apparaît plus avancé en maturité comparativement aux familles "S", puis le cycle s'accélérerait pour les familles "S". Néanmoins, les résultats ne permettent pas de discriminer statistiquement le naissain "R" et "S". En 2003, les « huîtres de 18 mois » étudiées présentent une meilleure croissance (somatique et germinale) en baie des Veys par rapport à Auray. Les huîtres du pool "S" semblent plus précoces que les "R" en baie des Veys alors que l'inverse serait observé à Auray (mais les faibles effectifs ne permettent pas l'obtention de différences significatives). A Auray, il n'apparaît pas de différence significative entre les pools "R" et "S" au niveau de l'effort de reproduction, contrairement à ce qui avait été

précédemment observé (Top Flop). En BDV, la masse corporelle et la masse gonadique des huîtres "S" sont significativement supérieures à celles du pool "R" sauf en septembre où les huîtres "R" conservent davantage de gamètes résiduelles. **Si certains éléments semblent se dégager (eg fort investissement dans la reproduction des huîtres "S"), ils n'apparaissent pas constants (eg 2002 versus 2003 à Auray) et seraient variables en fonction de l'écosystème (eg Auray versus baie des Veys en 2003). Partant de ce constat, il est clair que des données complémentaires doivent être acquises en 2004 pour préciser les éventuelles différences dans le déroulement du cycle reproducteur et dans l'effort de reproduction entre des huîtres sélectionnées comme résistantes ou sensibles.**

Lien avec les autres partenaires de la Tâche

Ifremer - DEL/DRV/RA/LERN (M. Ropert ; Tâche 2.1.5),
 Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M Argenton (S. Pouvreau ; Manip. Gigarepro)
 Ifremer - DRV/RA/LCB (E. bédier ; BERAY et DYNAMAMAURAY).

Références bibliographiques

Bédier E., M. Ropert, A. Langlade, V. Hugonnet, J.F. Bouget, S. Claude, J. Mazurié, E. Le Gagneur, C. Simmonet, F. Quiniou et X Caisey. Comparaison des lots d'huîtres "R" et "S" dans deux écosystèmes *Évolution des mortalités et des indices biométriques* Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003..

Costil K. et Pouvreau S. BERAY : Comparaison des souches "R" et "S" dans 2 écosystèmes ; reproduction des huîtres de la G2 (« 18 mois ») à Auray (AUR) et en baie des Veys (BDV). Séminaire Morest 2003, 26-28 novembre 2003. La Rochelle.

Dubois B. et Ropert M. Contribution à l'étude des mortalités de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), en baie des Veys ; programme SUMO : dynamique des mortalités en relation avec la reproduction. Séminaire Morest 2002 , 13-15 novembre 2002. Brest.

LCB, LPI , UBO/IUEM/LEMAR. Comparaison de familles F1 de phénotype survie opposé ; physiologie, effort de reproduction, équilibre énergétique et paramètres de l'hémolymphe. Séminaire Morest 2002 , 13-15 novembre 2002. Brest.

Calendrier d'exécution 2004

Pour chacun des lots Morest, 3 dates d'échantillonnage sont prévues avec, en sus pour le naissain, un point initial à la sortie de nurserie.

| | « Sortie de Bouin » | « Mi Juin » | « Fin Juin-déb Juil » | « Fin juillet-déb Août » | « Fin Août » |
|--------------|---------------------|--|--|--|------------------------------|
| G4 à AUR | « Point 0 » | « En maturation » ? « Pleine Maturité » ? | « Pleine Maturité » Dépassement 19 °C ? | "Post-ponte / résorption" | |
| G4 en BDV | « Point 0 » | - | « En maturation » | « Pleine Maturité » ? Dépassement 19 °C ? | "Post-ponte / résorption" |
| G3-IM en BDV | - | - | « En maturation » | « Pleine Maturité » Dépassement 19 °C ? | "Post-ponte / résorption" |

WP 3 - Expérimentations phase I. "R" ET "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

Sous-tâche 3.4.1 - "R" et "S", Gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18 mois)

Nom du Rédacteur Coordinateur de la WP : A. HUVET

Responsables de la Tâche : K. KELLNER, C. HEUDE (LBBM, UMR Phy Ecophy Mol Mar)

Cadre de l'étude : thèse de Mlle DUFOUR A.C., co-financée par la région Basse-Normandie et le SMEL.

Introduction : Contexte et objectif général du projet

Chez *Crassostrea gigas*, le glycogène contenu dans le tissu de réserve joue un rôle central comme support énergétique de la gamétogenèse (Bayne *et al.*, 1982 ; Gabbott et Whittle, 1985 ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Mathieu et Lubet, 1993) : le volume occupé par les tubules gonadiques au cours de l'année dans la région gonadique est inversement proportionnel au volume occupé par le tissu de réserve (Berthelin *et al.*, 2000a). Le taux de glycogène dans la région gonade-manteau est élevé en automne et en hiver, pendant la période de repos sexuel, période pendant laquelle le tissu de réserve se restructure. Au contraire, ce taux est bas pendant la période d'activité sexuelle, au printemps et en été (Berthelin *et al.*, 2000a). Un test biologique *in vitro* permettant d'évaluer l'incorporation du glucose dans le glycogène des cellules de réserve (Berthelin *et al.*, 2000b) a permis de montrer que, pour l'année du suivi, la synthèse de glycogène était élevée en hiver et faible le reste de l'année. Tous ces éléments convergent donc vers l'hypothèse d'une mise en réserve hivernale en vue de la gamétogenèse. La possible implication du statut énergétique dans les phénomènes de mortalités estivales est envisagée, dans la mesure où les réserves en glycogène préalablement établies en période automnale, peuvent constituer un facteur limitant en période estivale alors que les animaux ont à faire face à l'émission des gamètes dans l'eau suivie de la réorganisation de la région gonadique. L'analyse de ce phénomène passe par une meilleure connaissance du métabolisme glucidique des cellules vésiculeuses :

- En ce qui concerne l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses, la caractérisation des mécanismes de transport du glucose chez *Crassostrea gigas* a déjà été abordée par une approche cellulaire (caractérisation *in vitro* de l'entrée du glucose), en utilisant le 3-O-méthylglucose (3-OMeG). L'entrée de cet analogue non métabolisable du glucose est inhibée par la cytochalasine B, un inhibiteur des systèmes de diffusion facilitée de type GluT ainsi que par la phlorizine qui inhibe les transporteurs sodium-dépendants de type SGLT (Lelong, 2002). Récemment, une séquence de type SGLT a été identifiée chez *Crassostrea gigas* (A. Huvet), et des séquences de type GluT sont également recherchées. La mesure de l'expression quantitative de ces deux séquences cibles est envisagée.

- En ce qui concerne la synthèse ou la mobilisation du glycogène, outre l'approche *in vitro*, une approche par des techniques de biologie moléculaire est désormais développée avec, comme gènes cibles, les gènes codant pour la majorité des enzymes clés de ce métabolisme (Thèse Hélène Bacca, UMR/PE2M BREST et CAEN - MNHM Concarneau). Les marqueurs moléculaires disponibles sont la Glycogène Synthétase et la Glycogène Phosphorylase (Huvet *et al.*, en préparation), la PhosphoEnol-Pyruvate-Carboxykinase, la Pyruvate Kinase, l'Hexokinase et la Glucose-6-Phosphatase (Van Wormhoudt *et al.*, en préparation). Leur expression quantitative peut dès lors être suivie.

D'autre part, la période de mortalités estivales coïncide avec l'inversion du métabolisme global du tissu de réserve en fin de reproduction. Même si cette inversion fait appel à des mécanismes régulateurs stricts, le fait que l'on observe des différences de cycles entre les sites d'élevages

implique toutefois un impact important des conditions environnementales sur cette régulation (effet de la température, de l'alimentation).

- Une alternative afin d'étudier ces changements métaboliques est de caractériser les protéines impliquées dans ces inversions saisonnières. L'approche moléculaire développée par A. Huvet et ses collaborateurs afin de caractériser les gènes des enzymes clés du métabolisme du glycogène chez l'huître va dans ce sens. Par ailleurs, chez d'autres espèces de bivalves comme les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, l'approche protéomique a permis la mise en évidence d'expressions protéiques différentielles selon l'espèce (Lopez *et al*, 2002). Chez *Crassostrea gigas*, une étude différentielle utilisant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle est entreprise de façon à visualiser les protéines impliquées lors de changements métaboliques importants touchant le tissu de réserve.

Pour ces différentes approches (*in vitro* et moléculaires), il convient de travailler sur du matériel biologique caractérisé du point de vue des réserves et de la reproduction. Pour ce faire, des conditionnements trophiques opposés seront réalisés aux 3 périodes clés du cycle énergétique : en début d'automne, en période de reprise du stockage de glycogène, au printemps, au moment de la mobilisation des réserves et enfin en début d'été, alors que les animaux sont matures et qu'ils ont épuisé leurs réserves. La réponse aux conditions trophiques à ces 3 périodes sera mesurée sur des huîtres de 18 mois, "R" et "S".

Année 2004 - Proposition d'étude

Protocole général de la tâche

Les animaux concernés par ces expérimentations sont des huîtres de 18 mois (ponte mars 2003), "R" et "S" dont la mise en poches et la mise sur site en baie des Veys (site Morest) s'effectueront début mars 2004.

Sur ces animaux, un conditionnement trophique sera réalisé. Deux conditions d'alimentation seront testées (lot à jeun et alimentation forte). Ce conditionnement aura une durée d'un mois et sera répété à 3 périodes de l'année (automne 2004, printemps et été 2005). Ces expérimentations seront réalisées dans le SYCAMAR du Syndicat Mixte de l'Équipement du Littoral (SMEL, J.L. Blin) en collaboration avec S. Pouvreau pour ce qui est des conditions d'alimentation à appliquer. Pour chaque expérimentation, un échantillonnage se fera au début et à la fin du conditionnement avec, à chaque fois, en parallèle un point sur les animaux laissés sur estran. Au cours des conditionnements, un suivi précis de la mortalité sera effectué par le SMEL.

Sur ces huîtres, le métabolisme glucidique sera mesuré à travers les mesures *in vitro* d'entrée du glucose et de stockage de glycogène, l'expression quantitative des gènes marqueurs de ce métabolisme (partenariat avec A. Huvet) et enfin l'approche différentielle du protéome du tissu de réserve.

Résultats attendus

L'expérimentation est menée de façon à répondre, au moins partiellement, aux questions suivantes :

- 1) Quel est l'impact des conditions trophiques sur les inversions du métabolisme glucidique observées de façon saisonnière chez l'huître ?
- 2) Si impact il y a, est-il le même aux 3 périodes étudiées ?
- 3) L'apport trophique agit-il (via une régulation interne) sur les transporteurs de glucose au sein de la cellule vésiculeuse (nombre, type et répartition de ces transporteurs) ou sur la cascade enzymatique qui conduit au stockage de glycogène ?
- 4) Quelles sont les protéines impliquées dans ces inversions métaboliques saisonnières ?

Calendrier d'exécution des tâches

Mars 2004 : mise sur site (baie des Veys, site Morest) des huîtres concernées.
Octobre 2004 : conditionnement trophique automnal, durée 1 mois
Avril 2005 : conditionnement trophique printanier, durée 1 mois
Juillet 2005 : conditionnement estival, durée 1 mois

Liste des actions des contributeurs

Le LBBM, équipe Kellner-Heude (thèse A.C. Dufour) assurera le suivi des animaux en baie des Veys (en collaboration avec K. Costil, LBBM et le LCN) ainsi que les analyses expérimentales à l'issue des 3 conditionnements.

Les conditionnements trophiques seront réalisés au SMEL (J.L. Blin).

Bibliographie

Bayne B.L., Bubel B., Gabbott P.A., Livingstone D.R., Lowe, D.M. and Moore M.N. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol. Lett.*, 3 : 89-105.

Berthelin C., Kellner K., Mathieu M., 2000a. Storage metabolism of the Pacific oyster (*Crassostrea Gigas*) in relation with summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 125 :359-369.

Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. 2000b. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2 : 136-145.

Gabbott P.A. and Whittle M.A. 1985. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L.-II. Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B :197-207.

Lelong A., 2002. Caractérisation des mécanismes d'entrée du glucose à travers la membrane des cellules vésiculeuses de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Mémoire de DEA « Biologie et productions animales »*. Université de Rennes 1.

Lopez J.L., Marina A. and Alvarez J. 2002. Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics.* 2002 Dec;2(12):1658-65.

Mathieu M. and Lubet P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves – a brief review. *Invertebrate reproduction and development.* 23 : 123-129.

Ruiz C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M., and Sanchez, J.L. 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Mar. Biol.*, 112 :67-74.

Sous-tâche 3.4.3 - "R" et "S" : Gènes du contrôle de la croissance et développement et de la reproduction. (cf. 2.2.2)

Présentation

Nous disposons au laboratoire d'un certain nombre de gènes marqueurs d'huître pour lesquels la caractérisation fonctionnelle est, soit effective, soit en cours. Nous proposons de développer l'outil mis au point concernant la mesure de l'expression de ces gènes par PCR quantitative en temps réel sur des animaux "R" et "S" provenant de la baie des Veys.

Les gènes candidats sont :

Des marqueurs physiologiques de :

La croissance / développement et de l'immunité

Deux gènes codant des protéines de la superfamille du TGF- β (**mGDF1 et 2**) exprimés au cours du développement embryonnaire et larvaire ainsi que dans différents tissus chez l'adulte. En outre, un de ces gènes (mGDF2) au moins, montre des variations significatives d'expression également au cours d'une infection bactérienne ou après stimulation par des LPS et coderait donc une **cytokine immunitaire**. Par ailleurs les gènes codant les récepteurs spécifiques de ces facteurs de croissance sont également disponibles.

Nous disposons d'une famille de gènes dont deux membres sont bien caractérisés qui codent pour les **Chi-lectines** et des **chitinases** dont l'expression varie au cours du développement, certains gènes sont fortement exprimés au niveau du bord de manteau et par ailleurs semblent également montrer une expression différentielle consécutivement à l'injection de LPS ou de chitine (stress mimant une infection bactérienne ou fongique respectivement).

La reproduction

Un gène codant deux récepteurs homologues des récepteurs au GnRH de vertébrés a été caractérisé, l'approche méthodologique permettant la mesure de son expression est mise au point.

Matériel et Méthodes

Matériel : 20 huîtres «G3 R » et 20 huîtres« G3S » de baie des Veys.

Les tissus (Bords de manteau, hémocytes, branchies et gonades) seront prélevés, les ARN totaux extraits de ces tissus seront, après élimination de l'ADN génomique contaminant par traitement par la DNase, rétrotranscrits en ADNc. L'expression des gènes candidats sera mesurée par PCR quantitative en temps réel selon la méthodologie mise au point au cours des exercices précédents. Le niveau d'expression sera exprimé par rapport à un gène de référence (GAPDH ou actine).

Résultats attendus

Discrimination génétique des "R" et des "S" sur des gènes du contrôle de la physiologie.

Sous-tâche 3.4.4. - Comparaison d'expression différentielle de marqueurs moléculaires de stress sur le site DynaBDV-Géfosse (cf. 2.2.9)

Responsable de la sous-tâche : Christophe LELONG – MDC – Université de Caen (PE2M)

Présentation

Dans le cadre de Morest, un projet d'étude de stress environnemental est développé en 2004 sur le site de Géfosse en Baie des Veys. Ce projet a pour objet de tenter de mettre en relation l'effet éventuel du sédiment avec les mortalités observées avec comme piste envisagée, la variation de H₂S et de NH₄⁺ d'origine sédimentaire.

En 2004, il est donc proposé de mesurer l'expression différentielle de certains gènes de stress sur des individus des familles "R" et "S" disposés à deux hauteurs (15 et 50cm du sédiment). Dans la mesure où des composés toxiques provenant du sédiment puissent être impliqués dans des perturbations physiologiques chez l'huître, la mesure de gènes régulateurs de la croissance et de la reproduction semble pertinente. De manière générale, l'ensemble des effets du sédiment peut être étudié à travers un ensemble de gènes candidats de perturbations physiologiques ou de réponse à un stress.

Matériel et méthode

Au cours de la tâche 1.5 (Mise au point d'outils en écotoxicologie), nous nous sommes employés à caractériser des gènes candidats susceptibles de répondre à des atteintes de nature environnementale ou anthropique et développer des outils de quantification de ces réponses. Parmi ces gènes susceptibles de mettre en relation leur expression et les conditions du milieu, les gènes impliqués dans les processus physiologiques de la croissance et de la reproduction (facteurs de croissance et de différenciation de type TGF et Chi-lectines, régulateurs de type GnRH), mais également ceux intervenant dans la détoxification lors d'atteintes de xénobiotiques (les pompes d'extrusion MXR) ou impliqués dans une réponse précoce aux stress (les "Heat Shock Proteins", récepteur à la calcitonine)

Disposant de ces gènes candidats ainsi que de ceux déjà disponibles au laboratoire, un outil diagnostique basé sur l'étude de variations d'expression de ces marqueurs vis à vis de contraintes environnementales a été mise en place et validé. Nous avons mené certaines expérimentations en milieu contrôlé pour valider une réponse différentielle des gènes retenus face à différentes atteintes.

En milieu naturel, les huîtres sont en contact avec de nombreux parasites tels que les bactéries marines et des organismes eucaryotes comme les microalgues toxiques, des protozoaires et des nématodes parasites. Pour appréhender des atteintes par ces organismes, deux expériences ont été réalisées en infectant par des souches de *Vibrio* pathogènes d'huîtres ou en mimant ces atteintes en injectant du LPS (lipopolysaccharide, composé membranaire des bactéries Gram-) ou de la chitine (composé présent dans de nombreux organismes). Les gènes codant *mgdf2* (Lelong et al, en cours) et son récepteur *rstkb* (Herpin et al, en cours), *Cg11* et -2 se sont avérés de bons gènes candidats dans les hémocytes lors d'atteintes par des différents organismes par une expression différentielle accrue de leurs messagers. Au cours de cette étude, nous mesurerons d'autres gènes potentiellement impliqués dans cette réponse immunitaire, ainsi que dans d'autres tissus cibles. De même, lors de modification importante de la balance ionique, le récepteur de type Calcitonine/Sécrétine est régulé négativement (Dubos et al, 2003), et de la même manière, les protéines HSC72 et HSP90.

Pour appréhender des réponses différentielles des deux familles et dans les deux conditions données (hauteur des poches à 15 et 50cm du sédiment), des individus seront prélevés (4 pools de 5 individus par hauteur et par famille) à une date correspondant à une période de fortes mortalités ou de grandes fluctuations des composés chimiques sédimentaires. A l'issue de l'extraction des ARN totaux, nous mesurerons l'expression de chacun des messagers codant les gènes candidats retenus et cités précédemment.

Résultat attendu

Dans la mesure où des composés chimiques toxiques tels que le H₂S et le NH₄⁺ puissent être reliés aux mortalités observées chez les huîtres, l'emploi d'outils de mesure de l'expression de gènes régulateurs de processus physiologiques comme la croissance ou la reproduction, ou de gènes de réponse de stress pourrait permettre de mesurer des perturbations physiologiques. Il s'agira alors de vérifier si les mortalités observées sont en relation avec des perturbations et, en l'occurrence sont sous l'influence du sédiment et des composés chimiques émis.

Bibliographie

- Lelong C, Badariotti F, Rodet F and Favrel P (en préparation), Cg-mGDF2, a TGF- β /Activin homolog in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* is involved in immunity against a Gram- microbial infection.
- Herpin A, Lelong C, Becker T, Cunningham C and Favrel P (En préparation), Structural and functional evidence for a type 1 TGF- β *sensu stricto* receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas*.
- Dubos MP, Badariotti F, Rodet F, Lelong C and Favrel P (2003), Molecular and physiological characterization of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* ;310(3):972-8.
- Lelong C., M. Mathieu and P. Favrel (2000) – Structure and expression on mGDF, a new member of TGF β superfamily from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas* Eur.J. Biochem 267 : 3986-3993.
- Herpin A., P. Favrel and C. Cunningham (2002) - Gene structure and expression of cgALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. Gene 301 : 21-30.
- Herpin A., C. Lelong and P. Favrel (2004) Transforming Growth factor-related proteins: An ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp. Immunol*, 28(5) 461-485.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|--|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales in situ | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire in situ des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison intra site | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé intra site des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité intra site baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé intra site de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| <i>- VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| <i>- VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| <i>- VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juvéniles | 3.5.1 | |
| <i>Betonbloom : Juvéniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de :</i> | | |

| | | |
|---|-------|--|
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-----------|----------------|---------------------|
| P.Favrel | PR | 0.5 |
| C.Lelong | MCF | 1 |
| K.Costil | MCF | 6 |
| K.Kellner | MCF | 2 |
| C.Heudes | MCF | 2 |
| J.Royer | Post -doc | 12 |
| M.Mathieu | PR | 0.5 |

+ F. Rodet Thèse 2 H/M
+ A.C. Dufour Thèse 4 H/M

Demande budgétaire

En 2001 et 2002, le financement du programme Morest pour le Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines a été assuré par la subvention du Conseil Régional de Basse-Normandie (175 KF TTC - 26678 Euros TTC). Ce financement correspond au soutien régional à la recherche sur les bivalves dont la thématique s'est orientée sur le programme Morest après accord du Conseil Régional. Compte tenu du nombre des participants de notre équipe à Morest et de la diversité des Tâches où nous sommes impliqués, une dotation spécifique de fonctionnement est demandée à partir de 2004, d'un montant de 15000 Euros TTC (fonctionnement et missions).

MNHN - Muséum National d'Histoire Naturelle - Concarneau

Adresse : Station de Biologie Marine
Muséum National d'Histoire Naturelle
UMR 5178 Biologie des organismes et de Ecosystèmes Marins
Equipe Ecogénétique et Laboratoire « Évolution Moléculaire et Adaptation »
(EPHE) BP 225 – 29182 Concarneau

Responsable : A. Van Wormhoudt, DR2 CNRS

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé du projet : Contribution à la caractérisation de gènes fonctionnels du métabolisme énergétique chez *Crassostrea gigas*.

1 - Descriptif de l'activité

L'équipe de recherche écogénétique, dont la thématique est maintenant reconnue au sein de l'UMR 5178, est constituée de 2 chercheurs CNRS, 1 Ingénieur, 1 enseignant-chercheur du Mans qui effectue sa recherche à Concarneau, de 2 thésards et de plusieurs étudiants. Soit, au 15 février 2004 :

A. Van Wormhoudt, DR2 CNRS ; D. Sellos, CR1 CNRS ; F. Denis, MC ; C. Beaupoil, IE ; L. Arena PhD, boursière de la Chancellerie ; S. Iglesias, PhD, H. Hassan, Thèse EPHE ; M Hillion (IUT), S. Boursier (Maîtrise), A. Marrec (Maîtrise).

Thématiques du laboratoire : les recherches portent sur l'évolution moléculaire des grandes fonctions chez les organismes marins, en particulier mollusques et crevettes. Chez ces derniers nous avons abordé, entre autres, l'étude des gènes des enzymes digestives et plus récemment des gènes du métabolisme énergétique. Les facteurs du milieu (nutriments, température, salinité...) agissent à différents niveaux de l'organisme sur l'activité des enzymes, sur le taux de leur expression (ARN) et sur leurs régulations (hormonale...) et ceci à différentes phases de leur développement. Les invertébrés marins présentent en effet souvent plusieurs phases de développement, estuariennes (pour les larves) et marines. Ils subissent donc des conditions variables de température, de salinité et aussi des changements de régime alimentaire. L'adaptation des animaux, à différentes salinités par exemple, va dépendre du stade de leur développement, du taux de réserves accumulés et de leur régime alimentaire : les besoins des larves et les juvéniles étant souvent différents de celui des adultes, cela va entraîner des régulations de la pression osmotique ou de l'excrétion différentes et des survies différentes. Du point de vue écologique, cela se traduit par des changements de structure génétique des populations. Aussi, il convient d'avoir une approche intégrée de ces régulations. Nos études portent sur les différents niveaux d'organisation suivants :

- Les enzymes, afin de rechercher des isoformes à propriétés particulières : les enzymes digestives et parmi celles-ci l' α -amylase, les enzymes du métabolisme des glucides et en particulier celles de la glycolyse (Hexokinase, Pyruvate kinase), de la néoglucogenèse (PEPCK, glucose-6-phosphatase), les enzymes contrôlant l'excrétion de l'ammoniaque (GDH), les enzymes du métabolisme des protéines intervenant dans la libération d'acides aminés osmorégulateurs (LAP, AAT).

- Les ARN, afin de mesurer les niveaux d'expressions qualitatives et quantitatives :

- Les gènes correspondants, afin d'étudier leur niveau de polymorphisme.

Introduction

Une des causes des mortalités estivales serait le déficit énergétique associé à la faiblesse des réserves. Il a été démontré que les huîtres « sensibles » ont une dépense énergétique plus forte et, de ce fait, la période de reproduction devient une phase critique associée à des mortalités importantes. Une étude détaillée de ce métabolisme a donc été entreprise pour essayer de comprendre les phénomènes et de déterminer s'il existe une composante génétique ? Les enzymes clés du métabolisme ont été choisies et la caractérisation de leurs ARN effectuée afin de déterminer vers quel type de métabolisme l'animal (ou les différents organes) est orienté à différentes étapes de son développement. Ces travaux seront effectués sur les huîtres "sensibles" et "résistantes" sélectionnées par l'équipe de La Tremblade.

Les enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogénèse ont été choisies au départ mais la sélection s'est affinée au fur et à mesure des résultats obtenus.

Les travaux de l'unité s'effectuent en liaison étroite avec l'**équipe de Physiologie de l'Ifremer (Brest)** qui a ciblé ses objectifs sur les gènes de la glycogénèse (glycogène synthétase) et de la glycogénolyse (glycogène phosphorylase). D'autres enzymes, comme la phosphoglucomutase sont étudiées par le **LEMAR/UBO. Le laboratoire de biologie et biotechnologie marine de Caen** étudie quant à lui plus spécifiquement les transporteurs de glucose,

Une bourse (H. Bacca), co-dirigée par A. Van Wormhoudt et J. Moal et financée par l'Ifremer et la Région Bretagne, a été obtenue pour aider à la réalisation de ce programme.

Par ailleurs une autre thèse est en cours à Caen sur le métabolisme glucidique des cellules isolées et G. Le Moullac à Argenton étudie l'effet de l'hypoxie sur ce même métabolisme qui constitue ainsi un rôle central regroupant différents laboratoires.

Résultats préliminaires obtenus

- **Caractérisation partielle** des cDNAs de différentes enzymes (PEPCK, Hexokinase, Pyruvate-kinase, Leucine amino peptidase, glucose-6-phosphate deshydrogénase...). La structure de l'hexokinase est comparable à celle de Drosophile ; en particulier une délétion de 5 acides aminés est commune, ce qui la différencie de celle des vertébrés et de la glukokinase, en particulier.
- Mise au point du dosage des cDNAs correspondant aux ARNs de différentes enzymes du métabolisme énergétique par RT-PCR..
- Une étude de l'expression par **PCR quantitative** des gènes ciblés dans la glycolyse (Pyruvate Kinase, Hexokinase) a été effectuée avec un suivi annuel, réalisé avec des conditions trophiques variables, en parallèle avec la mesure des activités de ces enzymes et la quantification des ARN messagers correspondants. Les maxima (exprimés par rapport à l'actine) ont été trouvés au mois de Mai-juin pour la PK et sont liés à la baisse des niveaux de sucres totaux chez l'animal (Bacca et al., La Rochelle 2003). Les niveaux moyens dépendent du niveau trophique, ce qui en fait un marqueur intéressant. En ce qui concerne l'Hexokinase, les résultats sont plus difficiles à interpréter. La quantité relative d'ARN messagers est maximale dès les mois de Novembre-Décembre, période à laquelle les taux maxima de sucres sont atteints. Un autre maximum est atteint en Mai. L'enzyme qui phosphoryle le glucose en G6-P interviendrait dans la glycogénèse et dans la glycolyse. Pour vérifier cette hypothèse, une mesure des taux de GPM (G6-P en G1-P) est nécessaire. Par ailleurs, les niveaux d'ARN ne sont pas corrélés positivement au niveau trophique. Ces premiers résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche. Une meilleure connaissance des voies métaboliques après la phosphorylation du glucose permettrait de préciser ces voies. C'est pour cette raison que la caractérisation de la G6 phosphate deshydrogénase a été effectuée. Cette enzyme oriente le métabolisme vers la voie des pentoses (production de NADPH pour la synthèse des acides gras et production de sucres pour la synthèse des acides nucléiques). Ainsi, la mesure des taux d'ARN messagers pourrait être complétée par une étude des ARN correspondant à la PGM et à la G6 phosphate deshydrogénase. L'hexokinase ne pouvant être considérée uniquement comme la voie d'entrée de la glycolyse, il convient de caractériser la Phosphofructokinase qui joue ce rôle.
- Répartition tissulaire : les ARN correspondant à la PK sont surtout présents dans le muscle (2,8% par rapport à l'actine alors que la PEPCK est surtout présente dans le manteau (0,37%).

Publications

Moal J., J.Y. Daniel, D. Se, A. Van Wormhoudt et J.F. Samain (2000) Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. **J. Comp. Physiol**, 170, 21-26.

C. Rosas, C. Pascual, G. Cuzon, F. Contreras, G. Gaxiola, G. Taboada and A. Van Wormhoudt. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 268, 47-67..

D. Sellos, J. Moal, L. Degremont, A. Huvet, J.Y. Daniel, S. Nicoulaud, P. Boudry, A. Van Wormhoudt, J.F. Samain. Structure and polymorphism of the amylase genes in the oyster *Crassostrea gigas*: Tissues specific expression and allelic polymorphism as population genetic markers. **Mar. Biotech.** 5 (3) ; 360-372.

A Huvet, J.Y. Daniel, C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A Van Wormhoudt, D. Sellos, J.F. Samain and J. Moal. Tissue expression of two -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. **Aquaculture** 228, 321-333.

V. Schein, L. Kucharski, A. Van Wormhoudt and R. Da Silva. Molecular cloning of Phosphoenolpyruvate kinase of the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*, tissue expression and osmotic regulation. 2004 ; **Febs letter** (sous presse)

WP1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.2 - Développer l'étude des marqueurs physiologiques

L'étude de nouveaux marqueurs du métabolisme sera développée en liaison avec les mortalités estivales : c'est le cas de l'ARN de la glucose 6 phosphatase (qui pourrait n'être présente que dans certains tissus en faible quantité), de celui de la phospho fructo kinase (véritable entrée de la glycolyse), de la fructose biphosphate aldolase (caractéristique de la néoglucogénèse au même titre que la PEPCK), ou de la GDH (métabolisme des protéines). Une approche du polymorphisme enzymatique sera effectuée par électrophorèse enzymatique.

Validation de ces marqueurs par PCR quantitative (l'achat d'un appareil MyQ Biorad a été effectué en Octobre 2003). Dans l'immédiat, la G6 phosphate deshydrogénase et la Leucine aminopeptidase (qui intervient dans l'osmorégulation) déjà caractérisés seront utilisés.

Caractérisation complète des cDNAs d'intérêt : en particulier de la PK et de l'hexokinase qui fera l'objet d'une première publication avec H. Bacca. Parallèlement, la caractérisation des gènes "A" d'amylase et la séquence des cDNAs correspondants en liaison avec la caractérisation des propriétés biochimiques des isoenzymes (Km, activité spécifique...), réalisé par M. Prudence, et exprimés chez des huîtres préalablement sélectionnées sur leurs niveaux d'assimilation différents sera effectuée. La purification de l'amylase s'avère nécessaire pour valider les anticorps obtenus par M. Koken.

Bibliographie

Foufelle F, Girard J, Ferre P., 1996, Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue : a review of the potential cellular and molecular mechanisms **Adv. Enzyme regul.** 36, 199-226.

Ballantyne JS, Berges JA, 1991. Enzyme activities of gill, hepatopancreas and adductor muscle in the Oyster (*Crassostrea virginica*) after changes in diet and salinity . **Can. J. Fish. Aquat.Sci.** 48, 1117-1123.

Nirchio M, Perez JE, Cequea H. , 1991 allozyme variation of Lap loci in *Crassostrea rhizophorae* in relation to temperature and/or salinity **Sci. Mar.**, 55, 563-567.

WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.3 - Stress

Les analyses de la manip Gigarepro 2002 seront complétées avec les nouveaux marqueurs disponibles et en étroite collaboration avec H. Bacca pour les enzymes de la glycogénèse et de la glycogénolyse. Une attention particulière sera portée aux marqueurs de la néoglucogénèse en condition trophique faible.

En parallèle seront commencées les analyses de la manip Gigarepro 2003 avec des analyses d'expression "R" et "S" (métab. énergétique, enzymes digestives) dans différents tissus. Cette approche est nécessaire pour comprendre les transferts de matière d'un organe à un autre. Si les huîtres sensibles "S" dépensent plus d'énergie cela devrait se répercuter au niveau des enzymes du métabolisme énergétique.

A terme il convient également de définir une approche intégrée avec des physiologistes (respiration, excrétion...) comme cela a été fait chez les crevettes. En ce sens, la présence de G. Le Moullac dans le projet est un plus. Des expériences communes pourront être réalisées à Argenton.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils en | Tâche | 2004 |
|---|-------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nurserie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| Adultes | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémo., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003)

Moal J., J.Y. Daniel, D. Sellos, A. Van Wormhoudt et J.F. Samain, Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. **J. Comp. Physiol**, 170, 21-26.

Moal J., J.F. Samain, J.Y. Daniel, P. Boudry, S. Bougrier, D. Sellos, A. Van Wormhoudt - Evidence of absorption efficiency differences in two sub-populations of *Crassostrea gigas*. **J. of Shellfish research**, 19 : 616pp .

Moal J., J.Y. Daniel, P. Boudry, S. Bougrier, D. Sellos, A. Van Wormhoudt and J.F. Samain. Evidence of absorption efficiency differences in two subpopulations of *Crassostrea gigas*. A first approach of their amylase gene polymorphism. **Eur. Mar. biotech.**, 12-14 Mai, Nantes, abs.

Sellos D., J. Moal, L. Degremont, A. Huvet, J.Y. Daniel, S. Nicoulaud, P. Boudry, A. Van Wormhoudt, J.F. Samain. 2002. Structure and polymorphism of the amylase genes in the oyster *Crassostrea gigas*: Tissues specific expression and allelic polymorphism as population genetic markers. **Mar. Biotech.** 5 (3) ;

Huvet A., J.Y. Daniel, C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, J.F. Samain and J. Moal. Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. **Aquaculture** 228, 321-3A

Huvet A., C. Fabioux, J.Y. Daniel, H. Bacca, C. Lelong, A. Van Wormhoudt, J. Moal, J.F. Samain Molecular cloning and expression of the oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. (en préparation).

H Bacca, A. Huvet, J.Y. Daniel, J. Moal, A. Van Wormhoudt - 2003 - Expression tissulaire et saisonnière des gènes du métabolisme des sucres. Journées Morest (La Rochelle).

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|------------------|----------------|---------------------|
| A. Van Wormhoudt | DR2 CNRS | 50% sur 12 mois |
| M. Hillion | DUT | 100% sur 3 mois |
| S Boursier . | Maitrise | 50% sur 5 mois |
| A. Marrec | Maitrise | 20% sur 5 mois |
| F. Denis | MC | 10% sur 12 mois |

En marge du programme, D Sellos ayant pris la direction administrative de la Station se désengagera progressivement. M. Koken continuera a caractériser les anticorps amylase obtenus.

Demande budgétaire

demande identique à celle de 2003

En liaison avec le projet

2002 = achat d'un séquenceur capillaire ABIPRISM 370 (Applied)

2003 = achat d'un appareil de PCR quantitative MyQ (Biorad)

2004 = projet d'équipement SSCP et d'électrophorèse de protéines en bi-dimensionnel.

Thème Immunologie

Ifremer - Laboratoire CNRS - Montpellier

Adresse : **IFREMER-CNRS-Université de Montpellier II**,
UMR 5171 - GPIA
2 Place E. Bataillon, CC80, F-34095 - Montpellier cédex 5,
France

Responsable laboratoire : François BONHOMME
Responsable local Morest : Viviane BOULO

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

Evaluation de la réponse immunitaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*
Contribution aux tâches WP1 et WP3

Descriptif de l'activité

Résultats 2003

La participation du laboratoire de Défense et Résistance des Invertébrés Marins (DRIM) dans le programme Morest se situe, pour l'année 2003, au niveau du sous-programme 1 (Mise au point d'outils). Les activités de la DRIM peuvent être classées en deux champs d'activités qui sont la caractérisation d'effecteurs de la réponse immunitaire et la mise au point d'outils d'analyse de l'expression de gènes.

a) Caractérisation d'effecteurs de la réponse immunitaire

Les approches moléculaires de l'étude des mécanismes de défense de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, développées au sein de la DRIM depuis plusieurs années nous ont permis d'identifier de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire de l'huître. Nous avons focalisé nos recherches (isolement du cDNA, production de protéines recombinantes, fonction des molécules, régulation de l'expression...) sur certains gènes qui présentent de fortes similarités avec des gènes jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes de défense d'autres espèces animales : LBP/BPI, défensine, *Cg-Tal*, *Cg-Timp*.

b) Mise au point d'outils d'analyse de l'expression de gènes

Des outils d'analyse globale du transcriptome de *Crassostrea gigas* ont été développés : la RT-PCR en temps réel et les puces à ADNc.

La RT-PCR en temps réel permet une analyse fine et précise de la variation d'expression d'un petit nombre de gènes. La PCR en temps réel a été mise au point en utilisant le gène *Cg-timp* dont le profil d'expression est bien connu. Cet outil a été mis à profit pour quantifier l'expression du gène *Cg-rel* codant le facteur de transcription de la famille Rel/NF-kB. Cette technique fiable est actuellement utilisée pour quantifier l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire.

Les puces à ADNc (macroarrays) qui permettent l'analyse simultanée de l'expression d'un nombre de gènes relativement important ont conduit à l'étude de l'expression d'une cinquantaine de gènes caractérisés au cours du programme EST et susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense. Les résultats ont montré que l'infection induit une augmentation de l'expression du gène *Cg-timp*, comme nous l'avions démontré précédemment par Northern-blot. Une surexpression est détectée pour le gène *Cg-mmp*, qui code une protéine très homologue aux métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (une cible potentielle de *Cg-Timp*) ainsi que pour les gènes codant une lectine (Ficoline), un homologue d'agent coagulant (Transglutaminase, TGase) ou une enzyme de détoxification (Super oxyde dismutase, SOD). Un seul gène dont l'expression est réprimée par l'infection a été mis en évidence dans cette expérience, la métallothionéine, gène codant une

protéine impliquée dans la séquestration des métaux lourds. Ces travaux bien que prometteurs ne sont que préliminaires et seront poursuivis en 2004. Parallèlement à ces travaux menés au laboratoire et en collaboration avec l'Université Médicale de Caroline du Sud (MUSC, USA), des micro puces à ADNc (microarrays) ont été mises en œuvre à partir de la banque EST du laboratoire ainsi que des banques SSH de A. Huvet (Brest) et A. Hairpin (Norvège). Ce travail s'inscrit dans un programme international « Oyster Genome Consortium » qui a pour objectif de développer des outils de génomique pour les deux espèces d'huîtres les plus étudiées, à savoir *Crassostrea virginica* (l'huître Américaine) et *Crassostrea gigas* (l'huître du Pacifique). Notre collaboration avec le MUSC nous donne accès à cette technologie et le challenge de l'année 2004 sera de rapatrier ce savoir faire au sein de l'Ifremer via le programme Morest.

Objectifs 2004

Les activités de nos recherches se classent en deux champs d'activités qui sont la caractérisation d'effecteurs de la réponse immunitaire et la mise au point d'outils d'analyse globale de l'expression de gènes. Pour 2004, les recherches concernant la mise au point et la validation des méthodes d'évaluation de la réponse immunitaire et de l'état de santé des huîtres, ainsi que l'identification de nouveaux gènes marqueurs, vont être poursuivies :

- standardisation et automatisation des techniques macro et microarrays (collaboration MUSC USA), sélection des gènes dans les banques EST, SSH existantes (collaboration avec le LPI Brest, LGP La Tremblade). Application de ces techniques dans les expérimentations VALI et BETON.
- utilisation de la PCR quantitative sur des gènes sélectionnés par les techniques macro et microarrays sur la base de leur expression différentielle.
- mise au point de la méthodologie de RNA interférence (expériences préliminaires avec *Timp* et un gène lié à un phénotype au cours des premiers stades de développement (coll. LPI et LGP).
- recherche d'effecteurs anti-microbiens chez l'huître et étude de l'expression et de la localisation d'effecteurs : *Timp*, LBP/BPI, défensine en réponse à des infections (coll.avec les pathologistes pour le choix des pathogènes notamment).

WP1 - Mise au point d'outils

Les approches moléculaires de l'étude des mécanismes de défense de l'huître creuse *Crassostrea gigas* développées au laboratoire depuis plusieurs années nous permettent d'identifier de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire de l'huître. Nous avons focalisé nos recherches sur certains gènes qui présentent de fortes similarités avec des gènes jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes de défense d'autres espèces animales : *Timp*, LBP/BPI, défensines.

L'analyse globale de l'expression différentielle de gènes, considérés impliqués dans les mécanismes de défense et dans les mécanismes de prolifération cellulaire, puisque celle-ci semble un élément important de la réponse immunitaire, et permet d'évaluer la réponse des huîtres à divers stress et de définir les liens entre les effecteurs immunitaires. Les techniques de macro et microarrays ainsi que la PCR en temps réel sont utilisées pour ces analyses.

Tâche 1.3 - Immunologie

a) Caractérisation d'effecteurs antimicrobiens et rôle dans la réponse immunitaire

Des méthodes de purification de peptides cationiques par chromatographie Haute Pression ont été mises au point initialement pour la purification de peptides d'insectes et elles ont été utilisées avec succès chez la moule (Mitta et al., 1999) et les crevettes péneïdes (Destoumieux et al., 1997) pour l'isolement de peptides antimicrobiens. Cependant, chez l'huître *Crassostrea gigas*, des études préliminaires ont révélé que ces méthodes ne semblaient pas adaptées. Des analyses de profils protéiques différentiels de tissus seront réalisées entre des animaux normaux et stimulés afin

d'identifier des molécules d'intérêt induites ou réprimées face à une infection bactérienne. Ces approches mettront en œuvre des analyses en spectrométrie de masse et l'établissement de cartes peptidiques. Les molécules d'intérêt identifiées seront ensuite purifiées par Chromatographie Liquide Hautes Performances (HPLC) à partir des tissus de l'huître et caractérisées (séquence primaire). Une autre stratégie consiste à rechercher des effecteurs antimicrobiens dans les EST/SSH en recherchant des motifs spécifiques de peptides antimicrobiens (riche en proline, protégrine, cathélicidine). Ce type d'approche a d'ores et déjà conduit à l'identification d'une séquence riche en proline qui pourrait correspondre à un peptide antimicrobien. De plus, les travaux réalisés par A. Herpin au Centre International de Biologie Moléculaire Marine (Bergen, Norvège), ont permis d'isoler un ADNc codant une protéine fortement homologue aux défensines de moules (47% identité). Les recherches sur ces molécules vont être focalisées sur (1) la purification par HPLC, (2) le spectre d'activité (tests antimicrobiens en microplaque), (3) l'expression spatio-temporelle en réponse à des infections (PCR en temps réel, Northern blot).

| <i>Premier Trimestre</i> | <i>Deuxième Trimestre</i> | <i>Troisième Trimestre</i> | <i>Quatrième Trimestre</i> |
|---|---|--|----------------------------|
| - Purification de molécules natives. - Activité antimicrobienne. - Analyse de séquences EST et clonage de ces séquences | - Production de BPI et de la défensine en système recombinant - Production d'anticorps | -Analyse de l'expression - Localisation de l'expression en réponse à des infections | Activité antimicrobienne |

b) Génomique fonctionnelle *in vivo* via la technique d'ARN interférence

L'analyse fonctionnelle de gènes nécessite de passer du descriptif (profil d'expression, localisation...) au fonctionnel (rôle *in vivo*), l'impossibilité d'accéder à la génétique formelle chez l'huître nous ont conduit à initier le développement de la technique d'ARN interférence (RNAi). Les cellules eucaryotes, lorsqu'elles sont confrontées à de l'ARN double brin (ARNds), détruisent leur propre ARN messenger s'il partage leur séquence avec le double brin, c'est ce que l'on appelle le RNAi. Ce phénomène a fourni un outil remarquable pour la génétique inverse et a été utilisé chez des organismes aussi variés que les plantes, les champignons, les nématodes, les trypanosomes, les insectes ou les mammifères (Bass, Cell, 2000, vol. 101 p235-238).

Nous avons choisi d'utiliser l'approche expérimentale mise au point par Timons et collaborateurs sur *Cenorhabditis elegans* (Nature, 1998, vol. 395 p854 / Gene, 2001, vol. 263 p103-112) pour développer le RNAi chez *Crassostrea gigas*. La démarche expérimentale consiste à produire, dans une bactérie, les ARNds correspondant au gène que l'on souhaite éteindre. On utilise ensuite soit les bactéries soit les ARNds extraits des bactéries pour éteindre le gène cible chez *Crassostrea gigas*. L'extinction du gène cible sera recherchée sur des cellules en primoculture, sur des animaux à des stades embryonnaires précoces et chez des adultes.

Nous espérons, par le biais du RNAi pouvoir démontrer *in vivo* la fonction de divers effecteurs potentiels de la réponse immunitaire (*Cg*-timp, peptides antimicrobiens, BPI/LBP). Cette technique pourra être étendue à d'autres gènes afin de confirmer leur fonction (Ex. *vasa*-like, famille des TGF). Discussions en cours avec le laboratoire de génétique et pathologie de La Tremblade (F. Le Roux) pour les tests sur des embryons d'huîtres. Contacts pris avec le laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marine de Caen (C. Lelong) et le laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins (A. Huvet) pour l'utilisation de gènes cibles impliqués dans d'autres fonctions que l'immunité.

| <i>Premier Trimestre</i> | <i>Deuxième Trimestre</i> | <i>Troisième Trimestre</i> | <i>Quatrième Trimestre</i> |
|--|---|--|---|
| Construction des vecteurs d'expression bactériens avec le gène <i>Cg-timp</i> . Premiers tests <i>in vitro</i> (primocultures) et <i>in vivo</i> (animaux adultes). | Tester RNAi <i>Cg-timp</i> sur des animaux à des stades embryonnaires précoces. | Construction des vecteurs d'expression avec d'autres gènes cibles. | Tester <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> les autres gènes cibles. |

c) Standardisation et automatisation macro-microarrays/ PCR temps réel

Les puces à ADNc permettent l'analyse simultanée de l'expression d'un nombre de gènes relativement important. Nous avons mis à profit cette technique pour étudier l'expression d'une cinquantaine de gènes caractérisés au cours du programme EST (Gueguen et al., 2003) et susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense. Ces travaux bien que prometteurs ne sont que préliminaires et nécessitent notamment de focaliser sur la standardisation et l'automatisation de la méthodologie afin d'obtenir une reproductibilité des résultats, une attention particulière sera portée sur la préparation des membranes (spotting des sondes). De plus, en collaboration avec l'Université Médicale de Caroline du Sud (MUSC, USA), la préparation de micro puces à ADNc (microarrays) à partir des banques EST (Guegen, GPIA, Montpellier), SSH (Huvet, LPI Brest ; Hairpin, Norvège) est cours ; ces puces seront disponibles courant du premier semestre 2004. Une première génération de microarrays a été générée, elle contient 322 ESTs provenant de *Crassostrea virginica* (hémocytes, hépatopancreas et larves D) et 192 ESTs provenant de *Crassostrea gigas* (hémocytes). Les premiers résultats montrent que l'analyse par microarrays du taux d'expression de gène d'huître est fonctionnelle (Poster à la PAG, 2003). Notre collaboration avec le MUSC nous donne accès à cette technologie, et le challenge de l'année 2004 sera de rapatrier ce savoir faire au sein de l'Iframer et d'utiliser ces microarrays pour analyser les gènes impliqués dans l'immunité et la physiologie (coll. LPI Brest) selon différentes situations de stress (coll. LPI Brest et LPG La Tremblade).

Ce travail s'inscrit dans un programme international "Oyster Genome Consortium" qui a pour objectif de développer des outils de génomique pour les deux espèces d'huîtres les plus étudiées à savoir *Crassostrea virginica* (l'huître Américaine) et *Crassostrea gigas* (l'huître du Pacifique).

La mise au point de la RT-PCR en temps réel permet une analyse fine et précise de la variation d'expression d'un petit nombre de gènes. Cette technique a été mise au point en utilisant le gène *Cg-timp* dont le profil d'expression est bien connu et sera appliquée pour analyser l'expression différentielle d'effecteurs liés à l'immunité qui auront été détectés lors des analyses globales par macro ou microarrays.

| <i>Deuxième Trimestre</i> | <i>Troisième Trimestre</i> | <i>Quatrième Trimestre</i> |
|--|---|---|
| - Standardisation des macroarrays - Récupération des lames microarrays - Analyses de certains gènes pour mettre au point la technique. | - Application des techniques macro-microarrays aux expérimentations VALI et BETON | - Suite travail troisième trimestre avec analyse des données en bioinformatique |

WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.2 - Energétique et température

Sous-tâche 3.2.2 - expérience VALI

Les techniques précédemment mises au point seront utilisées pour l'analyse globale de l'expression différentielle de gènes notamment liés à l'immunité en ce qui nous concerne. Les ARN seront extraits de tissus prélevés sur des populations "R" et "S" soumis à 2 niveaux énergétiques, et à des périodes entre mai et Août (temp. 19°C, période de gamétogenèse...). Certains animaux seront soumis à des stress ou des infections expérimentales.

Tâche 3.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

Sous-tâche 3.4.2 - approche génomique - expérience BETON

Cette expérience sera réalisée avec des juvéniles produits à Bouin avec 3 niveaux énergétiques et suivi par un élevage en raceway à la Tremblade. Une analyse globale de l'expression de gènes liés à l'immunité sera réalisée à différentes périodes et à partir de divers tissus.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|--|-------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |
| <i>Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nurserie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de :</i> | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| Adultes | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003)

Communications congrès

Participation au IX congrès ISDCI (International Symposium on Developmental and Comparative Immunology) qui s'est tenu à St Andrew en Ecosse du 29 juin au 04 juillet 2003.

Deux communications orales :

- «Immunity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: characterization of a Rel/NF- κ B signalling pathway ».
- «Use of ESTs and Macroarray to isolate immune genes from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*».

Participation à la Réunion d'Immunologie de Invertébrés qui s'est tenu du 17 au 19 novembre 2003 au laboratoire Arago à Banyuls.

Une communication orale : « Etude de la réponse immunitaire chez *Crassostrea gigas* ; les premières évidences en faveur d'une cascade de type NF- κ B ».

Présentation de 3 posters :

- « Caractérisation et régulation de Cg-Timp, un inhibiteur de métalloprotéinase de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* ».
- « Identification de la première protéine de type LPS/BPI chez un invertébré, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Etude de l'expression du gène et caractérisation préliminaire de la protéine recombinante ».
- «Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. »

Un poster présenté par l'OGC (Oyster Genome Consortium) en janvier 2004 au congrès de la PAG à San Diego (USA) « Current state of Oyster (*Crassostrea*) functional genomic resources ».

Publications

Montagnani C., F. Le Roux, F. Berthe, J.M. Escoubas - 2001. Cg-Timp, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. FEBS Letters, 500:64-70.

Gueguen Y, J.P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A.L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachère, J.M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003 16:139-145.

Barreau-Roumiguère C., C. Montagnani, J.M. Escoubas - 2003. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 793-800.

Montagnani C., C. Kappler, J.M. Reichhart, J.M. Escoubas - 2004. *Cg-Rel*, the first Rel/NF- κ B homologue characterized in a mollusc, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Sous presse dans FEBS letters.

3 - Moyens affectés au projet

- Analyse et purification de protéines : Chromatographies Basse et Haute Pression, électrophorèse, lyophilisateur. Dans le cadre de la génopole Montpellier, possibilité d'analyses en spectrométrie de masse et séquençage en acides aminés.

- Equipement de base pour les techniques de biologie moléculaire : caractérisation de gènes immunitaires et analyse de leur expression (northern-blot, hybridation in situ, RT-PCR). La proximité de la Génopole de Montpellier ainsi que la collaboration avec MUSC aux USA permet l'accès aux techniques de type macro/microarray. La PCR en temps réel sera réalisée dans le cadre de l'IFR 122.

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|----------------------|----------------|---------------------|
| Viviane Boulo | C | 10 mois |
| Jean Michel Escoubas | C | 6mois |
| Evelyne Bachère | C | 6 mois |
| Yannick Guegen | C | 6 mois |

Demande budgétaire

Inchangée

Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR - Plouzané

Adresse : Université de Bretagne Occidentale
Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopole Brest Iroise
LEMAR (Laboratoire des sciences de l'environnement marin)- Equipe IHP
Place Nicolas Copernic
29280 Plouzané France

Responsable : Christophe LAMBERT

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet : Evaluation et modulation des paramètres hématocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

1 - Descriptif de l'activité

L'équipe "interaction hôte-pathogène" (IHP) du LEMAR, est spécialisée dans l'étude des mécanismes fins des interactions hôte-pathogène chez les bivalves marins et de leur modulation par l'environnement. Dans ce cadre, elle développe des outils d'évaluation des paramètres hématocytaires des bivalves

Introduction - bilan 2003

Au cours de l'année 2003, dans le cadre du programme Morest, L'équipe IHP du LEMAR a mené un certain nombre d'actions :

WP1 : mise au point d'outils, Tâche 1.3 Immunologie : On notera tout d'abord les résultats obtenus par Mlle Marine Jegaden au cours de son stage de DEA, démontrant la validité de la technique du DCFH-DA par cytométrie en flux pour évaluer l'activité « respiratory burst » des hématocytes de *Crassostrea Gigas*. Son travail a également permis de mettre au point et d'utiliser en routine les produits extracellulaires (ECP) d'un *Vibrio aestuarianus* souche 32 pour l'activation du « respiratory burst ». Ces ECP sont extraits d'une souche pathogène de l'huître creuse, isolée au cours d'épisodes de mortalité par l'équipe de microbiologie du LPI. Des travaux d'inter-calibration des outils de cytométrie en flux ont été menés conjointement au LGP, La Tremblade et au LEMAR permettant une meilleure compréhension des techniques utilisées par les différentes équipes. Enfin, toujours dans le cadre du **WP1**, nous avons reçu au LEMAR pendant 1 mois, le Dr A.Volety de la Florida Gulf Coast University, pour réaliser le transfert et la mise au point du test du « Killing Index » sur l'huître creuse. Enfin, une technique de double marquage (iodure de propidium/ :Sybr-green) développée par P. Soudant nous a permis de réduire les volumes d'hémolymphe nécessaire aux analyses en regroupant sur un échantillon unique les paramètres hématocytaires descriptifs (concentration, morphologie) et la mortalité hématocytaire.

Dans le cadre du **WP2 - Caractérisation des mortalités estivales in situ; Tâche 2.1 - Effet génétique**, en association avec l'équipe RSA (réponse au stress et adaptation) du LEMAR, nous avons analysé les paramètres hématocytaires individuels de 90 huîtres de troisième génération dont le génotypage a été réalisé pour la PGM (phosphoglucomutase). Les résultats sont en cours d'analyse et doivent permettre de mettre en évidence un éventuel lien génotype-phénotype.

Dans le cadre de la **WP2 : Tâche 2.2 Etude interdisciplinaires in-situ des mortalités; Sous-tâche 2.2.1 (BERAY) comparaison inter-site de la dynamique de reproduction et des mortalités de "R" et "S", G2 et G2 bis et triploïdes sur deux sites (baie des Veys et Auray)**. Nous avons suivi les paramètres hématologiques de lots sélectionnés "R", "S" (G2, 18 mois) et triploïdes (18 mois) sur 2 sites (baie des Veys et Auray) au cours de l'été 2003. Ce suivi a permis de confirmer la forte influence de l'environnement sur ces paramètres, avec notamment des différences entre la baie des Veys et les sites « Sud », différences régulièrement retrouvées en 2001, 2002 et 2003 (concentration hématologique supérieure, densité des granulocytes inférieure, taille des granulocytes supérieure, activité « respiratory burst » des granulocytes supérieure et sensibilité moindre des hématocytes à l'action cytotoxique du *Vibrio* sp. S322 sur la capacité d'adhésion). Ce suivi a également confirmé que la période de maturation sexuelle est une période de modification des paramètres hématologiques, modifications plutôt négatives (baisse du taux de phagocytose par ex.). Par contre, comme en 2002, très peu de différences ont pu être mises en évidence entre les lots "R" et "S", absence de différence qui a été reliée à un faible différentiel de mortalité entre les deux lots (<10%) et une mortalité globale faible en 2003 sur ces animaux (G2, 18 mois). En 2003, les lots de triploïdes ont présenté des paramètres hématologiques semblables à des lots sensibles ayant subi de fortes mortalités (taux de phagocytose et concentration hématologique bas, mortalité hématologique élevée) avec de fortes modifications au moment de la période de maturation. Ces paramètres sont reliés à des fortes mortalités ainsi qu'une maturation sexuelle atypique en 2003 sur les lots de triploïdes étudiés.

Dans le cadre de la **WP3 : Expérimentation phase I, découplage des paramètres environnementaux, Tâche 3.1 : GiGAREPRO II**

a) *Effet de la quantité de nourriture et de la température sur le statut immunologique de familles "R", "S", nous avons suivi les paramètres hématologiques d'avril à septembre de deux lots d'huîtres "R" et "S", soumis à deux niveaux trophiques CN1 et CN3 correspondant à 4 et 12% de poids sec d'algues par jour et par gramme de poids sec d'huîtres. La température est contrôlée et suit un cycle type Marennes. Les résultats majeurs montrent que les paramètres hématologiques varient fortement au cours de la période. D'autre part, on observe une synthèse de molécules d'oxygène actif (Respiratory burst) très supérieure chez les familles "S" au cours de la maturation sexuelle comparée aux lots "R". Enfin, au moment du maximum de maturation gonadique, les animaux les plus nourris (CN3) présentent des hématocytes dont la capacité d'adhésion sur surface solide est plus sensible à l'activité cytotoxique des produits extra-cellulaires de la souche *Vibrio aestuarianus* n°32.*

Descriptif des actions par WP

Pour l'année 2004, l'équipe IHP du LEMAR se propose de réaliser quatre actions majeures, auxquelles s'ajoutent une action de mise au point d'outils, une action de traitement de données déjà acquises et enfin deux actions dans le WP8, «gestion et organisation du projet», pour répondre aux objectifs du programme Morest.

WP1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.3 - Immunologie

Dans le cadre du stage de maîtrise de Mlle Nathalie Byrne, nous développerons la mise au point du protocole du «killing index» (Volety *et al.*, 1999) notamment par l'utilisation d'une nouvelle souche bactérienne pour le test de routine et l'obtention d'une souche antibio-résistante, pour éliminer les problèmes de contamination bactérienne de l'hémolymphe rencontrée lors de l'utilisation de ce test en 2003.

- Résultat attendu : La mise au point d'un protocole précis, utilisant une souche bactérienne antibio-résistante, nous permettra l'application en routine du test du killing-index sur les lots d'huîtres analysés, permettant d'élargir notre compréhension des mécanismes de défenses de l'hôte en

fonction des conditions environnementales ou de la sélection génétique des familles résistantes et sensibles.

Volety, Aswani K. Oliver, Leah M. Genthner, Fred J. Fisher, William S. (1999). A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 172, 205-222.

Calendrier d'exécution

| WP1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*,

Tâche 2.1 - Effet génétique

Sous-tâche 2.1.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de marqueur génétique

La mise en commun avec l'équipe RSA (réponse au stress et adaptation) du LEMAR des résultats obtenus en 2003 sur des huîtres génotypées pour la PGM et dont les paramètres immunologiques ont été analysés sera poursuivie. Des actions complémentaires ponctuelles de mise en parallèle de données génotypiques et phénotypiques déjà acquises sur des familles communes pourraient également être envisagées.

Résultat attendu : L'analyse en parallèle de génotype et phénotype pourra permettre une meilleure compréhension du phénomène de sélection génétique.

Partenaire : LEMAR, équipe RSA

Calendrier d'exécution

| WP2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 2.1 | | | | | | | | | | | | |
| Sous-tâche 2.1.4 | | | | | | | | | | | | |

WP3 - Expérimentation phase I, "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités.

Tâche 3.2 - Energétique et température : définition des conditions limites.

Sous-tâche 3.2.2 - adulte, VALI.

De manière à mieux comprendre l'évolution des paramètres hématocytaires d'animaux soumis à un stimulus (stress thermique) en conditions critiques (maturation, > 19°C), l'évolution à court terme (jours) de ces paramètres sera suivie sur des huîtres "R" et "S" (G3SD) de 1 an (actuellement à la SATMAR) soumises à un stress au moment de leur pleine maturité et dans des conditions thermiques autour de 19°C.

Matériel et méthode

Dans l'état actuel de notre réflexion, ces protocoles ne sont présentés qu'à titre provisoire, toutes les contraintes techniques, pratiques et de personnel n'ayant pas encore été traitées. D'autre part, la liste des paramètres analysés sera adaptée à chaque type d'expérimentation en fonction de leur pertinence par rapport à l'objectif fixé.

Cadre général

L'analyse de l'état du système immunitaire est réalisée à partir de l'hémolymphe prélevée dans le muscle de l'animal vivant à l'aide d'une seringue, au travers d'une encoche. Un lot peut être caractérisé par trois pools constitués chacun de l'hémolymphe d'au moins 5 huîtres ou individuellement à partir de l'hémolymphe d'une vingtaine d'huître.

Les mesures suivantes sont réalisées par cytométrie en flux : comptage des hémocytes circulants, typage hémocytaire, production de radicaux libres de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène, H₂O₂) avec ou sans activation (fraction extra-cellulaire de la souche *V. aestuarianus* 32), inhibition de la production de H₂O₂ par un *Vibrio* pathogène (souche sélectionnée *Vibrio* sp., souche S322), activité type lysozyme, phagocytose, viabilité, sensibilité de la capacité d'adhésion des hémocytes au *Vibrio* sp. S322 ou à la fraction extra-cellulaire de la souche *V. aestuarianus* 32 (test d'adhésion).

Résultat attendu

Cette expérience doit nous permettre de confirmer la validité du modèle de mortalité estivale construit au cours des premières années du programme et de confirmer ou non la meilleure survie des animaux sélectionnés comme résistants. Elle devrait également permettre de suivre les variations des paramètres hémocytaires en cas de stress en période critique, informations importantes pour l'interprétation des données de suivi terrain accumulées jusqu'ici.

Partenaires : LPI, DRIM, LCB.

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.2 | | | | | | | | | | | | |
| Sous-tâche 3.2.2 | | | | | | | | | | | | |

Sous-tâche 3.2.3 - Effet de la qualité de la ressource trophique

L'effet de la quantité de l'apport trophique sur les paramètres hémocytaires a été documenté au cours de plusieurs expériences dans le cadre de Morest et de la thèse de Maryse Delaporte.

- 1) Pour préciser le rôle qualitatif des apports lipidiques, les paramètres hémocytaires d'huîtres "R" et "S" (lot G3SD, 1 an) seront suivis à court (jours) et moyen terme (semaines) en fonction de régimes alimentaires supplémentés en acides gras, 20 :4(n-6).
- 2) Dans le cadre de la thèse d' Hélène Hégaret, co-tutelle UCONN/ENSAR, et en collaboration avec Patrick Lassus du Département Microbiologie et Phycotoxines, Ifremer Nantes, les paramètres hémocytaires d'huîtres soumises en milieu contrôlé à un bloom phytoplanktonique toxique (*Alexandrium catenella*, souche ATTL01 ou ATTL02) seront suivi en cinétique.

Matériel et méthode : cf. cadre général (§ 0, p 75).

Résultat attendu : L'évolution des paramètres immunitaires en fonction de la qualité des apports trophiques (acides gras ou algues toxiques) doit nous permettre de mieux appréhender les interactions entre environnement et système de défense des huîtres creuses.

Partenaires : LPI, Brest ; DEL D^{pt} Microbiologie et Phycotoxines, Nantes.

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.2 sous-tâche 3.2.3 | | | | | | | | | | | | |

Tâche 3.3 - Stress

Sous-tâche 3.3.2 - Hypoxie/anoxie

Le but de cette expérimentation est d'observer et de mesurer à court terme la réponse immunitaire des huîtres à une baisse de l'oxygène dans le milieu. Pour cela des huîtres sont disposées dans des bacs de type MAREL autorisant un contrôle multiparamétrique (T°C, S‰, O₂, turbidité...) et soumis à des conditions d'hypoxie (2 mg O₂/L) ou d'anoxie pendant 24h00. Un contrôle en normoxie est suivi en parallèle. Les paramètres hématocytaires des huîtres sont suivis à T₀, T= 24h et T= 3 jours.

Matériel et méthode : cf. cadre général (§ 0, p 75).

Partenaires : Ifremer Brest - DRV/RA/UMR/PE2M

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.3 sous-tâche 3.3.2 | | | | | | | | | | | | |

Tâche 3.5 - Modèle d'infection

Sous-tâche 3.5.2 - Facteurs de virulence

Les premiers travaux de Yannick Labreuche au cours de sa thèse ont montré clairement le rôle des produits extra-cellulaires de la souche 32 de *V. aestuarianus* comme facteur de virulence. Une forte activité immuno-modulatrice (respiratory burst, test d'adhésion) de ces produits a été montré sur les hémocytes de *Crassostrea gigas*. Des essais complémentaires seront menés pour mieux comprendre les modes d'actions de ces produits, extra-cellulaires notamment en testant les fractions obtenues par passage sur colonne de gel-filtration. L'utilisation de culture primaire d'hémocytes pourra également permettre de tester rapidement la virulence de ces fractions en fonction des conditions de culture de la bactérie (T°C, S‰, phase de croissance...).

Résultat attendu : La recherche de facteur de virulence bactérienne ainsi que la modulation de cette virulence en fonction des paramètres abiotiques doit permettre de mieux comprendre les modes d'action d'un pathogène bactérien opportuniste et de les intégrer dans le modèle explicatif Morest.

Partenaires : Ifremer Brest - DRV/RA/UMR/PE2M

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.5 sous-tâche 3.5.2 | | | | | | | | | | | | |

WP8 - Gestion et organisation du projet

Tâche 8.1 - Coordination

Le responsable du projet Morest au sein de l'équipe IHP investira du temps pour participer aux réunions de coordinations du projet (COPIM) en temps qu'animateur thématique «immunologie» et co-animateur de la tâche WP3.

Calendrier d'exécution

| WP8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 8.1 | | | | | | | | | | | | |

Tâche 8.3 - Rapport et publications

Des actions de réflexions collectives et de mise en commun autour de la rédaction de publications seront poursuivies dans l'objectif de soumettre un manuscrit sur les résultats obtenus dans le cadre de l'expérience BABE en 2002, et ce en regroupant un maximum d'intervenants du programme MOREST.

Calendrier d'exécution

| WP8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 8.3 | | | | | | | | | | | | |

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Tripløide RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| effet de la qualité de la ressource trophique | 3.2.3 | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle pathol/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypol/hyperoxie, H2S, NH3....</i> | 3.3.2 | |

| | | |
|---|-------|--|
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| <i>Juveniles</i> | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP8. Gestion et organisation du projet | | |
| Coordination | 8.1 | |
| Gestion financière du projet | 8.2 | |
| Bilan, programmation, rapports et publications | 8.3 | |
| Evaluation | 8.4 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 : 2.1.4 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 : 3.2.2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 : 3.2.3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 : 3.3.2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 : 3.5.2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 8 : 8.1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 8 : 8.3 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Publications

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet and C. Paillard (2003). Measurement of *Crassostrea gigas* hemocytes oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15(3), 224-240.

Delaporte M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quéré, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard & J.-F. Samain (2003). Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206 (17) 3053-3064

Choquet G., P. Soudant, C. Lambert, J.-L. Nicolas and C. Paillard (2003). Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 57, 109-116.

Hégaret H., G.H. Wikfors, P. Soudant (2003). Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions; aggregation, viability, phagocytosis and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249-265.

Hégaret H., G.H. Wikfors, P. Soudant (2003). Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 237-248.

Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J.L. Nicolas and F. Berthe (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*- related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic living resources* 15, 251-258

Hégaret, H., G.H. Wikfors, P. Soudant, M. Delaporte, J.H. Alix, B.C. Smith, M.S. Dixon, J.R. Le Coz, C. Paillard, J. Moal, J.-F. Samain Immunological competence of eastern Oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and Challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* (in press)

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Gouy, M. and Berthe F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *GyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms.* (in press).

Congrès avec abstracts publiés

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Degrémont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnières, A. Huvet, J.F. Samain (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, 22: 339.

Moal J., E. Bédier, P.G. Fleury, A. Langlade, Lecoguic, L. Degrémont, P. Boudry, J.R. Le Coz, S. Pouvreau, M. Enriquez Diaz, C. Lambert, P. Soudant, J.F. Samain (2003). Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 22: 345.

Delaporte M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert (2003). Impact of environmental and nutritive conditions on defense mechanisms of oysters during an annual cycle. *Journal of Shellfish Research*, 22: 327.

Gay M., G. Lancelot, Chollet, T. Renault, N. Cochennec, F. Berthe, C. Lambert, G. Choquet, C. Paillard, Gouy, F. Le Roux, P. Gouletquer (2003). Characterization of *vibrio* isolated from Pacific oysters' spat suffering from summer mortality outbreaks. *Journal of Shellfish Research*, 22: 331.

Choquet G., P. Soudant, C. Lambert and C. Paillard, Measurement of *Vibrio tapetis* cytotoxic activity on *Ruditapes Philippinarum* Hemocytes by flow cytometry. National Shellfish Association Workshop, Mystic, USA, April 2002.

Delaporte M., **P. Soudant**, J. Moal, **C. Lambert**, C. Quere, **G. Choquet**, J.R. Le Coz, **C. Paillard**, J.-F. Samain. Effect of dietary fatty composition on lipid profiles of hemocyte membranes in oysters and clams and its impact on immune functions. National Shellfish Association Workshop, Mystic, USA, April 2002.

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet and C. Paillard Development of a flow cytometric measurement of oxidative metabolism product formation by *Crassostrea gigas* hemocytes and application to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. National Shellfish Association Workshop, Mystic, USA, April 2002.

Soudant, P. , C. Lambert, G. Choquet, S. Ford and **C. Paillard**, L. Degremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.-P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet and J.-F. Samain . Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. National Shellfish Association Workshop, Mystic, USA, April 2002.

Communications

Delaporte M., **P. Soudant**, J. Moal, **C. Lambert**, F.L. Chu, C. Langdon & J.F. Samain (2003) Relation entre nutrition et immunologie chez deux espèces de bivalves: l'huître *Crassostrea gigas* et la palourde *Ruditapes philippinarum*.. 1^{er} congrès de Lipidomique. Diversité moléculaire et physiopathologie. Paris, France, Septembre 2003.

Delaporte, M., **C. Lambert, P. soudant, M. Jegaden**, J. Moal, **G. Choquet C. Paillard**. (2003) Suivi immunologique en milieu contrôlé de deux populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, sélectionnées sur leur capacité variable de survie estivale sur l'estran. Séminaire Morest, La Rochelle, 26-28 Novembre 2003.

Lambert C., **P. Soudant**, M. Jegaden, M. Delaporte, J. Moal, **G. Choquet C. Paillard**. (2003) Suivi immunologique sur deux sites d'élevage de deux populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, sélectionnées sur leur capacité variable de survie estivale sur l'estran.. Séminaire Morest, La Rochelle, 26-28 Novembre 2003.

Lambert C. (2003) Bilan synthèse des résultats obtenus en immunologie au cours des 3 premières années du programme Morest. Séminaire Morest, La Rochelle, 26-28 Novembre 2003.

Rapports

Rapport Final ; Contrat d'étude : Ifremer / LEMAR ; N°externe : IF 01.2.521.409 ; Convention UBO KCP6 ; **septembre 2001** : Caractérisation immunologique de l'huître creuse : mise au point de méthodes. **Christophe Lambert, Philippe Soudant, Gwénaëlle Choquet and Christine Paillard**. 23 pp.

Rapport Final ; Contrat d'étude : Ifremer / LEMAR ; N°externe : IF 02.2.500013 ; Convention UBO KCP7 ; **Mars 2003** ; Evaluation et modulations des capacités immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme Morest. **Christophe Lambert, Philippe Soudant, Gwénaëlle Choquet, Stéphane Frouel et Christine Paillard**. 105 pp.

Rapport Intermédiaire ; Contrat d'étude : Ifremer / LEMAR ; N°externe : IF 03.2.500015 ; Convention UBO KCL2 ; **Décembre 2003** ; Evaluation et modulations des capacités immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme Morest. **Christophe Lambert, Philippe Soudant, Marine Jegaden, Gwénaëlle Choquet, et Christine Paillard**. 82 pp.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Christine Paillard | C (cnrs) | 1 |
| Philippe Soudant | C (cnrs) | 6 |
| Christophe Lambert | C (contractuel UBO) | 10 |
| Hélène Hégarret | thèse co-tutelle UCONN/ENSAR | 2 |
| Patrícia Mirella da Silva Scardua | Thèse Espagne | 1 |
| Nathalie Byrnes | stagiaire maîtrise | 1 |

Demande budgétaire

La demande budgétaire reste constante au cours du projet. Aucune modifications pour 2004.

pour info : demande budgétaire pour 4 ans

| Laboratoires | Catégorie | H mois/an | Total 1-4 ans | CDD 4 ans | Thèse 3 ans | missions / an | consommable /an | Prestation /an | Gestion* fonctionnemen t général /an | Total 2, 4 ans | Fonctionne ment, 4ans | Total 1, coûts permanents déjà financés | du total 2, coûts additionnels déjà financés | du total 2, coûts additionnels restant à financer | Total 3, Investissem ent | Total 4, acquis | Total 3-4, restes à financer | Total demande, 4 ans (Euros) |
|--------------|--------------------|-----------|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------------|----------------|--------------------------------------|----------------|-----------------------|---|--|---|--------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| UBO-LEMAR | CR1 | 1 | 377769 | 121959 | | 1524 | 7622 | 0 | 75554 | 460758 | 838527 | 377769 | 302215 | 158543 | 0 | 0 | 0 | 158543 |
| Immuno | CR2 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Brest | thèse | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Stagiaire Maîtrise | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Université de la Rochelle - LBME

Adresse : Université de La Rochelle, LBEM
Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) FRE 2727 CNRS
Avenue Michel CREPEAU
17042 La Rochelle, France

Responsable : Pr. Gérard BLANCHARD

Fiche Programme Morest 2004

WP 1 - Mise au point d'outils : Mise au point d'outils immunologiques
Participants : Nathalie IMBERT et Hélène THOMAS-GUYON

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

Le LBEM s'est proposé d'étudier les capacités immunitaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (1) en explorant une activité enzymatique de type phénoloxydase, suspectée d'intervenir dans la réponse immunitaire des mollusques bivalves marins et (2) en étudiant les mouvements calciques impliqués dans le fonctionnement des hémocytes, cellules immunocompétentes.

L'objectif est de mieux comprendre la réponse immunitaire à l'échelle cellulaire et moléculaire chez l'huître creuse. Dans ce contexte, la quantification de l'activité de type phénoloxydase (PO), par spectrophotométrie, est réalisée dans le but (1) d'étudier le déclenchement de l'activation du système pro-Phénoloxydase pro-PO-PO chez l'huître creuse *in vitro*, et (2) de caractériser le potentiel immunitaire de différentes familles d'huîtres *in vivo* et *in situ*. La PO prend une part active dans les mécanismes de défense par le biais de la catalyse de la réaction d'oxydation intervenant dans les processus de réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation (Söderhäll et Smith, 1983). Il semble que le système pro-PO-PO existe également dans l'hémolymphe des mollusques tels que la mye (*Mya arenaria* Linné), la moule commune (*Mytilus edulis*) et la patelle commune (*Patella vulgata* Linné) (Smith et Söderhäll, 1991 ; Coles et Pipe, 1994). Cependant, les connaissances sur le rôle joué par le système de la proPO-PO dans les mécanismes de défense restent parcellaires chez les mollusques (Luna-Gonzales, A, 2003). L'étude réalisée en 2003 nous a permis de mettre en évidence que l'activité de type PO, recherchée en spectrophotométrie, est maximale après 24 heures d'incubation avec le substrat (L-dopa), pour les divers stades de développement de l'huître creuse : embryons (6h après fécondation), larve (J8, J11, J13, et J15), naissain et adulte. Ces résultats suggèrent l'existence de la PO à un stade précoce du développement de l'huître creuse, ce qui n'avait jamais été démontré jusqu'à maintenant. Le clonage du cDNA de la phénoloxydase, actuellement entrepris en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Bio-organique (LBCB FRE2706 CNRS) de l'Université de La Rochelle, permettra par la suite d'étudier les modulations d'expression de ce gène vis-à-vis des polluants, et permettre ainsi le développement d'un éventuel bio marqueur de type immunologique. Les résultats provenant des expériences DYNAMO et DYNAMOR révèlent une faible activité enzymatique de type phénoloxydase des cheptels diploïdes durant la phase active de gamétogénèse et cela dans les premiers jours du mois de juin (par opposition aux triploïdes pour lesquels l'activité de ce descripteur est plus élevée). Dans ce contexte, une thèse est actuellement menée en collaboration entre le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP, station IFREMER de La Tremblade, Charente Maritime) et le Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM, FRE 2727 CNRS,

Université de La Rochelle, Charente Maritime) : ce travail porte sur l'étude des effets de polluants chimiques vis-à-vis du système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : environnement et immunotoxicité, une clé pour comprendre les phénomènes de mortalités estivales.

L'objectif de l'étude sur le calcium est de caractériser, dans un premier temps, les mouvements calciques impliqués dans le fonctionnement des cellules immunitaires de l'huître creuse. En effet, le calcium est un second messager ubiquitaire qui assure la transduction de nombreux signaux membranaires (Clapham, 1995); par conséquent, la mobilisation du calcium est un bon indicateur du fonctionnement des cellules. L'étude sur l'homéostasie calcique a été abordée grâce à deux techniques complémentaires : la cytométrie de flux permettant d'étudier qualitativement le calcium sur une population de cellules et la photométrie permettant d'étudier qualitativement, mais également quantitativement, les mouvements calciques sur cellule isolée. L'étude réalisée en 2003 a permis de mettre en évidence des variations de calcium intrahémocytaires qui semblent sensibles à certains modulateurs calciques, en particulier ceux agissant sur les stocks calciques internes. Il s'agit maintenant de standardiser la quantification des variations de calcium et d'arriver à faire le lien entre ces augmentations de calcium intracellulaires et une ou des fonctions hémocytaires.

Deux actions :

Action 1 - Détection et quantification de l'activité enzymatique de type phénoloxydase dans l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Introduction

Le but de notre action est de mieux connaître le système Pro-Phénoloxydase, soupçonné d'intervenir dans le fonctionnement du système immunitaire des mollusques bivalves, d'une part, en réalisant le suivi de l'activité de type phénoloxydase pour caractériser le potentiel immunitaire de différentes familles d'huître et, d'autre part, en évaluant les effets induits sur ce paramètre hémolympatique notamment par des variations environnementales (température : théorie du changement global) et les polluants (pesticides, métaux lourds) chez *Crassostrea gigas*.

Les objectifs :

- d'évaluer l'activation du système Pro-PO à divers stades du développement de l'huître creuse *in vitro*,
- d'étudier le déclenchement de l'activation du système Pro-PO chez *Crassostrea gigas* en présence de substances stimulatrices et inhibitrices *in vitro*,
- de cloner le cDNA de la phénoloxydase,
- de réaliser le suivi de l'activité enzymatique de type PO de diverses familles d'huître *in situ*,
- d'étudier les effets induits par des polluants ou des variations environnementales (température) vis-à-vis de l'activité enzymatique de type PO ainsi que de l'expression du gène codant pour cette enzyme chez *Crassostrea gigas*.

Les premiers résultats obtenus concernent l'exploration de l'activité de type PO à différents stades du développement de l'huître creuse. La quantification de l'enzyme de type PO a été testée en activité spontanée et en présence de différents activateurs (trypsine purifiée (TPCK), LPS, zymosan, laminarine) et inhibiteurs (PTU, tropolone, benzamidine, Diethylthiocarbamate, béta2-mercaptoéthanol) de l'enzyme décrits dans la littérature. L'expression de l'activité de type PO diminue considérablement à J11 au stade larvaire : ceci est constaté pour toutes les conditions testées (activité enzymatique de base, dite spontanée et activité stimulée en présence de TPCK et des LPS). Ne pourrait-on pas relier la diminution de ce paramètre hémolympatique détectée à J11 au critère "mortalité estivale" des huîtres creuses ? L'exploration de l'activité de type PO sur des larves du programme Morest 2003 est actuellement en cours d'analyse pour confirmer ces études préliminaires. De plus, nos résultats suggèrent deux mécanismes différents du déclenchement du système proPO-PO au cours du développement de la larve d'huître creuse *Crassostrea gigas* : les LPS semblent stimuler de manière précoce l'activité de type PO (J8 et J11) alors que la TPCK activerait en phase finale du développement larvaire (J13 et J15). Enfin, ces résultats en

spectrophotométrie suggèrent l'existence de la PO à un stade précoce du développement (embryon 6h) de l'huître creuse, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant. Un certain nombre de données ont été obtenues dans le cadre des expériences *in situ* DYNAMO et DYNAMOR : dans ces études, il a été constaté une faible activité enzymatique de type phénoloxydase des cheptels diploïdes durant la phase active de gamétogénèse et cela dans les premiers jours du mois de juin (par opposition aux triploïdes pour lesquels l'activité de ce descripteur est plus élevée). L'activité de type PO augmente ensuite durant la deuxième partie de la phase de "vitellogenèse active" et "attente de ponte". Ce paramètre biologique évolue sensiblement de la même manière que l'activité de phagocytose décrite pour les mêmes groupes d'animaux et sur les mêmes périodes. En revanche, pour l'activité de type PO, il n'est constaté aucun effet dû à l'environnement. Le suivi de ce paramètre hémolympatique sur une longue période de temps apporte des informations sur la connaissance fondamentale du système de défense des mollusques bivalves. De plus, certaines relations semblent apparaître pour les triploïdes : ces animaux qui ne mûrissent pas sont ceux qui présentent le moins de mortalité sur estran et qui possèdent des niveaux d'activités phénoloxidasiques supérieurs aux autres cheptels pendant la première phase de "vitellogenèse active". En effet, la maturation est liée aux conditions d'élevage et, de ce fait, il pourrait exister des interactions complexes entre maturation et capacités immunitaires du coquillage. De plus, sans la maturation, la quantité d'énergie allouée aux mécanismes de défense peut être plus importante : les niveaux d'activités phénoloxidasiques sont supérieurs pour les triploïdes pour cette courte période située entre le 15 mai et le 13 juin 2002. La valorisation de ces données sera considérée cette année et cela, en les comparant avec d'autres paramètres immunitaires sélectionnés dans ces approches expérimentales *in situ*.

Les résultats préliminaires concernant WP3. Tâche 3.2. Effets perturbateurs des pesticides et anoxie (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress, nous observons dans le cas de conditions d'oxygène normales une variation de l'activité de type PO au cours du temps (J3 et J7) chez l'huître *in vivo*. En cas de stress respiratoire (hypoxie), on note une diminution de l'activité de type PO au cours du temps par rapport aux conditions dites normales. Les variations temporelles de ce paramètre biologique, dans les deux conditions expérimentales, ne seraient liées ni à l'origine génétique, ni aux pesticides. Ces résultats seront confirmés cette année dans le cadre de l'expérience de février 2004 menée dans les mêmes conditions.

Objectifs 2004

WP1.3 - Poursuivre l'étude de l'activité enzymatique de type PO en spectrophotométrie à divers stades du développement de l'huître creuse : une recherche de l'expression de ce paramètre biologique sera effectuée pour confirmer la chute de l'activité PO à J11 du stade larvaire de *Crassostrea gigas*. Ne pourrait-on pas relier la diminution de ce paramètre hémolympatique détectée à J11 et le critère "mortalité" des huîtres creuses au stade larvaire en période estivale ?

WP1.3 - Poursuivre l'étude de détection de l'activité de type PO sur cellules cyto-centrifugées. Cette étude pourrait être également abordée en microscopie électronique à transmission dans le but de préciser la localisation de l'enzyme de type PO dans les cellules d'huître creuse.

WP1.3 - Poursuivre l'étude du clonage du gène codant pour la phénoloxydase de l'huître creuse : cette partie de l'étude se déroule au LBCB (Université de La Rochelle, FRE2706 CNRS). Ce travail permettra l'étude de la modulation de l'expression du gène par des facteurs environnementaux (polluants, températures) dans le but de développer un bio-marqueur d'effet de type immunologique.

WP2.2.8 - Valoriser les résultats provenant des expériences DYNAMO et DYNAMOR (comparaison de différents paramètres hématocytaires).

WP2.2.10 - Effectuer le suivi de l'activité enzymatique de type PO pour étudier la modulation de ce paramètre hémolympatique vis à vis des facteurs environnementaux, notamment l'évolution des températures, et la qualité des ressources trophiques (approche couplée laboratoire/terrain) (collaboration avec S. Pouvreau, WP2, tâche 2.2.10).

WP3.3.1 - Réaliser le suivi de l'activité de type PO en spectrophotométrie sur des cheptels issus d'huîtres sensibles ou résistantes et éventuellement mises en présence de différents polluants (pesticides) et de pathogènes (*Vibrio* et Herpès virus) (collaboration avec T. Renault, WP 3, tâche 3.3.1).

Matériel et méthode

Ponction de l'hémolymphe : La ponction d'hémolymphe a été réalisée à travers la membrane péricardique, dans le sinus près du muscle adducteur. A ce niveau le cœur baigne dans l'hémolymphe. Une seringue de 1 ml munie d'une aiguille stérile de 25 mm de longueur et de 0.6 mm de diamètre sont utilisées pour ne pas léser les cellules. Les hémocytes sont conservés dans la glace le temps du prélèvement.

Détection d'activité phénoloxydase

Préparation des échantillons : L'activité phénoloxydase dans les échantillons d'hémolymphe et d'oreillettes a été évaluée.

- Les échantillons d'hémolymphe ont été centrifugés à 260 g pendant 10 minutes à 4°C (Microfuge 12, BECKMAN) de manière à séparer la fraction acellulaire sur laquelle les analyses ont porté.
- Les oreillettes ont été poolées. Elles ont subi une dissociation mécanique dans un l'homogénéiseur de Dounce : 1 mL de solution de tampon phosphaté (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) a été placé dans l'homogénéiseur, puis les oreillettes ont été broyées à l'aide du piston. Le broyat a été centrifugé à 2 000 g pendant 15 minutes à 4°C (Microfuge 12, BECKMAN), ensuite le surnageant a été récupéré (fraction acellulaire).

Recherche d'une activité de type phénoloxydase en spectrophotométrie

La recherche d'une activité de type PO dans l'échantillon (hémocytes d'huîtres creuses adultes) a été effectuée par mesure de la transformation de la L-Dopa (L-Dihydroxyphenylalanine, Sigma) en dopachromes. Cette réaction a été suivie par spectrophotométrie par lecture de densité optique (DO) à 490 nm. Les échantillons ont été distribués dans une microplaque adaptée au lecteur ELISA.

Différents substances modulatrices de l'activité de type PO ont été testés : trypsine purifiée TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, Sigma), lipopolysaccharides LPS (lipopolysaccharide d'*Escherichia coli*, Sigma), DiEthylThioCarbamate DETC (Sigma) à 10 mM, β -2 mercaptoéthanol (Sigma) à 10 mM et Tropolone (16 mM, Sigma).

Détection de l'activité de type phénoloxydase sur cellules cytocentrifugées

Les échantillons d'hémolymphe subissent une cyrocentrifugation (centrifugeuse Hettich, 30 x g, 1 min, 4°C), à raison de 100 μ L de suspension cellulaire. Pour chaque échantillon, trois lames ont été réalisées. Une lame histologique a été préparée pour l'observation directe en microscopie photonique. Elle est colorée à l'aide d'un kit Hémacolor (Merck). L'observation doit permettre d'apprécier la quantité et la qualité et des cellules. La lame histologique a ensuite été mise en présence d'une solution fixatrice de Davidson pendant 20 min à 4°C. Les échantillons ont ensuite été déshydratés par des bains successifs d'éthanol (deux bains en éthanol à 95% pendant 10min suivis de deux bains d'éthanol absolu pendant 10min). Après séchage les lames ont été utilisées pour réaliser l'induction de l'activité de type PO toute une nuit à l'obscurité. Une induction d'activité peroxydasique a été menée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats ont été observés au microscope optique.

Clonage du gène codant pour la phénoloxydase de l'huître creuse

Nous avons débuté le clonage du cDNA de la PPO par une stratégie de RT-PCR utilisant des amorces dégénérées. Ces amorces ont été choisies dans les régions conservées de la protéine par comparaison des séquences de PPO déjà publiées.

Résultats attendus

Cette étude nous permettra de mieux comprendre le déclenchement de l'activation du système Pro-PO-PO et cela à différents stades du développement de l'huître creuse dans les phénomènes de mortalité ou de survie des animaux d'élevage et de fournir des descripteurs de type immunologique des animaux, applicables dans des programmes de sélection ou pour une évaluation de l'état sanitaire des animaux. Cette étude est menée en collaboration avec le LGP de la Tremblade (T. RENAULT et B. GAGNAIRE) et le LCB de l'Université de La Rochelle (C. BARTHELLEMY).

La modulation du système immunitaire est devenue une voie de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets physiologiques de facteurs environnementaux (Oubella *et al.*, 1995 ; Gagnaire *et al.*, 2003 ; Gagnaire *et al.*, 2004). Dans ce contexte, nous évaluerons chez l'huître *Crassostrea gigas* la modulation de l'activité enzymatique de type phénoloxydase, qui est suspectée d'intervenir dans le fonctionnement du système immunitaire, vis à vis des polluants, de l'évolution climatique

(température et de la qualité des ressources trophiques). Cette partie de l'étude est menée en collaboration avec le LGP de la Tremblade (T. Renault et B. Gagnaire) et le CREMA de l'Houmeau (M. Alluno-Bruscia)

Action 2 - Caractérisation et quantification des flux calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Introduction

Le but de notre action est de comprendre le fonctionnement des hémocytes en nous intéressant au calcium intracellulaire, ion essentiel à la réalisation de nombreuses fonctions cellulaires dont la fonction immunitaire (456+Winslow et al., 2003). (WP1.3)

Les objectifs sont :

- d'identifier les protéines «canaux» et les organites impliqués dans les mouvements ioniques,
- faire le lien entre ces mouvements de calcium et une ou des fonctions hémocytaires,
- déterminer au final comment certaines substances comme les polluants ou des variations environnementales peuvent modifier le fonctionnement de ces cellules en agissant sur les acteurs de l'homéostasie calcique hémocytaire.

Les premiers résultats obtenus en combinant la cytométrie de flux (collaboration avec le LGP La Tremblade) et la cytofluorimétrie/microscopie confocale ont permis de mettre en évidence l'importance du milieu d'incubation pour ces deux techniques (Aton, *in prep*). Nous nous sommes ainsi focalisés en 2003 sur la mise au point des protocoles expérimentaux nous permettant d'étudier l'homéostasie calcique dans les meilleurs conditions. Une partie du travail a, en particulier, porté sur l'étude comparative en cytométrie de flux (au LGP, La Tremblade) de différents paramètres hémocytaires lorsque ces cellules sont étudiées dans l'hémolymphe ou dans l'eau de mer. Si la mortalité est diminuée lorsque les hémocytes sont incubés dans l'eau de mer artificielle, un certain nombre d'activités enzymatiques sont significativement modifiées : les aminopeptidases sont diminuées tandis que les estérases sont augmentées. Le pourcentage de cellules présentant une activité de type phagocytose est également diminué. Un suivi du calcium intracellulaire a également été réalisé grâce à ces deux techniques et a permis de démontrer l'existence de flux ioniques, semblant impliquer des stocks calciques internes sensibles à la ryanodine. Les premières expérimentations visant à faire le lien entre le calcium intracellulaire et une fonction hémocytaire montrent que la phagocytose est significativement diminuée en présence d'un chélateur de calcium tel que le BAPTA, mais uniquement lorsque les hémocytes sont incubés en eau de mer. En parallèle, l'étude réalisée en photométrie a permis de quantifier les variations de calcium dans des cellules isolées. Cependant, un certain nombre de problèmes techniques restent à résoudre quant à la transposition de techniques, mises au point et largement appliquées sur des cellules de mammifères, à des cellules de mollusques.

Objectifs 2004

- Poursuivre l'étude de l'homéostasie calcique en cytométrie de flux : cette étude a l'avantage de pouvoir étudier des paramètres calciques sur une population d'hémocytes, permettant ainsi de s'affranchir des variabilités individuelles et de faire le lien entre certaines populations d'hémocytes et les informations recueillies sur le calcium. L'étude du lien possible entre le calcium intracellulaire et certaines fonctions hémocytaires, telles que la phagocytose ou certaines activités enzymatiques, sera poursuivie. De plus, certaines substances connues pour agir sur les hémocytes, telles que la noradrénaline, principale hormone libérée durant le stress (Lacoste et al., 2001) seront également testées. Cette partie de l'étude se déroule au LGP, La Tremblade.
- Aborder en cytométrie de flux, les paramètres calciques sur des hémocytes issus d'huîtres sensibles ou résistantes et éventuellement mises en présence de différents polluants (pesticides) et de pathogènes (*Vibrio* et Herpès virus) (collaboration avec T. Renault et B. Gagnaire, LGP La Tremblade, WP 3, tâche 3.3.1)
- Poursuivre l'étude en cytofluorimétrie et microscopie confocale : cette partie de l'étude se déroule à l'IPBC (Université de Poitiers, UMR 6187, collaboration avec C. Cognard) et permet l'étude de l'homéostasie calcique sur cellule isolée. Le but de cette étude est d'arriver à quantifier le niveau basal de calcium dans les hémocytes mais aussi les variations de calcium. Il s'agit également de caractériser et ou préciser les protéines et molécules signalétiques impliquées dans le contrôle de ces flux ioniques. Comme nous l'avons précisé ultérieurement un certain nombre de problèmes pratiques concernant l'application de la technique à ce modèle cellulaire restent à résoudre.

Matériel et méthode

Ponction de l'hémolymphe : la ponction d'hémolymphe est réalisée à travers la membrane péricardique, dans le sinus près du muscle adducteur. A ce niveau, le cœur baigne dans l'hémolymphe. Une seringue de 1 ml munie d'une aiguille stérile de 25 mm de longueur et de 0.6 mm de diamètre est utilisée pour ne pas léser les cellules. Les hémocytes sont conservés dans la glace le temps du prélèvement.

Cytométrie de flux (Coulter EPICS XL 4) : L'hémolymphe est centrifugée (Beckman Coulter) pendant 10 minutes à 4°C à 1500 tours/minute. Le surnageant est éliminé dans sa majeure partie. La concentration en hémocytes du culot est évaluée par comptage en lame de Malassez. Le culot est ensuite repris dans de la Solution Physiologique (en mM : NaCl 458 ; KCl 10.5 ; CaCl₂ 10 ; MgCl₂ 28 ; MgSO₄ 22 ; HEPES 5 ; pH (Tris base) 7.4) ou dans l'hémolymphe de manière à obtenir 1 million de cellules/ml.

Brièvement : La cytométrie de flux consiste à étudier certaines caractéristiques physiques et chimiques de cellules ou de particules entraînées dans un flux liquide. Les cellules passent une à une devant un laser qui les excite à une longueur d'onde précise et émettent en réponse un rayonnement permettant de les caractériser. Ces informations sont obtenues, soit de manière directe par diffraction de la lumière, soit de manière indirecte lorsque des marquages sont réalisés (fluorochromes, anticorps monoclonaux et polyclonaux). Les paramètres suivants sont étudiés : la viabilité des cellules est testée grâce à l'iodure de propidium ; la phagocytose est testée grâce à des billes synthétiques de 1 µm de diamètre marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; l'activité des estérases est déterminée grâce à l'utilisation du kit « Cell Probe fluorescéine diacetate (FDA) Esterase » (Beckman Coulter).

Cytofluorimétrie (OSP 100 Olympus) : Les hémocytes, ensemencés dans des boîtes de Pétri (35 mm) sur fond en verre sont incubés en présence d'une sonde fluorescente calcique (Indo-1-AM (Sigma, préparé dans le DMSO)) pendant 45 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La partie ester (AM, acétoxyméthylester) de cette sonde fluorescente permet de franchir facilement la double couche phospholipidique membranaire. Une fois dans le cytoplasme, les estérases désésterifient la sonde qui est alors piégée dans la cellule. Cette sonde fluorescente a une forte affinité pour le calcium. Ainsi, la proportion de sonde sous forme liée et sous forme libre est fonction de la concentration de calcium cytoplasmique présent dans l'hémocyte. Après excitation dans

l'ultraviolet à 350 nm, la sonde émet à deux longueurs d'onde différentes : 405 nm lorsqu'elle est sous forme liée (Indo-1-Ca) et 485 nm sous forme libre (Indo-1).

La fluorescence émise à 405 nm avec le PMT 1 (photomultiplicateur) et à 485 avec le PMT 2, à l'aide d'un filtre dichroïque permet d'obtenir un rapport de fluorescence : $R = F_{405} / F_{485}$. Après calibration, ce rapport permet d'évaluer la concentration intracellulaire en calcium.

L'équation de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) détermine, à partir du rapport de fluorescence, la quantité de calcium intracellulaire sous forme libre $[Ca^{2+}]_i$:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

avec :

Kd : constante de dissociation de l'indo-1 avec le calcium ($Kd = 250 \text{ nM}$).

R min : rapport minimal de fluorescence forme liée/forme libre. Il s'obtient en perfusant dans l'environnement proche de la cellule, une solution (tableau 1) sans calcium, contenant de l'EGTA à 1 mM (chélateur de calcium) et un ionophore calcique qui augmente la perméabilité de la membrane au calcium : la ionomycine (Calbiochem, 20 μM dans le DMSO). Ce protocole permet de diminuer au maximum la concentration du calcium sous forme libre dans le cytosol de la cellule.

R max : rapport maximal de fluorescence forme liée/forme libre. Il s'obtient en perfusant la solution à 20 mM de calcium (tableau 1) et de la ionomycine (20 μM). Ce protocole permet d'augmenter au maximum la concentration du calcium sous forme libre dans le cytosol de la cellule.

β : rapport des valeurs de fluorescence à 485 nm en 0Ca et à saturation (20 Ca).

Des substances pharmacologiques connues pour agir sur les protéines impliquées dans la régulation du calcium au niveau de la cellule sont ensuite utilisées (Solution hyperpotassique (200 mM), Caféine (10 mM)).

Microscopie confocale (BioRad 1024 MRC) : Cette technique permet également de mesurer la fluorescence émise par des structures cellulaires préalablement marquées par un fluorochrome et excitées à une longueur d'onde définie. Elle présente l'avantage (par rapport à la cytofluorimétrie) d'optimiser la définition de la fluorescence émise au niveau des axes (xy) et (z) d'une section de cellule, grâce à la présence d'un diaphragme en trou d'épingle placé sur le trajet optique. En effet, celui ci permet de sélectionner la lumière provenant du plan focal étudié et de bloquer les rayons lumineux provenant des autres zones de l'échantillon. La sonde calcique utilisée dans ce cas est le fluo-3-AM. Comme l'Indo-1-AM, cette sonde pénètre dans la cellule grâce à son groupe AM. Les estérases en présence rompent les liaisons ester, la sonde fluo-3-AM est alors capable de se fixer au calcium pour lequel elle présente une grande affinité.

Résultats attendus

Cette étude devrait nous permettre de caractériser les principales structure cellulaires impliquées dans la régulation du calcium intrahémocytaire. L'objectif est de comprendre comment le calcium est impliqué dans les fonctions hémocytaires, en particulier celles relatives à la fonction immunitaire. Cette étude est menée en collaboration avec le LGP de la Tremblade (T. Renault et B. Gagnaire) et l'IPBS de l'Université de Poitiers (C. Cognard).

La caractérisation de ces flux ioniques, ainsi que la compréhension de leur implication dans les fonctions hémocytaires devraient ensuite nous permettre de comprendre si, et comment des variations de paramètres environnementaux peuvent modifier, voire altérer, l'homéostasie calcique intrahémocytaire et par conséquent les fonctions assumées par ces cellules, comme cela l'a déjà été démontré sur d'autres types cellulaires et d'autres organismes (Verbost et al., 1987 ; Hinkle and Osborn, 1994 ; Mercier et al. 2002). Cette partie de l'étude sera menée en collaboration avec le LGP de la Tremblade (T. Renault et B. Gagnaire, LGP La Tremblade).

Bibliographie

- Aton E., T. Renaul, B. Gagnaire, C. COGNARD, H. Thomas-Guyon and Imbert N. A flow cytometric approach to the study of intracellular-free Ca^{2+} in *Crassostrea gigas* haemocytes (en preparation)
- Clapham DE (1995) Calcium signaling, cell, 80 : 259-268.
- Coles J.A. and R.K. Pipe (1994) Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 4: 337-352.
- Gagnaire B., T. Renault, et H. Thomas-Guyon (2002). Environnement et mécanisme de défense chez le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas* XIX Forum des Jeunes Océanographes de France, Nantes, Avril 2002.
- Gagnaire B., T. Renault, K. Bouilly, S. Lapegue and H. Thomas-Guyon (2003). Study of Atrazine Effects on Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 9, 193-199.
- Gagnaire B., H. Thomas-Guyon and Renault, T. In vitro study of cadmium and mercury on Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), (In press) Haemocytes. *Fish and shellfish of immunology*.
- Hinkle P.M. and M.E. Osborn (1994) Cadmium Toxicity in Rat Pheochromocytoma Cells: Studies on the Mechanism of Uptake. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 124 (1) : 91-98.
- Lacoste A.K., S. Malham, A. Cueff and S.A. Poulet (2001) Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via α -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental & Comparative Immunology*, 25 (4) : 285-289.
- Luna-Gonzales A, A.N. Maeda-Martinez, F. Vargas-Albores, F. Ascencio-Valle & M. Robles-Mungaray (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 15, 275-282.
- Mercier C., M. Axelsson, N. Imbert, G. Claireaux, C. Lefrançois, J. Altimiras and A.P. Farrell (2002). In vitro cardiac performance in triploid brown trout at two acclimation temperatures. *Journal of Fish Biology*. 60, 117-133.
- Oubella R. and M. Auffret (1995). Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Rade de Brest. *Acte de Rencontre Scientifique Internationale (Programme Rade de Brest)*, 1 : 307-319.
- Smith V.J. and K. Söderhäll (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 15 : 251-261.
- Söderhäll K. and V.J. Smith (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine Decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology*, 7 : 229-239.
- Verbost P.M., G. Flik, R. Lock and S.E. Wendelaar Bonga (1987) Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout.
- Winslow M.M., J.R. Neilson and G.R. Crabtree (2003) Calcium signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 15, 299-307.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils en | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |

| | | |
|---|-------|--|
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| Adultes | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémoL., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 Action 1.3 Calcium –Cytofluorimétrie Phenoloxydase- spectrophotométrie | | | | | | | | | | | | |
| WP 1 Action 1.3 Calcium –Cytométrie Phenoloxydase-Clonage | | | | | | | | | | | | |
| WP 1 Action 1.3 Calcium –Cytométrie – polluants Phenoloxydase- polluants | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 Phenoloxydase- spectrophotométrie | | | | | | | | | | | | |
| WP 3.3.1 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Aton Emilie, Etude des mouvements calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : 1^{ères} approches expérimentales. DEA ICTM (Interactions Cellulaires et Transports Membranaires) juin 2003

Aton E, C. Cognard, T. Renault, H. Thomas-Guyon and N. Imbert (2003) Etude des mouvements calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* lors de leur immunostimulation : 1^{ères} approches expérimentales. III^e Congrès International des Sociétés Européenne de Malacologie. La Rochelle 24-27 juin 2003 *Communication orale*

Gagnaire B., T. Renault et H. Thomas-Guyon (2002). Environnement et mécanisme de défense chez le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas* XIX Forum des Jeunes Océanographes de France, Nantes, Avril 2002. Communication orale et par affiche.

Gagnaire B. Environnement et immunomodulation : étude d'activités hémocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. DES Paris VI, Université Pierre et Marie Curie. Septembre 2002.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-----------------|----------------|---------------------|
| HUET V. | Technicienne | 10% |
| TRICHET C. | Technicienne | 10% |
| IMBERT N. | MCF | 50% |
| THOMAS-GUYON H. | MC | 50% |

Demande budgétaire

Demande budgétaire identique (19 720 Euros).

Thème Pathologie

Ifremer - DRV/RA/LGP - Laboratoire de Génétique et Pathologie - La Tremblade

Adresse : Station de la Tremblade
Ronce les Bains
BP 133
17390 La Tremblade

Responsable : T. Renault

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de l'action : Pathologie / Immunologie

Descriptif de l'activité

Introduction

L'un des objectifs principaux des travaux en pathologie des mollusques est d'identifier et d'étudier des agents infectieux capables d'induire des maladies et des mortalités chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ces travaux semblent d'autant plus indispensables qu'il n'existait pas, jusqu'à ces dernières années, de pathologies identifiées chez l'huître creuse en Europe. Aujourd'hui, deux types d'agents ont été mis en évidence : des bactéries du genre *Vibrio* et des virus apparentés à la famille des *Herpesviridae*. En effet, les études menées dans le but d'identifier les causes des épisodes de mortalité de *Crassostrea gigas* ont révélé l'existence d'un agent viral de type herpès sur des larves et naissains. Par ailleurs, de nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves dont l'huître creuse.

Si aucun pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales au cours des dernières années chez les huîtres creuses, des bactéries du genre *Vibrio*, ainsi qu'un virus de type herpès (Ostreid Herpesvirus type 1 ou OsHV-1) sont à l'origine de certaines mortalités. Ces observations laissent suspecter que les mortalités estivales ne correspondent pas à une épizootie faisant intervenir un agent infectieux unique. Cependant, différents agents pathogènes apparaissent associés à ce phénomène et doivent donc faire l'objet d'études approfondies. Par ailleurs, il est clair que le phénomène de mortalités estivales est un phénomène faisant intervenir plusieurs causes, ces dernières pouvant être ou non cumulées. En d'autres termes, les mortalités que l'on regroupe sous le seul vocable de phénomène de mortalités estivales correspondent très certainement à des phénomènes différents aboutissant tous au même effet, à savoir la mort de l'animal. Dans ces phénomènes, il doit exister des phénomènes qui ne font pas intervenir d'agents pathogènes. Cette hypothèse est explorée dans le cadre de Morest dans d'autres approches thématiques (génétique, physiologie et écotoxicologie).

Dans le cadre de Morest, la détection par PCR d'ADN d'OsHV-1a été corrélée à l'apparition des mortalités de naissain de captage naturel sur le site de Fouras (Charente Maritime). Par ailleurs, des analyses sur des animaux moribonds révèlent généralement une prévalence plus élevée en herpèsvirus par rapport aux animaux vivants. Enfin, des

analyses en PCR ont également permis de montrer que les larves produites dans le cadre de Morest à l'écloserie de La Tremblade sont infectés pour certains lots par le virus. Par ailleurs, des expériences de cohabitation entre des huîtres provenant de lots présentant des mortalités et des huîtres saines ont démontré l'implication d'agents transmissibles. Le virus OsHV-1 n'ayant pas été détecté dans tous les cas, des bactéries semblent être impliquées. Les analyses bactériennes effectuées à partir d'huîtres moribondes (baillantes) et saines provenant de plusieurs sites ont permis de dégager quelques tendances. Sur des animaux sains, des bactéries apparaissent en densité variable dans l'hémolymphe au mois de juin notamment. La microflore associée à *Crassostrea gigas*, dans l'hémolymphe et la cavité intervalvaire est composée essentiellement de quelques espèces de vibrios majoritairement du groupe des *V. splendidus*, plus des souches de *V. aesturianus*, de *V. anguillarum* et des souches *Pseudoalteromonas*. Chez les animaux moribonds, rares sont ceux sans bactériémie. La détection dans l'hémolymphe d'une seule espèce bactérienne est très fréquente chez les animaux malades en stabulation dans les structures expérimentales (Argenton, Bouin). Elles sont parfois observées sur les parcs (baie des Veys), mais dans d'autres cas (expériences de cohabitation, lots de professionnels ou lots Morest d'Arcachon, La Trinité, Quiberon, Marennes-Oléron,...) les microflores sont plus complexes même si elles sont souvent composées de vibrios taxonomiquement proches.

Par ailleurs, en 2001, 2002 et 2003, il n'a pas été possible de dégager des éléments notables qui pourraient relier les mortalités à la présence d'un seul et unique agent pathogène. Dans ce contexte, il apparaît indispensable d'étudier les interactions entre le milieu, l'hôte et les agents pathogènes potentiels déjà identifiés (bactéries et herpes virus) chez *Crassostrea gigas*. En effet, les facteurs d'environnement en modulant l'état physiologique des animaux et la virulence des agents infectieux, peuvent intervenir de manière prépondérante dans le développement des infections. Dans ces conditions, les relations entre l'environnement et les capacités immunitaires des animaux apparaissent également comme une voie à explorer.

WP1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.4 - Pathologie

A - Bactériologie

a) Séquençage complet du génome de la souche Mel 32

Résultats 2003

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Mazel (Institut Pasteur de Paris), nous avons entamé le séquençage complet du génome de la souche Mel 32. Pour cela, ont été construits : Une banque d'ADN génomique petits inserts (1-2 kpb) obtenus par nébulisation de l'ADN génomique, clonés dans le vecteur pCDNA1 ; une banque d'ADN génomique Grands inserts (50-100 kb) obtenus par digestion partielle par une enzyme de restriction (ex *HindIII*), clonés dans le vecteur pBeloBAC11. La phase de séquençage en shotgun est terminée et 50 000 séquences (couverture 5X) sont disponibles.

Perspectives 2004

Les contigs seront assemblés et la phase de finition initiée en février 2004. Cette phase consiste à résoudre toutes les zones de séquence de basse qualité ainsi qu'à déterminer les liens entre les contigs par comparaison aux génomes des *Vibrio* dont la séquence est disponible. La durée de cette phase est estimée à 6 mois. L'annotation du génome sera conduite à partir du mois de février et en parallèle avec la phase de finition. D'une manière générale, les premières étapes d'annotation du génome permettra d'ores et déjà de prédire environ 85% des gènes, permettant ainsi de se focaliser sur les gènes de virulence possible et ouvrant la possibilité de débiter une analyse génomique utilisant la technologie des puces à ADN.

b) Recherche de gènes support de la virulence

Résultats 2003

En parallèle, les bases moléculaires de la virulence de Mel 31 sont abordées par une approche de génomique soustractive (banques SSH). Actuellement, 73 clones différentiels ont été analysés et 40% d'entre eux se sont révélés réellement spécifiques de 31. Ces clones présentent des homologies de séquences pour des gènes impliqués dans le transfert d'ADN exogène (transposon, integron, n=1), le métabolisme (n=9), la virulence (n=4), ou codant pour des protéines membranaires (n=7).

Perspective 2004

Le criblage de la banque soustractive sera complété et certains gènes candidats chez Mel 31 seront analysés au niveau cadre de lecture complet, régulation et fonction. Parallèlement des tests de quantification de l'expression de ces gènes seront développés. Des biotests permettant la caractérisation de mécanisme de virulence de nos souches vont être mis au point. Ce sont :

- des tests d'adhérence, de mobilité et d'invasion,
- la détection de protéases, phospholipases,
- des profils LPS et protéines membranaires,
- recherche d'exotoxine et d'endotoxines.

Nous prévoyons également d'élaborer des puces à ADN au début du mois de mai. Ces puces porteront des sondes correspondant à tous les gènes présentant un lien fonctionnel avec la virulence. Les technologies disponibles à l'Institut Pasteur permettent de réaliser

des macro-arrays sur membranes de nylon. Nous prévoyons que ces puces porteront environ 1000 sondes déposées en double.

c) Taxonomie moléculaire et lien avec le CRB

Résultats 2003

Dans le cadre du CRB, nous avons élaboré une collection de 80 souches de *Vibrio* pathogènes d'organismes marins dont 40 souches apparentées à *V. splendidus*. Ces souches ont été caractérisées en terme de spéciation (taxonomie moléculaire et phénotype) et virulence (infection expérimentale).

Perspectives 2004

Dans le cadre du CRB, l'analyse d'une trentaine de souche du groupe polyphylétique *V. splendidus* (vir+ et vir-) sera réalisée à partir de 6 gènes d'intérêt phylogénétique (multilocus sequence typing, MLST).

d) Développement de mutant Mel 31/Mel 32 GFP

Perspectives 2004

Le gène codant pour la GFP sera inséré par recombinaison simple dans le génome des souches Mel 31 et Mel 32. L'expression constitutive de cette protéine permettra de localiser plus aisément les pathogènes dans les tissus et nous permettra de déterminer les voies d'infection des pathogènes. Ces mutants pourront être utilisés par Béatrice Gagnaire (thésarde au laboratoire) pour une analyse de la phagocytose en cytométrie en flux.

B - Virologie

a) Développement et validation d'outils de diagnostic (anticorps poly et monoclonaux anti OsHV-1 et PCR en temps réel)

Perspectives 2004

Des anticorps spécifiques du virus ont été produits dans le cadre du programme européen VINO. Des travaux seront réalisés afin de préciser leur utilisation à des fins diagnostiques. Par ailleurs, des travaux entrepris en 2003 dans le cadre du PNEC (ART5) seront poursuivis afin de développer une technique de PCR en réel pour détecter et quantifier le virus. Cette technique apparaît indispensable pour un virus qui est capable de persister chez son hôte en absence de symptômes. En effet, cette approche de PCR en temps réel devrait nous permettre de différencier des niveaux d'infection différents et de les relier à des mortalités ou à l'absence de mortalité.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.3 - DYNAMOR03 : suite analyses et traitements des données

a) Recherche d'agents infectieux en histologie sur les prélèvements réalisées en 2003 dans le cadre de DYNAMOR

Résultats 2003

Plus de 1800 échantillons ont été prélevés en 2003 et seulement 20 ont été, pour le moment, analysés. Des échantillons ont, en particulier, été effectués au moment du pic de mortalité survenu en juin 2003.

Perspectives 2004

Les échantillons prélevés en 2003 dans le cadre de DYNAMOR permettent ce type d'approche.

*b) Recherche d'OSHV-1 par PCR et hybridation *in situ* sur les prélèvements réalisés en 2003 dans le cadre de DYNAMOR*

Perspectives 2004

L'objectif est, dans ce cas de mettre ou non en évidence le virus OshV-1 chez des huîtres de 18 mois élevés sur le terrain dans deux environnements différents à Ronces les Bains (15cm versus 70cm). Nous disposons du matériel biologique (animaux fixés en 2003) adéquat pour mettre en évidence une relation entre mortalité et présence du virus.

c) Recherche de birnavirus marins par RT-PCR sur les prélèvements réalisés en 2003 dans le cadre de DYNAMOR

Perspectives 2004

Des birnavirus ont été mis en évidence chez différentes espèces de coquillages et associés à des mortalités chez les animaux dans des conditions stressantes. Il existe des amorces de PCR consensuelles permettant l'amplification de ces birnavirus présents chez les coquillages. Elles peuvent être utilisés sur les échantillons réalisés en 2003 dans le cadre de DYNAMOR, en particulier ceux effectués au moment de la mortalité (juin 2003).

d) Valorisation des données du suivi des paramètres hématocytaires

Résultats 2003

Les analyses réalisées en 2003 dans le cadre de DYNAMOR ont permis de montrer que les activités hématocytaires (phagocytose, présence d'estérases et lysosomes) de *Crassostrea gigas* connaissent des variations en fonction de l'origine génétique et de l'état physiologique des animaux (diploïdes versus triploïdes). Des analyses plus fines ont également montré une influence de l'environnement (15 cm versus 70 cm au-dessus du sol) sur ces mêmes activités à certaines périodes de l'année. De cette manière, l'expérimentation DYNAMOR a permis de préciser une des grandes hypothèses du programme Morest : la mise en cause du fonctionnement du système immunitaire dans le phénomène de mortalité estivale.

Perspectives 2004

Une valorisation des résultats obtenus est prévue sous forme d'une publication. Les données obtenues pour les paramètres hématologiques seront en particulier comparées avec les données obtenues pour d'autres bio-marqueurs.

Sous-tâche - 2. 2. 8 - DYNAMOR04 : suivi léger

a) Reproduction des résultats obtenus dans le cadre de l'atelier Dynamor en 2003

Perspectives 2004

Cette année nous désirons confirmer la plus grande sensibilité des huîtres de captage naturel placées à 15cm et la fenêtre de temps pour cette sensibilité, récupérer de nouveaux échantillons pour une analyse en histologie des altérations tissulaires mais, aussi et surtout, une quantification de l'état de maturation, évaluer l'importance de l'effet 15cm au niveau donneur ou receveur. Ces résultats nous permettront d'évaluer si l'effet 15cm :

- augmente la sensibilité de l'hôte et/ou augmente la virulence du pathogène,
- la proximité 15cm entraîne un état de maturation différent ou des pontes partielles qui pourraient modifier l'environnement intra-palléal qui serait alors un bouillon de culture pour les *Vibrio*.

*b) Variation temporelle des *Vibrio* et fraction *V. splendidus* dans l'eau et les huîtres 15cm*

Perspectives 2004

Des huîtres 12 mois, issues de captage naturel, seront placées à 15cm à partir de Mars 2004. Dès avril et ce, 1 fois par mois toute l'année sauf 1 fois par semaine pendant la période décrite précédemment (juin/juillet), un prélèvement de 25 huîtres et eau de mer (dispositif de récupération à marée haute) sera effectué. L'eau intra-palléale et l'hémolymphe seront récoltées et poolées par 5 animaux. Seront alors analysées :

- la population bactérienne totale/active en cytométrie (collaboration Dr Courtis/Banyuls),
- la fraction cultivable par numération en marine agar,
- la fraction *Vibrio* après repiquage sur TCBS,
- la fraction *splendidus related* par colony blotting.

WP3 - Expérimentation phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.3 - Stress

Sous-tâche 3.3.1 - Pesticides et immunotoxicité

Résultats 2003

Une expérience a été réalisée pendant le mois de février 2003 à la station Ifremer de Bouin (Vendée). Dans le cadre de ce programme, il a été mis en évidence des différences de survie sur estran en période estivale entre différentes familles d'huîtres produites en éclosure. Ces résultats ont conduit à séparer les familles et en les qualifiant de "bonnes" et de "mauvaises" en fonction de leurs capacités de survie. Le but de cette expérience réalisée à Bouin était de comparer de nombreux paramètres (physiologiques, immunologiques) entre une "bonne" et une "mauvaise" famille confrontées à une pollution par des pesticides. Un mélange de pesticides composé de huit molécules rencontrées dans le milieu de Charente-Maritime a été testé sur les huîtres pendant 7 jours. Les concentrations ont été choisies parmi les plus fortes valeurs rencontrées dans l'environnement. Cette expérience a été réalisée deux fois, une dans le cas de conditions

d'oxygène normales (normoxie), et une autre en stress respiratoire (hypoxie). Il semble que la "mauvaise" famille présente des valeurs relativement moyennes des paramètres hématologiques quand les conditions sont bonnes (normoxie). Cependant, quand les conditions deviennent mauvaises (hypoxie), elle est plus sensible que la "bonne" : il y aurait un possible effet cumulatif de l'origine génétique et de l'environnement.

Perspectives 2004

Dans le cadre de la thèse de B. Gagnaire, nous allons dans un premier temps vérifier au laboratoire qu'un mélange de pesticides induit bien une diminution de certaines fonctions hématologiques afin d'établir un modèle d'immunotoxicité. Cette étape réalisée, des essais d'infection avec des bactéries du genre *Vibrio* (Mel 31, Mel 31, Mel 125, ...) et le virus OsHV-1 seront réalisées dans le but de voir si des animaux possédant des activités hématologiques diminuées (phagocytose par exemple) sont plus sensibles à ces bactéries. L'expression de gènes impliqués dans les réponses vis à vis des bactéries sera également suivie en RT-PCR.

Tâche 3.5 - Modèle d'infection

Sous-tâche 3.5.1 - Juvéniles - Betonbloom : juvéniles "R" "S", 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie), puis Raceways (La Tremblade)

Perspectives 2004

Des prélèvements de larves et de naissain, plus particulièrement au moment des mortalités, seront réalisés et feront l'objet d'une analyse pour rechercher OsHV-1. Cependant, les analyses ne seront pas forcément réalisées en 2004, même si les échantillons sont prélevés en 2004. Par ailleurs, les échantillons pourront être également utilisés pour rechercher d'autres pathogènes.

Sous-tâche 3.5.2 - Adultes - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission

Résultats 2003

La description de la pathogénèse (analyse spatio temporelle de l'infection et des altérations tissulaires) nécessitait : 1) un système d'infection expérimentale par balnéation ; 2) des outils de détection spécifiques de Mel 31 et Mel 32. Les différents essais (balnéation avec des cultures de bactéries, jeûne puis balnéation avec des co-cultures bactéries-algues alimentaires, cohabitation huître injectées-huîtres saines) ayant échoué, la nécessité d'un état physiologique de l'huître et/ou d'un stress environnemental a été envisagé. Des huîtres placées pendant 4 mois à 15 ou 70 cm du sédiment (atelier Dynamor), lavées et dégorgees ou non, ont été injectées par Mel 31 et Mel 32 (donneur) et placées en cohabitation avec des mêmes lots d'huîtres non injectées (receveur). Une transmissibilité de la mortalité a été observée de façon plus importante chez les huîtres 15cm que chez les huîtres 70cm. Cette différence est moins nette si les huîtres sont lavées et dégorgees 24h ; aucune transmission n'est observée chez des huîtres lavées et maintenues en raceways plusieurs jours même avec addition de sédiment dans les aquariums. Ces résultats suggèrent un effet essentiel mais non suffisant du sédiment. L'expérience a été réalisée tous les 15 jours de mi-mai à mi-août, la transmissibilité est nulle en mai, forte en juin et juillet, moindre en août, suggérant fortement un effet de la maturation des huîtres.

Afin d'analyser l'évolution spatio temporelle des bactéries chez les animaux receveurs, des outils de détection spécifiques des souches Mel 31 ou Mel 32 ont été mis au point. Les fragments différentiels issus de banque SSH (voir paragraphe suivant) ont été utilisés comme sondes en dot blot avec des membranes où a été déposé l'ADN des 125 souches de la collection 2001, et ce, afin de sélectionner les sondes les plus spécifiques.

Ces sondes ont été utilisées en hybridation *in situ* sur les échantillons receveurs et ont permis de localiser de façon spécifique les bactéries Mel 31 et Mel 32 au pourtour du muscle, dans les gonades et dans la glande digestive.

L'analyse histologique des receveurs avant l'apparition des mortalités nous a permis d'observer un état général plus moribond de ces animaux sans lésions caractéristiques. Par contre une hypersécrétion de mucus au niveau des diverticules digestifs est souvent observée. L'ensemble de ces résultats suggère que ces bactéries agissent sur des fonctions de l'hôte plutôt que par destruction tissulaire.

Perspectives 2004

Nous allons effectuer des expériences de balnéation avec des souches virulentes (Mel 31+Mel 32, *V. splendidus*) ou non virulente (Mel 125, *V. mediterranei*) en présence ou non de gamètes. Des huîtres de captage naturel non matures seront incubées avec un mélange de *Vibrio* +/- gamètes. Elles seront ensuite rincées et placées en aquarium pour un suivi des mortalités. Différents temps d'incubation ainsi que différentes concentrations de bactéries et de gamètes seront testés. Dans le cas de l'apparition de mortalités, des échantillons seront récoltés pour un suivi en hybridation *in situ*, histologie et microscopie électronique.

Des huîtres matures ou non seront injectées par Mel 31+Mel 32 (donneur) et placées en cohabitation avec les mêmes lots d'huîtres mature ou non (receveur). Dans le cas de l'apparition de mortalités, des échantillons seront récoltés pour un suivi en hybridation *in situ*, histologie et microscopie électronique.

WP5 - Synergies REPAMO - MOREST - REMORA

Tâche 5.1 - Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes

Sous-tâche 5.1.1 - Mortalités déclarées chez les professionnels

Les mortalités anormales tant en éclosérie-nurseries, en zone de production, en bassins à terre, qu'au niveau des gisements naturels exploités doivent faire l'objet de déclaration (cf. directive européenne 95/70/EEC et décret 95-100 du 26/11/95). Les mortalités anormales en milieu ouvert et dans les bassins à terre sont définies comme toutes mortalités > à 15 % affectant un stock dans un intervalle maximal de 15 jours. En écloséries, les mortalités anormales sont définies comme des mortalités telles que l'éclosier ne peut obtenir de larves pendant 2 pontes successives issues de géniteurs différents.

Résultats 2003

Le bilan 2003 sera bientôt publié dans le rapport annuel REPAMO. En 2003, 21 événements mortalités d'huîtres creuses ont été déclarés, soit 35 lots analysés par la cellule analytique de La Tremblade. Sur ces 21 événements, 10 concernent des adultes, 1 du naissain de 18 mois et 10 du naissain de moins de 1 an. Ces mortalités ont affecté plus particulièrement la Charente Maritime et les étangs du sud de la France. L'herpèsvirus OsHV-1 a pu être détecté par PCR dans 6 événements de mortalités de naissain sur 10. Des souches majoritaires du genre *Vibrio* ont été isolées dans 3 cas de mortalité de naissain dont 1 de façon concomitante à la détection d'OsHV-1. Des souches majoritaires du genre *Vibrio* ont également été isolées dans 4 événements mortalités d'adultes. Enfin, 1 événement mortalité d'adulte était attribué à une efflorescence de *Cerataulina pelagica*. La canicule n'a pas contribué à une augmentation des déclarations de mortalités anormales.

Perspectives 2004

En pratique, des mortalités considérées anormales par les professionnels doivent être déclarées auprès de l'Autorité Compétente (Affaires Maritimes). Des prélèvements et des analyses sont alors réalisés par le REPAMO, les informations concernant ces épisodes de mortalités sont enregistrées sous la base de données REPAMO. Les analyses réalisées par le laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) en cas de mortalités anormales d'huîtres creuses sont : la PCR pour la détection d'herpès virus (sur le naissain uniquement), l'histologie et si besoin, la microscopie électronique à transmission. Un isolement de souches bactériennes est également réalisé pour chaque lot prélevé selon un protocole établi après concertation avec le Laboratoire Physiologie des Invertébrés et les bactériologistes du LGP.

L'étude des mortalités anormales dans le cadre du REPAMO permet de relever la présence éventuelle d'agents pathogènes connus (ex : OsHV-1 et vibrios) ou nouveaux tout en reliant ces résultats à des facteurs environnementaux et à des pratiques culturales. La carte spatio-temporelle des mortalités terrain permet de relativiser et compléter les résultats acquis dans le cadre de Morest.

Un bilan des cas de mortalités enregistrés, de leurs conditions d'apparition ainsi que les résultats des analyses réalisées par le REPAMO sera fait au terme de l'année 2004 afin de pouvoir les comparer avec les mortalités observées sur les lots Morest et dans le cadre du réseau REMORA.

Sous-tâche 5.1.3 - REMOREST (Application de REMORA comme Référentiel Historique et Géographique des MORTalités ESTivales d'huîtres juvéniles et adultes)

Perspectives 2004

Les données REMORA contribuent à évaluer les mortalités estivales d'huîtres des principaux secteurs conchylicoles français et peuvent permettre la mise en évidence de corrélation entre mortalité et paramètres biologiques (état de maturation des animaux notamment). L'objet de la Tâche REMOREST est de mettre ces données à disposition des chercheurs travaillant sur le projet Morest et de les confronter aux données REPAMO (étude des mortalités déclarées par les professionnels).

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle pathol/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypol/hyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution</i> | 3.4.1 | |

| | | |
|---|-------|--|
| des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18) | | |
| Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juveniles | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| Adultes | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP5. Synergies REPAMO – MOREST - REMORA | | |
| Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes | 5.1 | |
| Mortalités déclarées chez les professionnels | 5.1.1 | |
| Mortalités intervenues dans le cadre de MOREST | 5.1.2 | |
| REMORA | 5.1.3 | |
| Epidémiologie des pratiques culturelles | 5.2 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | |
| WP 5 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2003)

Publications dans revues scientifiques ou technologiques avec comité de lecture

Le Roux F., M. Gay, C. Lambert, J.L. Nicolas, M. Gouy and F. Berthe. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on gyrB gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms*. *Sous presse*.

Gagnaire B., H. Thomas-Guyon and T. Renault. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. *Sous presse*.

Communications écrites dans réunions scientifiques ou technologiques - Groupe de Travail

Gay M., G. Lancelot, B. Chollet, T. Renault, N. Cochenec, F. Berthe and al. (2003) Characterization of *Vibrio* isolated from Pacific oysters spat suffering from summer mortality outbreaks. *Journal of Shellfish Research* **22**(1) : p. 331 (abstract)

Le Roux F., D. Saulnier, M. Gay and N. Faury (2003) Actions MOREST 2002 DRV/RA/Laboratoire Génétique Pathologie (Microbiologie). Résumés des actions MOREST 2002. Journées MOREST 26-27-28 novembre 2003 : 71-72

Moraga D., C. Lelong, T. Renault, B. Gagnaire, J. Haure, T. Burgeot, D. Mesnard, F. Geret, F. Quiniou and X. Caisey (2003) Actions MOREST 2002 DEL-DRV et Universités (Ecotoxicologie). Résumés des actions MOREST 2002. Journées MOREST 26-27-28 novembre 2003 : 41-43

Colloque, Congrès, Conférence et Poster

Arzul I. & C. Garcia, 2003. Mortalités anormales sur le terrain : analyses REPAMO 2003. Séminaire MOREST, La Rochelle, 26-28 novembre 2003.

Aton E., C. Cognard, T. Renault, H. Thomas-Guyon & N. Imbert, 2003. Etude des mouvements calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* lors de leur immunostimulation : 1ères approches expérimentales. III^e Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie "Les mollusques dans la recherche actuelle", La Rochelle 24-27 juin 2003.

Barbosa Solomieu, V. & T. Renault, 2003. Détection précoce d'herpèsvirus (OsHV-1) au stade larvaire chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Barbosa Solomieu V. & T. Renault, 2003. Evaluation et techniques moléculaires pour la détection d'OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus Type 1). Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Barbosa Solomieu V., L. Degremont, P. Boudry and T. Renault (2003) Detection of OsHV-1 among 3 successive generations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : evidence of vertical transmission, Séminaire MOREST, La Rochelle, France, 26-28 novembre

Gagnaire B., N. Kerdudou, P. Soletchnik & T. Renault (2003) Suivi temporel de paramètres hématocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* – Intérêt dans le cadre de l'étude des mortalités estivales. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Gagnaire B., H. Thomas-Guyon & T. Renault (2003) Etude *in vitro* des effets de métaux lourds sur la réponse hématocytaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : développement de techniques évaluant les impacts de la pollution estuarienne. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Gagnaire B., F. Gélet, J. Haure, J.L. Martin, T. Burgeot and T. Renault (2003) Effect of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. III^e Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie "Les mollusques dans la recherche actuelle", La Rochelle 24-27 juin 2003. **Lauréate Prix SFM 2003.**

Gagnaire B., F. Gélet, J. Haure, J.L. Martin, T. Burgeot and T. Renault (2003) Effect of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes. XXXIII^e congrès du Groupe Français des Pesticides, Aix en Provence, 20 mai 2003.

Gagnaire B., T. Renault and H. Thomas-Guyon (2003) Effet de l'exposition aux pesticides sur les hématocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Colloque d'Immunologie des Invertébrés, Banyuls, 17-19 novembre 2003.

Gagnaire B., P. Soletchnik, N. Kerdudou & T. Renault (2003) Evolution temporelle des paramètres hématocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Intérêt dans le cadre de l'étude des mortalités estivales, Colloque d'Immunologie des Invertébrés, Banyuls, 17-19 novembre.

Gagnaire B., P. Soletchnik, N. Faury, P. Guilpain, N. Kerdudou, O. Le Moine and T. Renault (2003) A cytometric morpho-functional analysis of the haemocytes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared in contrasted natural environments, Malta, 11th International Conference of the EAFP, 21-26 septembre.

Gay M., G. Lancelot, B. Chollet, T. Renault, N. Cochenec, F. Berthe and al. (2003) Characterization of *Vibrio* isolated from Pacific oysters spat suffering from summer mortality outbreaks. 95th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.

Gay M., E. Lazaille, T. Renault, F. Berthe, M. Gouy and F. Le Roux (2003) A new French connection : deux *Vibrio* coopèrent pour tuer l'huître creuse. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Gay M., T. Renault and F. Le Roux (2003) Characterization of *Vibrio* isolated from *Crassostrea gigas* spat suffering summer mortality outbreaks. III^e Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie "Les mollusques dans la recherche actuelle", La Rochelle 24-27 juin 2003.

Gay M., D. Saulnier, N. Faury & F. Le Roux (2003) Vers une étude épidémiologique de vibrioses. Styli 2003, 23 Mai – 9 juin 2003, Nouvelle-Calédonie.

Gay M., T. Renault and F. Le Roux, 2003, A new French connection : two *Vibrio splendidus*-related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*, Malta, 11th International Conference of the EAAP, 21-26 septembre

Géret F., B. Gagnaire, D. Ménard, T. Renault, A. Le Roux, J. Haure, G. Bocquené and T. Burgeot, 2003. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to pesticides exposition. Poster présenté au XII^{ème} Colloque PRIMO, Floride, 8,13 mai 2003.

Lancelot G., E. Lazaille, M. Gay, G. Choquet, D. Saulnier & F. Le Roux, 2003. Caractérisation de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacole : pertinence des outils. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Le Roux F., M. Gay, D. Saulnier, 2003. Quorum sensing : ou comment les bacteries se causent.... Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Miossec L., 2003. Données du REPAMO, mortalités d'huîtres creuses en Bretagne de 1994 à 1998, intérêts et limites d'interprétation. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003.

Miossec L., 2003. Les pratiques culturelles sur le naissain en France : le détroquage précoce. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003.

Olicard C., N. Bourgougnon, Y. Didier & T. Renault, 2003. Recherche d'activités antivirales chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Olicard C., N. Bourgougnon & T. Renault, 2003, Molécule antivirale impliquée dans les mécanismes de défense de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, Colloque d'Immunologie des Invertébrés, Banyuls, 17-19 novembre.

Renault T., 2003, Flow cytometry and bivalve cell cultures, Chromosome Worksop, La Tremblade, 13-14 mars

Renault T., 2003, Etude des effets de micropolluants sur le système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : environnement et immunotoxicité, une clé pour comprendre les phénomènes de mortalités estivales, Université de Poitiers, Poitiers, 24 mars

Renault T., J.L. Nicolas, M. Garnier, P. Soletchnik, O. Le Moine, C. Courtis, D. Saulnier & F. Le Roux, 2003. Dynamor-Pathologie. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003

Saulnier D., M. Gay, D. Mazel & F. Le Roux, 2003. Caractérisation de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacole : génomique et post-génomique. Journées Conchylicoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

Saulnier D., F. Le Roux, J.L. Nicolas, N. Cochenec & C. Goarant, 2003. Développement d'outils diagnostics pertinents de vibrions pathogènes. Séminaire Morest, 26-28 novembre 2003

Soletchnik P., S. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Dégremont, E. Bédier and al., 2003. Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* in France in relation to environmental parameters. 95th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|---------------------|----------------|---------------------|
| Isabelle Arzul | C | 0,2 |
| Nicole Faury | T | 1 |
| Béatrice Gagnaire | Thésarde | 3 |
| Céline Garcia | C | 0,2 |
| Mélanie Gay | Thésarde | 3 |
| Jean Pierre Joly | C | 0,1 |
| Frédérique Le Roux | C | 2 |
| Laurence Miossec | C | 2.25 |
| Jean-François Pepin | C | 2 |
| Tristan Renault | | 0,8 |
| Denis Saulnier | C | 2 |
| Anne Goubet | CDD | 1 |
| Mohamed Zouine | CDD | 1 |

Thème Ecotoxicologie

Adresse : Université de Bretagne Occidentale
Institut Universitaire Européen de la Mer
LEMAR - Laboratoire des sciences de l'environnement marin
RSA (Equipe Réponse au Stress et Adaptation
Technopole Brest Iroise, Place Nicolas Copernic
29280 Plouzané France

Responsable : Dario MORAGA

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet : Développement d'indicateurs (génétiques écophysiologiques et écotoxicologiques) en réponse aux mortalités estivales chez *Crassostrea gigas*.

1 - Descriptif de l'activité

L'équipe Réponse au Stress et Adaptation (RSA) du LEMAR, est spécialisée dans l'étude des mécanismes moléculaires des processus adaptatifs développés par les bivalves marins en réponse aux fluctuations de leur environnement. Dans ce cadre, elle développe notamment des outils génétiques et protéiques d'évaluation des effets des divers stress environnementaux sur la structure génétique des populations de bivalves.

Introduction, bilan 2003

Au cours de l'année 2003, dans le cadre du programme MOREST, l'équipe RSA du LEMAR a mené un certain nombre d'actions :

WP1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.1 - Génétique

Les résultats obtenus en 2003 sur le suivi de l'évolution des fréquences du marqueur PGM95 dans les familles sensibles ont montré que l'effet sélectif observé en G1 et en G2 se maintenait en G2bis, mais également en G3 (sur des familles spécialement créées pour ce marqueur), confirmant la forte sensibilité des individus porteurs de cet allèle particulier de la PGM et plus spécialement les homozygotes. Parallèlement à ce travail, une recherche d'allèle particulier a été réalisée chez les familles résistantes afin de vérifier si des corrélations similaires pouvaient être observées chez les résistants. Ce travail a été notamment réalisé dans le cadre du DEA de Delphine Muths. Bien que les tendances observées soient moins significatives que celles obtenues dans les familles sensibles, des phénomènes de contre-sélection d'allèles particuliers ont pu être observés pour le locus PGM chez certaines familles résistantes. Une analyse plus approfondie est en cours afin de déterminer

d'éventuelles corrélations entre l'évolution des fréquences de ces allèles et les facteurs environnementaux des sites d'études.

D'autres marqueurs génétiques ont également été développés par le biais de l'utilisation des techniques de banques soustractives. Environ 350 gènes impliqués dans les processus de détoxification des hydrocarbures et des pesticides ont ainsi été identifiés. Un grand nombre de fonctions physiologiques susceptibles d'être affectées par ces xénobiotiques a ainsi été mis en évidence et un travail de recherche de polymorphisme sur un certain nombre de ces marqueurs est en cours.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.1 - Effet génétique

En association avec l'équipe IHP (Interaction Hôte-Pathogène) du LEMAR, nous avons réalisé une expérimentation croisée visant à essayer d'associer les génotypes pour la PGM (phosphoglucomutase) sur des familles de troisième génération (croisement de deux parents hétérozygotes 95/100) avec des paramètres hématocytaires individuels sur un lot de 90 huîtres. Les résultats sont en cours d'analyse et doivent permettre de mettre en évidence un éventuel lien génotype-phénotype.

WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.4 - Effets perturbateurs des polluants chimiques et de la salinité

En collaboration avec Thierry Burgeot (coordinateur des expérimentations en écotoxicologie) dans le cadre de DYNAMOR, nous avons suivi l'évolution de paramètres de stress cellulaires par le biais de deux indicateurs protéiques : les HSP70 et les métallothionéines. Ces expérimentations ont été réalisées à la fois en milieu contrôlé en réponse à des cocktails de pesticides, mais également sur le terrain en réponse à l'effet hauteur du sédiment et ce, sur plusieurs mois qui recouvrent les périodes ante et post mortalités estivales. Les résultats obtenus montrent des différences de comportement des familles sensibles et résistantes dans leur stratégie de production de protéines de stress, notamment dans les périodes qui précèdent la phase de mortalité. Des analyses plus fines sont en cours, notamment pour essayer de corréliser entre eux les nombreux autres paramètres physiologiques analysés lors de ces expériences.

Descriptif des actions par WP

Pour l'année 2004, l'équipe RSA du LEMAR se propose de réaliser quatre actions majeures, auxquelles s'ajoutent une action de mise au point d'outils, une action de traitement de données déjà acquises pour répondre aux objectifs du programme MOREST.

WP1 - mise au point d'outils

Tâche 1.1 - Génétique

Dans le cadre de la thèse d'Elise David, nous développerons de nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques de la réponse de *Crassostrea gigas* aux phénomènes d'hypoxie. La mise au point de ces marqueurs sera réalisée par les méthodes de banques soustractives déjà employée pour d'autres facteurs de stress. Une approche en terme d'étude de l'expression des gènes identifiés et en terme de recherche de polymorphisme (recherche de polymorphisme potentiellement sélectionné dans les populations sensibles et résistantes) sera menée afin de sélectionner les marqueurs les plus pertinents.

Résultat attendu

La mise au point de marqueurs spécifiques de la réponse à l'hypoxie s'avère importante car l'hypoxie constitue un stress majeur pour le fonctionnement cellulaire. L'origine des phénomènes hypoxiques peut être variée. Nous chercherons également à voir comment évolue l'expression de ces marqueurs au cours de la phase critique de mortalité afin de déterminer si les processus physiologiques liés aux problèmes d'hypoxie sont particulièrement affectés. L'approche "recherche de polymorphisme" sera entreprise pour les marqueurs présentant des régulations d'expression marquée. Ces travaux permettront en outre de mieux comprendre les mécanismes de défense de *Crassostrea gigas* en fonction des conditions environnementales des familles résistantes et sensibles.

Calendrier d'exécution

| WP1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.1 - Effet génétique

Sous-Tâche 2.1.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de marqueurs génétiques

La mise en commun avec l'équipe IHP (Interaction Hôte-Pathogène) du LEMAR des résultats obtenus en 2003 sur des huîtres génotypées pour la PGM et dont les paramètres immunologiques ont été analysés sera poursuivie. Des actions complémentaires ponctuelles de mise en parallèle de données génotypiques et phénotypiques déjà acquises sur des familles communes pourraient également être envisagées.

- Résultat attendu : l'analyse en parallèle de génotype et phénotype pourra permettre une meilleure compréhension du phénomène de sélection génétique.

Partenaires : LEMAR, équipe IHP

Calendrier d'exécution

| WP2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 2.1 Sous-tâches 2.1.4 | | | | | | | | | | | | |

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude interdisciplinaire *in situ* des mortalités

Sous-tâche 2.2.3 - DYNAMOR03 (suite analyses et traitement des données) et 2.2.9. DYNAMBDV (suivi léger calage H2S/NH4)

L'ensemble des résultats obtenus en 2003 dans le cadre de DYNAMOR va être intégré dans une étude collective regroupant tous les participants impliqués dans cette expérimentation afin de juger de la pertinence des marqueurs étudiés, ainsi que de déterminer les relations possibles entre ces différents marqueurs afin d'émettre un modèle de fonctionnement de la réponse des marqueurs d'écotoxicologie face aux phénomènes de mortalité estivales. Ce modèle visera notamment à mieux comprendre les réponses différentielles observées entre les familles sensibles et résistantes.

Concernant DYNAMBDV (2.2.9), un suivi des paramètres généraux de la réponse aux stress (HSP70 et MT) sera réalisé ainsi que le suivi de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (le nombre exact de gènes suivis est encore indéterminé).

Calendrier d'exécution

| WP2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 2.2 Sous-tâche 2.2.3 et 2.2.9 | | | | | | | | | | | | |

WP3 - Expérimentation phase I, découplage des paramètres environnementaux

Tâche 3.2 - Energétique et température : définition des conditions limites

Sous-tâche 3.2.2 - adulte, VALI, et Tâche 3.3 : Stress, sous-tâche 3.3.2 : Hypo/hyperoxie.

Nous proposons de mesurer la réponse de marqueurs protéiques (HSP70 et métallothionéines) et génétiques spécifiques de l'hypoxie ou de l'exposition aux pesticides, hydrocarbures, métaux, ..., selon le stress choisi dans le cadre des expérimentations VALI et spécifiques de l'hypoxie pour les expérimentations Stress Hypo/hyperoxie. Les marqueurs ARN suivis seront ceux développés dans le cadre du WP1.

Matériel et méthode : cf. cadre général (§ 0).

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.2 - 3.3 Sous-tâches : 3.2.2 et 3.3.2 | | | | | | | | | | | | |

Tâche 3.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

Sous-tâches - 3.4.1 - Approche gènes candidats et 3.4.2 - Approche génomique

La recherche de polymorphisme potentiellement sélectionné dans les familles sensibles et résistantes sera conduite sur de nouveaux gènes impliqués dans divers processus physiologiques (métabolisme énergétique, détoxification de xénobiotiques, réponse au stress hypoxique,...). Ces travaux s'inscrivent notamment dans le cadre de la thèse d'Elise David.

Ces travaux seront conduits sur les échantillons déjà collectés en 2001-2002 et 2003 afin de suivre l'évolution de la ségrégation de ces marqueurs au cours des générations et ce au niveau des 3 sites d'étude.

Ce travail est mené notamment pour valider les résultats préalablement obtenus sur la PGM et émettre une hypothèse de forte sélection sur des gènes fonctionnels (élément qui viendrait conforter les résultats obtenus sur les fortes valeurs d'héritabilité).

Le LEMAR sera impliqué dans la construction de la micropuce ADN *Crassostrea gigas* par rapport de 600 gènes et ESTs qui viendront s'ajouter aux ESTs du laboratoire LPI et de la DRIM. Cette puce sera également utilisée pour rechercher des gènes candidats lors des expérimentations du WP3.4.

Matériel et méthode

Une recherche de polymorphisme sera réalisée sur les gènes candidats retenus (choisis parmi ceux obtenus dans les différentes banques d'ESTs disponibles mais également en fonction de leur importance dans les métabolismes auxquels ils sont associés). La détection du polymorphisme sera essentiellement réalisée par les méthodes de détection de mutations (technique Single Strand Conformation Polymorphism).

Résultat attendu

L'identification de nouveaux allèles sélectionnés (contre-sélectionnés ou au contraire favorisés) dans des environnements différents et qui soient diagnostics des familles sensibles et résistantes.

Calendrier d'exécution

| WP3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 3.4 | | | | | | | | | | | | |

WP8 - Gestion et organisation du projet

Tâche 8.3 - Rapport et publications

Des actions de réflexions collectives et de mise en commun autour de la rédaction de publications sont en cours, notamment dans le volet écotoxicologie, et seront poursuivies dans l'objectif de soumettre des manuscrits sur les résultats obtenus dans le cadre de l'expérience DYNAMOR en 2002, et ce en regroupant un maximum d'intervenants du programme Morest.

Calendrier d'exécution

| WP8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tâche 8.3 | | | | | | | | | | | | |

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2SINH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| effet de la qualité de la ressource trophique | 3.2.3 | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |

| | | |
|---|-------|--|
| <i>Hypohyperoxie, H2S, NH3...</i> | 3.3.2 | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| <i>Juveniles</i> | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP8. Gestion et organisation du projet | | |
| Coordination | 8.1 | |
| Gestion financière du projet | 8.2 | |
| Bilan, programmation, rapports et publications | 8.3 | |
| Evaluation | 8.4 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP1 | | | | | | | | | | | | |
| WP2 : 2.1.4 | | | | | | | | | | | | |
| WP2 : 2.2.3 | | | | | | | | | | | | |
| WP2 : 2.2.9 | | | | | | | | | | | | |
| WP3 : 3.2.2 | | | | | | | | | | | | |
| WP3 : 3.3.2 | | | | | | | | | | | | |
| WP3 : 3.4 | | | | | | | | | | | | |
| WP8 : 8.3 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Publications

Boutet I., A. Tanguy, M. Auffret and D. Moraga (2003). Molecular identification and expression of and Heat Shock protein 70 (*hsp 70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell. Stress. Chap. 8: 76-85.

Boutet I., A. Tanguy and D. Moraga (2003). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene. (sous presse).

Boutet I., A. Tanguy and D. Moraga - Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biochim. Biophys. Acta (acceptée).

Tanguy A., I. Boutet, and D. Moraga - Molecular identification of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticides. Eur. J. Biochem (en révision).

Tanguy A., I. Boutet, P. Boudry, L. Dégremont, J. Laroche and D. Moraga - Molecular characterization and expression of phosphoglucosmutase (PGM) gene from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Soumis à Comp. Biochem. Physiol Part C.

Boutet I., A. Tanguy and D. Moraga - Molecular characterisation and expression of a cDNA encoding Aspartate Aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. Soumis à Aquat Toxicol.

Boutet I., A. Tanguy and D. Moraga - Identification and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferase pi, mu, omega and sigma classes in *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. Soumis à Mar. Biol.

Boutet I., A. Tanguy and D. Moraga - Molecular identification and expression of glutamine synthetase in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to xenobiotics and abiotic stress. Soumis à Biochim. Biophys. Acta.

Communications

Tanguy A., I. Boutet, D. Moraga et David E. (2003) - Obtention d'ESTs chez *Crassostrea gigas* : résultats de banques soustractives en réponse aux hydrocarbures et aux pesticides. Séminaire Morest - La Rochelle, 26-28 novembre 2003.

Moraga D., A. Tanguy, I. Boutet et David, E. (2003) - Etude du polymorphisme de gènes fonctionnels en relation avec l'environnement. Séminaire Morest - La Rochelle, 26-28 novembre 2003.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Dario Moraga | C (MCU) | 3 |
| Arnaud Tanguy | C (contractuel UBO) | 6 |
| Elise David | Thèse MRT | 8 |
| Elodie Kerjean | Stagiaire IUT | 2 |
| Anne-Leïla Meistertzheim | Stagiaire | 1 |

Demande budgétaire

La demande budgétaire reste constante au cours du projet. Aucunes modifications pour 2004.

Ifremer - DEL/PC - Brest et Nantes

Adresse : Ifremer Centre de Brest - BP 70 - 29380 Plouzané
Ifremer Centre de Nantes
Laboratoire écotoxicologie
Rue de l'Île d'Yeu - 44311 Nantes

Responsable : Thierry Burgeot

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé des actions dans le projet :

Mesure de l'ammonium et de sulfure d'hydrogène dans le sédiment et la colonne d'eau à proximité des bancs d'huîtres

Identification de pesticides dans l'eau et le sédiment

Composition spécifique et chimique du phytoplancton en zones impactées par les apports de pesticides

Suivi, à l'aide du test bivalve, de la toxicité potentielle des sédiments et eaux de sub-surface sous les tables ostréicoles pour évaluer le rôle du sédiment dans les mortalités (DYNAMAURAY, DYNAMO, DYNABDV, FORMER).

Évaluation de la toxicité des pesticides, testés seuls et en mélange.

1 - Descriptif de l'activité

L'objectif de cette étude est de caractériser différentes sources potentielles de stress chimique issues du sédiment ou de la colonne d'eau afin de démontrer leurs interactions dans le phénomène de mortalité. Sur la base des travaux conduits en 2003, l'effort de recherche sera ciblé en 2004 sur la production par le sédiment de substances réduites et toxiques (NH_4^+ et H_2S), la toxicité globale du sédiment et l'impact potentiel des pesticides (composés parents et métabolites) sur la composition spécifique et la qualité nutritionnelle du phytoplancton. Les herbicides en particulier, pourraient constituer une source indirecte du déficit énergétique observé pendant l'effort de reproduction.

Introduction

Les mortalités d'huîtres observées sur les côtes françaises semblent attribuables à l'interaction de phénomènes multiples. Les contaminants chimiques présents dans le sédiment et l'eau constituent l'une des multiples sources potentielles de mortalité. Ils agissent sous forme de toxicité directe ou indirecte en fragilisant l'équilibre physiologique des organismes dans une période sensible de leur cycle biologique. Conjointement à divers facteurs environnementaux, ils contribuent à une cascade d'événements conduisant à un stress environnemental chronique puis aux mortalités.

Les travaux menés en 2003 ont confirmé que :

- le sédiment est une source potentielle de substances réduites (NH_4^+ et H_2S , ammonium et sulfure) vers la colonne d'eau. En effet, pour la colonne sédimentaire et en fonction du temps, le gradient des concentrations d'ammonium et de sulfure, proche de l'interface eau/sédiment est de plus en plus fort. A la disparition du «couvercle» constitué par le sédiment oxygéné, la sortie du

sédiment de ces substances devient donc de plus en plus facile. De plus, nous avons constaté que le relargage de ces substances par le sédiment devient potentiellement significatif aux moments où sont observées les mortalités (15 juin) .

- la toxicité du sédiment sur les embryons d'huîtres augmentait parallèlement à l'apparition des mortalités en juin sur le site atelier DYNAMOR (Marennes-Oléron),
- qu'une déficience énergétique apparaissait pendant l'effort de reproduction accompagnée d'un stress chronique pendant le changement de régime alimentaire des huîtres à Marennes Oléron (DYNAMOR). Le phytoplancton présente une sensibilité différente selon les espèces vis-à-vis des pesticides et particulièrement des herbicides (Bérard et Pelte, 1999; Arzul et Durand, 1998). Il en résulte une modification dans la composition spécifique des assemblages de populations, et une possible sélection d'espèces de moindre intérêt nutritionnel pour les brouteurs.

Objectifs 2004

Action 1

- La production par le sédiment de substances réduites et toxiques (NH₄⁺ et H₂S), la présence de pesticides dans le sédiment et l'eau seront étudiés comme sources de toxicité potentielles pour les huîtres. La sensibilité des larves d'huîtres et du phytoplancton aux herbicides sera étudiée pour confirmer le caractère toxique de mélanges d'herbicides observés dans les zones ostréicoles.

- Le suivi sédimentaire sera reconduit aux sites indiqués ci-dessus dans les actions regroupées en 2.2.7 à 2.2.9 pour évaluer la représentativité des résultats de Dynamor03. Le suivi colonne d'eau et chimie du sédiment le sera dans le WP 2.2.6 (Former04).

Action 2 - Le suivi de toxicité potentielle globale du sédiment sera renouvelé sur les quatre sites d'étude : DYNAMAURAY, DYNAMO, DYNABDV, FORMER; et la toxicité des principaux pesticides employés en Charente recherchée pour les substances testées seules et en mélange aux concentrations mesurées dans l'environnement.

Action 3 - L'évaluation de la présence de pesticides dans l'eau et le sédiment sur le site de Marennes Oléron sera réalisée dans le WP 6 caractérisation de l'environnement pour compléter l'étude de dispersion des pesticides dans le bassin Marennes Oléron et identifier la présence de ces composés en relation avec la composition spécifique du phytoplancton en mai et juin.

Action 4 - La composition, spécifique et chimique, des populations phytoplanctoniques en milieu naturel, lorsqu'elles sont soumises à la présence de contaminants tels que des herbicides, sera étudiée sur les deux sites de la rivière d'Auray et Marennes Oléron.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Action 1 - Mesure de l'ammonium et de sulfure d'hydrogène dans le sédiment et la colonne d'eau sur chaque site atelier sera identique

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE CONDUITE DANS CHAQUE WP

- Prélever à marée basse les carottes sédimentaires représentatives de l'environnement, ainsi que de l'eau de mer à proximité du site de carottage.
- Extraire les eaux interstitielles sur 5 profondeurs dans le sédiment (1, 3, 5, 9, 13 cm) au moyen des dispositifs fournis, puis les en déterminer les teneurs en ammonium et en sulfure au moyen de kits disponibles commercialement. Faire de même avec l'eau de mer.

Matériel et méthode

Pour mesurer les concentrations de sulfure et d'ammoniaque dans les eaux interstitielles, des carottes seront prélevées et analysées pour leurs teneurs en sulfure et en ammonium. Les études terrain seront répétées 5 fois, ce qui va permettre de caler la saisonnalité des concentrations et leur distribution dans la dimension verticale du sédiment par rapport aux observations de mortalité.

Le matériel de terrain qui sera utilisé est du matériel de carottage (tubes en plexiglass) et d'extraction des eaux interstitielles de DEL/PC Nantes (J. Knœry). Ce matériel est déployé à pied sur la majorité des sites sauf en baie de Quiberon où un plongeur sera sollicité.

Parmi les résultats attendus, on peut citer une augmentation progressive des teneurs en ammonium et sulfure sous l'interface eau-sédiment, et une disparition totale de la couche sédimentaire oxygène, permettant ainsi aux substances réduites (ammonium et sulfure, notamment) de diffuser librement depuis le sédiment vers la colonne d'eau. Une vérification qualitative, des teneurs dans la colonne d'eau, sera effectuée en prélevant de l'eau au premier flot, ou dans une flaque adjacente aux points de carottages, puis en analysant comme une eau interstitielle.

Pour les WP2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 et 2.2.9, une formation des différents intervenants sera conduite en mars 2004 pour standardiser les méthodologies de prélèvement et d'analyse employées sur les différents sites d'étude. Cette précaution permettra une meilleure comparaison inter-sites.

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.6 - FORMER04

En baie de Quiberon les concentrations de sulfure et d'ammoniaque seront mesurées **dans la colonne d'eau**. Nous proposons de collecter 12 échantillons entre 0 et 150cm de l'interface eau-sédiment au moyen d'un préleveur étagé et déployé par un plongeur en 3 endroits de la baie de Quiberon. Ceux-ci sont placés à proximité des sites de carottage. Les échantillons seront analysés sur place et le plus rapidement possible, dès leur retour au laboratoire de la Trinité. Par un suivi saisonnier des concentrations en H₂S et NH₄⁺ à proximité du fond et un gradient vertical sera déterminé à 2 m du fond. Nous pourrions mesurer l'importance de ces substances dans les mortalités estivales. Les eaux interstitielles des carottes prélevées conjointement seront analysées pour leur teneurs en sulfure et en ammonium.

Sous-tâche 2.2.7 - DYNAMAURAY - 2.2.8 - DYNAMOR04 et 2.2.9 DYNAMBDV

En rivière d'Auray, à Marennes Oléron et en baie des Veys, les concentrations de sulfure et d'ammoniaque seront mesurées dans les eaux **interstitielles** suivant le protocole décrit dans la méthodologie en 1.1.1b.

Tableau des partenaires par site

| Partenaires | Auray | Baie de Quiberon | Baie des Veys | Marennes Oléron |
|--|-------|------------------|---------------|-----------------|
| DRV/RA/LCB E Bedier et PG Fleury | X | X | | |
| DELD/DRV/RA/LERPC et CREMA P. Soletchnick, Fr. Blouin, P. Malestroit et P.G. Souriau | | | | X |
| DRV/RA/LERN M. Ropert avec C. Simonne | | | X | |

Action 2 - Suivi de la toxicité potentielle des sédiments et eaux de sub-surface sous les tables ostréicoles pour évaluer le rôle du sédiment dans les mortalités. Evaluation de la toxicité des pesticides.

L'utilisation du développement embryon-larvaire de l'huître creuse a été proposée pour l'évaluation de la qualité de l'environnement depuis le début des années 1970 (Woelke, 1972) et appliquée en France par plusieurs agents de la DEL (Lassus *et al.*, 1990 ; Quiniou et Toularastel, 1991) et utilisée dans nombreux travaux (Naudin *et al.*, 1995 ; Pagano *et al.*, 1996 ; Quiniou *et al.*, 1997 ; Géffard, 2001). L'emploi de ce test est recommandé pour l'évaluation de la toxicité potentielle des sédiments (Quinou et Alzieu, 1999, Quiniou, 2201).

L'objectif est d'évaluer la toxicité potentielle des sédiments et eaux de sub-surface, sous les tables ostréicoles, afin de déterminer quelle peut-être leur part de responsabilité dans les mortalités des huîtres.

Matériel et méthode

La toxicité potentielle sera évaluée à l'aide du test "développement embryon-larvaire de bivalve" : le développement embryonnaire est réalisé en présence de sédiment (0 à 10 grammes de sédiment par litre de milieu test) ou d'eau. Dès l'obtention de larves "D" (24 h à 24 °C en eau de mer référence de salinité 30), l'effet toxique est déterminée par le calcul du taux de réussite des larves qui doivent avoir la forme d'un "D" régulier contenant l'ensemble du manteau à la fermeture des valves. Les essais sont réalisés sur des géniteurs maturés en éclosérie et n'ayant pas été exposés à l'environnement naturel.

Le calendrier des prélèvements de sédiment et eau à tester suivra celui des suivis réalisés sur ce site, à raison de 3 à 4 fois dans l'année, réparti de mars à octobre.

Résultats attendus

Les effets toxiques seront comparés à ceux de l'année précédente et cela à trois ou quatre périodes de l'année 2004 : au printemps avant la maturation des huîtres, en été au moment de la pleine maturité et en fin d'été ou en automne après la ponte.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Les résultats seront confrontés au suivi des mortalités afin de vérifier s'il existe ou non une corrélation de cause à effet. Les effets observés seront confrontés aux résultats du suivi chimique réalisé sur les mêmes stations (J.Knoery).

Sur les sites de la baie des Veys, Marennes Oléron et Auray, la recherche de toxines de champignons sera effectuée, en collaboration avec l'Université de Nantes, sur les mêmes sédiments ainsi que dans un échantillon de moule placé, à proximité, afin de rechercher la présence de toxines de champignons déjà observée sur un autre site du littoral.

Description par tâche

La méthodologie appliquée pour l'ensemble des tâches est celle décrite en 1.1.2 a). Quelques points spécifiques sont précisés par tâche.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.3 - DYNAMOR03

Les données acquises en 2003 feront l'objet d'une exploitation plus complète que celle réalisée pour le séminaire de novembre 2003.

Sous-tâche 2.2.5 - SUMO

Comme en 2003, les sédiments et eaux de sub-surface, seront prélevés sur 4 des stations suivies par les partenaires de la Tâche SUMO.

Sous-tâche 2.2.6 - FORMER04

Comme en 2003, les sédiments et eaux de sub-surface, seront prélevés sur 2 des stations suivies en baie de Quiberon (parcs en eau profonde), ainsi que sur le site de la rivière d'Auray (Fort Espagnol) par les partenaires du projet FORMER qui fait l'objet d'une demande auprès de la région.

Sous-tâche 2.2.7 – DYNAMAURAY

Les sédiments et eaux de sub-surface, seront prélevés sur le site de la rivière d'Auray instrumenté pour le suivi des mortalités (Fort Espagnol) par les partenaires du projet.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche : des compléments d'informations pourront être obtenus par le biais du projet IPEM (Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin) auquel DEL/PC/Brest participe.

Sous-tâche 2.2.8 – DYNAMOR04

Sur la zone du bassin de Marennes Oléron, un certain nombre de mesures ont été effectuées au printemps au niveau de chenaux de sortie de marais entre l'embouchure de la Seudre et de la Charente (zone du marais de Brouage). Les travaux du laboratoire de La Tremblade (D. Masson) et ceux de His et Beiras (1995), montrent que les apports des bassins versants sont susceptibles de transporter sur les zones ostréicoles des eaux potentiellement toxiques pour les larves d'huîtres. Les sédiments et eaux de sub-surface, seront prélevés sur le site atelier DYNAMOR instrumenté pour le suivi des mortalités et les caractéristiques chimiques du sédiment par les partenaires du projet les principaux pesticides employés dans le bassin versant de Marennes-Oléron seront aussi testés seuls et en mélange pour évaluer leur toxicité potentielle.

Sous-tâche 2.2.9 - DYNABDV

Comme en 2003, les sédiments et eaux de sub-surface, seront prélevés sur le site atelier DYNABDV

Action 3 - Herbicides

WP 6 - Caractérisation de l'environnement

Tâche 6.2 - Acquisition de données

Sous-tâche 6.2.1 - Herbicides sédiment et/ou particulaire comparatif eau

Cette action sera menée sur le site de Marennes Oléron dans l'objectif est de :

- compléter l'étude de la dispersion des pesticides dans le bassin de Marennes Oléron en collaboration avec le CEMAGREF, URE qualité des eaux de Cestas (programme PEVS) et J.Y. Stanisière laboratoire côtier, Ifremer LERPC l'houmeau.
- identifier et quantifier la présence de pesticides dans le sédiment et l'eau sur le site de l'estuaire de la Charente et de l'estuaire de la Seudre. Les pesticides seront étudiés comme source toxique susceptible d'influencer la composition spécifique et chimique du phytoplancton. L'hypothèse d'étude est l'interaction indirecte des pesticides *via* un changement de qualité du régime alimentaire sur le stress chronique des huîtres exprimé par les huîtres avant mortalité.

Matériel et méthode

- Prélèvement de sédiment : 2 prélèvements de sédiment en période de stress chronique (mai-juin) dans l'estuaire de la Charente et l'estuaire de Seudre (le prélèvement de Seudre pourra être couplé avec le prélèvement de J. Knoery)
- Prélèvement d'eau (mai-juin) : 1 prélèvement d'eau journalier sera réalisé sur le site de La Charente en collaboration avec l'équipe du CEMAGREF (J.F. Dubernet) et un prélèvement d'eau journalier (lundi au vendredi) sera réalisé sur le site de Mus de Loup en collaboration avec le LERPC Ifremer de la Tremblade (D. Masson). Un regroupement des prélèvements journaliers sera réalisé pour chaque semaine afin de limiter les analyses chimiques.

Résultats attendus

- Identifier et quantifier les pesticides comme source de toxicité potentielle pour le phytoplancton, indicateur de la qualité du régime alimentaire des huîtres.
- Etudier la dispersion des pesticides dans la zone sud du bassin de Marennes Oléron au voisinage du site atelier Perquis (DYNAMOR)

Liens avec d'autres partenaires

CEMAGREF URE qualité des eaux, Cestas, intervenant dans le programme PEVS : J.F. Dubernet
Ifremer LERPC La Tremblade : D.Masson et P. Soletchnik:
Ifremer LERPC L'Houmeau : J.Y. Stanisière

Action 4 - Etude de la composition spécifique et chimique du phytoplancton en zone impactées par les apports de pesticides

WP 6 - Caractérisation de l'environnement

Tâche 6.2 - Acquisition de données

Sous-tâche 6.2.3 - Caractéristique des producteurs primaires en zones impactées par les pesticides.

Protocole général de la tâche

Suivi de la composition spécifique de populations phytoplanctoniques

Le suivi des espèces phytoplanctoniques est réalisé selon le protocole des expériences en cours, dans le cadre du projet "Impact des pesticides sur l'Environnement Marin" (IPEM) financé par le MEDD.

Un prélèvement d'eau préalablement filtré sur 200 µm (pour éliminer le zooplancton) est réparti en 2 bidons en Nalgen de 12 L, et les pesticides en mélange (cf expérimentations 2003) sont apportés dans l'un.

Les bidons sont maintenus en salle de culture (température et éclairage contrôlés, lumière alternée jour/nuit). Un prélèvement journalier (100 mL) est effectué pour l'analyse spécifique et quantitative des algues. L'échantillon est conservé lugolé avant sa décantation en cellule d'Utermöhl. La chlorophylle est également suivie sur une fraction de 500 mL filtrée sur filtre Whatman GF/F. Le filtre est conservé au congélateur en attendant l'extraction selon la méthode de Lorenzen (selon Aminot et Chaussepied, 1983).

L'expérience est poursuivie durant 5 jours.

Nombre d'échantillons de phytoplancton à déterminer, par site : 11

Nombre d'échantillons de chlorophylle à analyser, par site : 11.

Analyse des lipides chez les populations phytoplanctoniques

Les acides gras polyinsaturés dans les algues seront analysés par chromatographie en phase gazeuse. J.R. Le Coz (DRV/RA/UMR/PE2M Brest) étant d'accord, l'analyse sera effectuée avec son équipement qui est utilisé en routine. Les cellules étudiées seront concentrées par filtration puis traitées (extraction en chloroforme-méthanol, ultrasons, conservation sous N₂, puis méthylation et injection). La composition en lipides chez les populations soumises à l'apport de pesticides sera comparée à celle des témoins, sans contamination.

L'expérience sera effectuée dans un premier temps sur des algues en cultures monospécifiques (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*) soumises à différents apports d'herbicides. Elle sera également faite au cours de l'expérience sur les populations naturelles, si la densité cellulaire est suffisante pour permettre la détection des acides gras.

Nombre d'analyses prévues sur cultures : 40 environ

Nombre d'analyses prévues sur échantillons naturels, par site : 9

Résultats attendus par cette tâche

- Détermination de l'influence des pesticides sur les modifications dans la composition spécifique des populations phytoplanctoniques.
- Détermination de l'influence des pesticides sur les modifications dans la composition en lipides des populations phytoplanctoniques.

Tableau récapitulatif

| Expériences | Périodes | Durée | Personnel |
|---|-----------------------|----------------------|---|
| Cultures de phytoplancton | Automne-hiver 2004-05 | 1 mois | G. Arzul Stagiaire |
| Populations phytoplanctoniques naturelles | Printemps-Eté 2004 | 0.5 mois 2.5 mois | G. Arzul Autre : Participation EC (technicien) ou Sous-traitance (systématique) ou Commande de travaux (systématique) |

bibliographie

Aminot A. (1983) Dosage de la chlorophylle et des pheopigments par spectrophotométrie. In : A. Aminot et M. Chauvageon (Eds), Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Public. CNEXO, BP 337-29279 Brest Cedex, pp177-192.

Arzul G. et G. Durand (1999) Effet des herbicides sur la croissance *in vitro* du phytoplancton marin. In : Michel Merceron (coordinateur) : Pollution diffuses : du bassin versant au littoral. Série Actes de Colloques n° 24, Ifremer Publish. pp. 86-94.

Arzul G., P. Gentien, G. Bodennec (1998) Potential toxicity of microalgal polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In : Baudimant G., Guézennec J., Roy P. and Samain J.F. (co-ord.) : Marine Lipids. Série Actes de Colloques n° 27, Ifremer Publish. pp. 53-62

Bérard, A. et T. Pelte (1999) Les herbicides inhibiteurs du photo-système II, effets sur les communautés algales et leur dynamique. Revue des Sciences de l'Eau 12/2, 333-361.

Bodennec, G., P. Gentien, C. Parrish and M.P. Crassous (1998) Lipid class and fatty acid compositions of toxic *Gymnodinium* and *Heterosigma* strains : haemolytic and signature compounds. In : Baudimant G., Guézennec J., Roy P. and Samain J.F. (co-ord.) : Marine Lipids. Série Actes de Colloques n° 27, Ifremer Publish. pp. 66-74.

Doherty M.A. (1997) Biochemical Toxicology of Herbicide Mixtures on *Thalassiosira weissflogii*. Thesis publ., 276 pp. Source UMI, 300 N Zeeb Rd, POB 1346, Ann Arb.

Géffard O. (2001) Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse Univ. Bordeaux I, spécialité Ecotoxicologie. 351 p.

Goragner H. et F. Toularastel (1999) Toxicité des sédiments – test sur embryons de bivalves. Rap.Int DEL/99.10/Brest, 16 p.

Hendricks I.E., L.A. van Duren, P.M.J. Herman (2003) Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 296, 199-213.

His E. et R. Beiras (1995) Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larval simplified bioassay method. Oceanologica Acta. 18, 591-595.

Lassus P., G. Bogé, P. Gentien, R. Loarer, G. Pagano, F. Quiniou (1990) Toxicité des rejets urbains. Colloque Rejets Urbains.Ifremer Actes de colloques 11. 171-186.

Naudin S., M. Pardos et F. Quiniou (1995) Toxicité des sédiments du bassin versant du Stang Alar déterminé par une batterie de bioessais. - Ingénierie -EAT, spécial rade de Brest - p.67-74.

Pagano G., E. His, R. Beiras, A. De Biase, L.G. Korkina, M. Laccarino, R. Oral, F. Quiniou, M. Warnau, N.M. Trieff (1996) "Cytogenetic, Developmental, and Biochemical effect of aluminium, Iron, and their mixture in sea urchins and mussels." Arch. Environ. Contam. Toxicol. , 31 (4) : 466-474.

Quiniou F. et C. Alzieu (1999) L'analyse des risques chimiques appliquée aux dragages. Ch. VII In Dragages et environnement marin (Cord ; C. Alzieu), Ed Ifremer. 129-166.

Quiniou F. et F. Toularastel (1991) Mesure de l'effet biologique de la qualité d'un milieu par le bio essai embryon de bivalve marin. CIEM 1991/E :26, Ref K (Shellfish committee), 7 p.

Quiniou F. (2001) "Les tests de toxicité" in CD-ROM Geodrisk 'Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des déblais de dragages des ports maritimes', Coord. C. Alzieu , Ed. Ifremer, Juin 2001.

Quiniou F., A. Judas et E. Le Squer-André (1997) Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par deux bioessais - Annales de l'Institut Océanographique. 73 (1), 35-48

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|---|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA</i> | 2.2.12 | |
| WP6. Caractérisation de l'environnement | | |
| Recensement de données physiologies associées à différents sites | | |
| Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites | 6.1 | |
| <i>Estimation des débits et des flux des bassins versants :..... (voir 2.2.1)</i> | | |
| <i>2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i> | | |
| <i>Complément débits, MO et pesticides particulières issus des bassins Versants en BDV</i> | 6.1.1 | |
| Acquisition de données | 6.2 | |
| <i>Herbicides sédiment oulet particulière comparatif eau</i> | 6.2.1 | |
| <i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i> | 6.2.2 | |
| <i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?, (Phytoplankton)</i> | 6.2.3 | |
| <i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i> | 6.2.4 | |
| <i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Biodépôts BDV</i> | 6.2.5 | |
| <i>Biocénose BDV</i> | 6.2.6 | |
| Modélisation | 6.3 | |
| <i>Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle</i> | 6.3.1 | |
| <i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.2 | |
| <i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.3 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 6 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Burgeot T., D. Moraga, C. Lelong, T. Renault, J. Haure, F. Quiniou (2003) Contributions au séminaire Morest 2002, rapport d'activité 2002 défi Morest : Volet écotoxicologie. 10p.

Burgeot T., F. Geret, D. Menard, G. Bocquené, J. Haure, M. Papin, C. Penisson, H. Palvadeau, M. Noury, B. Dupuy, T. Renault, B. Gagnaire, A. Le Roux, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, D. Moraga, I. Boutet, E. Bichon, D. Violeau, A. Royer, P.Y. Communal, A. Pfohl Leskowicz, F. Quiniou, B. Klein, X. Caisey (2003) Ecotoxicologie et bio-marqueurs de stress. Séminaire Morest - La Rochelle Novembre 2003.

Burgeot T., J. Haure, F. Geret, D. Menard, T. Renault, B. Gagnaire, A. Le Roux, J.F. Samain, D. Moraga, I. Boutet, F. Gagné, C. André, E. Bichon, P.Y. Communal, A. Pfohl Leskowicz, F. Quiniou, D. Masson, P. Soletchnik (2003) Stress environnemental. Séminaire Morest. La Rochelle Novembre 2003.

Gagnaire B., F. Geret, J. Haure, J.L. Martin, T. Burgeot and T. Renault (2003) Effect of pesticides exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. Communication Orale. Colloque de malacologie Univ. La Rochelle. 24 au 28 juin 2003

Géret F., B. Gagnaire, D. Ménard, T. Renault, A. Le Roux, J. Haure, G. Bocquené & T. Burgeot (2003) Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to pesticides exposition. Poster présenté au XIIème Colloque PRIMO, Floride, 8, 13 mai 2003.

Klein B. (2003) Evaluation of the potential toxicity of seiment and pesticides on the basin of Marennes-oléron using a bivalve bioassay. Rapport de stage de l'Univ. Of Hogeschool Brabant. R.INT?DEL-PC/2003.07/Brest. 43p.

Quiniou F., X. Caisey, M. Breugnot, C. Carrié (2002) Toxicité potentielle des rivières de la baie des Veys - Suivi de mai à octobre 2002. Séminaire Morest, Brest novembre 2002.

Quiniou F., X. Caisey, L. Bodineau, M. Lassus and B. Klein (2004) Use of marine bivalve embryonic development *Crassostrea gigas* to ases the effect of mixtures : eight pesticides and two PAH's. Poster accepté à SETAC Europe 14th meeting , Prague avril 2004

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-------------------|----------------|---------------------|
| Quiniou Françoise | C | 2 |
| Thierry Burgeot | C | 2.5 |
| Arzul Geneviève | C | 2 |
| Joel Knoery | C | 3 |
| Caisey Xavier | T | 2 |
| Dominique Ménard | T | 0.75 |
| Jane Bretaudeau | T | 2 |
| Bernard Averty | T | 1/2 |
| baie des Veys | C et T | 1/2 à 3/4 |
| Marennes Oléron | C et T | 1/2 à 3/4 |

Demande budgétaire

Pour la partie bio essais : le budget est le même que l'an passé avec en plus la part du projet FORMER.

Thème Ecologie côtière

Ifremer - CREMA - L'Houmeau

Adresse : Ifremer - CREMA
Place du Séminaire
B.P. 5
17137 L'Houmeau

Responsable (du laboratoire) : Patrick GENTIEN

Coordinatrice des actions Morest du laboratoire : M. ALUNNO-BRUSCIA

Liste des différents acteurs du laboratoire dans Morest : M. Alunno-Bruscia, Pierre-Guy Sauriau (et Nathalie Malet), C. Bacher

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

Ecophysiologie (M. Alunno-Bruscia), traçage isotopique (P.G. Sauriau) et modélisation (C. Bacher)

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

Les actions 2003 ont consisté :

- 1) co-organiser 2 groupes de travail et acquérir des données pour la calibration du modèle à mailles fines en développement sur Marennes-Oléron (thèse C. Struski) pour le volet modélisation (C. Bacher) ;
- 2) réaliser une mise à jour technique de l'automate de mesures (filtration, respiration) de S. Bougrier pour des mesures écophysiologiques ponctuelles *in situ* (M. Alunno-Bruscia) ;
- 3) déterminer par traçage isotopique naturel (carbone et azote) la variabilité spatiale et temporelle des ressources trophiques des huîtres à 15 et 70 cm du fond sur les expériences Dynamo 2002 (labo. resp. : LCPC ; P.-G. Sauriau et N. Malet).

Les objectifs du labo pour 2004 concernent l'étude des interactions trophiques huître/milieu dans le but de :

- 1) quantifier la réponse adaptative des huîtres, en terme d'écophysiologie (filtration, respiration, assimilation, croissance), aux variations des facteurs environnementaux (température, matières en suspension, phytoplancton),
- 2) déterminer par modélisation le rôle des huîtres dans les flux de matières à l'échelle de l'écosystème Marennes-Oléron,
- 3) modéliser et analyser la variabilité spatiale et temporelle des conditions trophiques,
- 4) déterminer par traçage isotopique naturel (carbone et azote) la variabilité spatiale et temporelle des ressources trophiques des huîtres dans la cadre de l'expériences Dynamor 2003 (fin d'analyses isotopiques, P.G. Sauriau et N. Malet, collaboration avec le LCPC). Les actions 2) et 3) sont assurées par C. Bacher → voir avec lui dans quel labo ses actions doivent être affichées.

WP1 - Mise au point d'un outil en écophysiologie

(estimation du SFG en conditions semi-naturelles, avec du seston naturel)

L'outil qui est en cours de mise au point est un automate de mesures écophysiologiques qui va permettre de faire des mesures en conditions semi-contrôlées (ou semi-*in situ*, i.e. avec du seston naturel pompé directement dans le milieu) des taux de filtration, respiration, biodéposition et assimilation pour une estimation du SFG (scope for growth). Cet outil écophysiologique permettra de valider les tendances observées en conditions expérimentales d'Argenton.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Variabilité spatiale et temporelle des ressources trophiques de l'huître : étude par isotopie naturelle (tâche 2.2.3. → *DYNAMOR03*) : Pierre-Guy Sauriau et Nathalie Malet.

L'objectif est de déterminer sur les expériences Dynamor 2003, comme il l'a été fait sur les expériences Dynamo de 2002, les ressources trophiques des huîtres à 15 et 70 cm du fond. La technique utilisée à partir du traçage isotopique naturel sur le carbone et l'azote, permettra d'établir : la proportion des apports pélagiques et benthiques à la nutrition des huîtres, et d'observer d'éventuels oscillations de ces proportions en regard des saisons, en particulier des périodes de mortalité printanière. L'examen conjoint d'huîtres diploïdes et triploïdes devrait permettre de faire la part des processus relatifs à la gamétogenèse dans la signature isotopique des huîtres. Les analyses envisagées sur les huîtres concernent 3 types d'organes : le muscle, la glande digestive et la gonade. Les mesures hydrologiques classiques du réseau RAZLEC sont complétées par l'analyse de la signature isotopique de la colonne d'eau et des algues benthiques. L'interprétation de ces résultats se fera en très étroite collaboration avec le LCPC La Tremblade au vu des analyses biométriques et biochimiques réalisées sur les huîtres de l'expérience.

Réalisation de bilans énergétiques simplifiés d'huîtres *in situ* (tâches 2.2.10 → *ARCACHON*) : Marianne Alunno-Bruscia

L'action envisagée est de réaliser en conditions semi-*in situ* (seston naturel pompé sur site) des mesures ponctuelles de filtration, respiration, absorption, assimilation sur des individus Morest pour dresser un bilan énergétique quasi-complet (i.e. sans terme d'excrétion) d'huîtres à des périodes critiques du cycle d'élevage sur les sites atelier de Morest. Ces mesures seront réalisées avec des automates de mesures écophysiologiques, à trois dates en fonction du cycle de gamétogenèse : en avril (semaines 17&18 ; début de cycle), en juin (semaines 22, 23 et 24 juste avant la ponte) et en septembre (semaines 37 et 38), et sur trois lots d'huîtres ""R", "S" et témoins). Un SFG sera établi pour chaque lot et à chaque date, pour une comparaison avec les données obtenues en conditions expérimentales d'Argenton sur des huîtres de 18 mois (cf. GIGAREPRO2002&2003).

WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Bilan écophysiologique des huîtres de l'expérience *BETON* (tâche 3.5.1.) : M. Alunno-Bruscia

L'action envisagée est de faire un point écophysiologique (mesures de filtration, respiration, absorption, assimilation) sur les individus qui seront transférés de Bouin à la Tremblade, l'idée étant de caractériser le SFG de ces huîtres parallèlement au suivi quotidien des mortalités qui sera fait à La Tremblade. Les mesures envisagées à la Tremblade sur une période de 2 à 3 semaines (semaines 28 à 30) seront réalisées avec des automates de mesures écophysiologiques.

WP6 - Caractérisation de l'environnement

Le CREMA (*via* C. Bacher) est impliqué dans la coordination des actions concernant l'analyse des données provenant des réseaux. Cette analyse est menée au niveau des laboratoires côtiers (Arcachon, Marennes, baie des Veys) avec un soutien méthodologique demandé à la DEL et/ou à MAERHA.

Tâche 6.3 - Modélisation de la variabilité environnementale

Sous-tâche 6.3.1 - Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle (*C. Bacher*)

Marennes-Oléron

L'objectif est de valider le modèle hydrodynamique et dynamique sédimentaire. Des simulations seront effectuées et comparées aux données disponibles de matières en suspension et salinité. Des données seront acquises pour valider le modèle hydrodynamique sur l'ensemble du bassin de Marennes-Oléron (ADCP). Ce travail sera effectué dans le cadre d'un D.E.A.

Baie des Veys

Le laboratoire DEL de Port en Bessin et DEL/EC ont mis en place le code MARS2D sur la baie des Veys en 2003. Des premières simulations seront réalisées en 2003 pour décrire le devenir des flux apportés par les bassins versants (DESS P. Misko, encadrement J.Y. Piriou, DEL/EC). Le CREMA participera à la définition de scénarios supplémentaires et l'expertise des résultats.

Sous-tâche 6.3.2 - Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation d'énergie

Dans le cadre d'un projet de collaboration bilatérale avec une équipe de chercheurs néerlandais (projet DEBIB "Dynamic energy budget in bivalves"), une réflexion sera entamée pour mettre au point un modèle générique d'allocation d'énergie chez les bivalves. Sont impliqués dans ce groupe de réflexion, côté Ifremer : C. Bacher, S. Pouvreau, S. Casas, M. Alunno-Bruscia. Le but est d'élaborer un modèle générique de croissance et de reproduction de bivalves marins, basé sur un budget dynamique d'énergie ("DEB model") intégrant un ensemble de fonctions écophysologiques. Pour ce faire, nous lierons l'expertise d'une équipe de recherche néerlandaise (3 chercheurs dont 1 post-doc, 1 assistant, 1 étudiante) en matière de modélisation, et notamment du modèle DEB, à nos propres compétences en matière d'écophysologie des bivalves marins et de modélisation (équipe de 4 chercheurs dont 1 post-doc, 2 étudiants). L'approche innovante que nous développerons repose sur trois étapes : [1] la paramétrisation du modèle DEB pour différents bivalves (e.g. moules, huîtres, coques) ; [2] la prise en compte par le modèle des paramètres abiotiques et de leur impact sur la physiologie des organismes (classification de Fry ; Fry 1947, 1971) ; [3] la prédiction de la croissance et de la reproduction des différentes espèces considérées en fonction de conditions environnementales variables et la comparaison avec des données expérimentales ou de terrain pour comprendre les interactions biotiques entre espèces.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Ecotoxicologie | 1.5 | |
| Ecologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Tripløide RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio) | | |
| - VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ? | | |
| - VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest) | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle pathol/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypol/hyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |

| | | |
|--|-------|--|
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH RIS et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| <i>Juveniles</i> | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP6. Caractérisation de l'environnement | | |
| Recensement de données physiologies associées à différents sites | | |
| Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites | 6.1 | |
| <i>Estimation des débits et des flux des bassins versants :..... (voir 2.2.1) 2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i> | | |
| <i>Complément débits, MO et pesticides particulières issus des bassins Versants en BDV</i> | 6.1.1 | |
| Acquisition de données | 6.2 | |
| <i>Herbicides sédiment oulet particulière comparatif eau</i> | 6.2.1 | |
| <i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i> | 6.2.2 | |
| <i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?, (Phyto/phytobenthos</i> | 6.2.3 | |
| <i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i> | 6.2.4 | |
| <i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9</i> | | |
| <i>Biodépôts BDV</i> | 6.2.5 | |
| <i>Biocénose BDV</i> | 6.2.6 | |
| Modélisation | 6.3 | |
| <i>Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle</i> | 6.3.1 | |
| <i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.2 | |
| <i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.3 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 6 | | | | | | | | | | | | |

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-------------------|----------------|---------------------|
| M. ALUNNO-BRUSCIA | C | 5 |
| P.-G. SAURIAU | C | 1,8 |
| C. BACHER | C | 2 |
| N. MALET | Doctorant | 9 |

Demande budgétaire

La demande budgétaire est celle que nous avons adressée à l'EPRD 2004, en juillet 2003. Les montants demandés étaient de 17620 € en fonctionnement et de 10000 € en investissement.

Ifremer - DEL/DRV/RA/LER/N - Port-en-Bessin

Adresse : Ifremer Port En Bessin
Laboratoire Environnement Ressources de Normandie
Av du Gal De Gaulle – BP 32
14 520 PORT-EN-BESSIN

Responsable : Ronan LE GOFF

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé des actions dans le projet :

Contribution aux tâches morest WP2, WP4, WP5, WP6, WP7

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

Depuis l'origine du programme Morest, la baie des Veys a été retenue comme l'un des trois sites ateliers d'intérêt national (aux cotés de Marennes-Oléron en Charentes-Maritime et de la rivière d'Auray en Bretagne). Comme son prédécesseur (Lab. Conch. de Normandie, LCN), le nouveau Laboratoire Environnement Ressources de Normandie (LERN) est donc en charge de la gestion et de la coordination de l'ensemble des actions de terrain qui concerne le site atelier de la baie des Veys. Ainsi, il contribue à différentes tâches développées à l'échelle nationale impliquant l'ensemble des moyens de Morest. En parallèle, il est également amené à développer des actions plus spécifiques au contexte régional à l'échelle de la baie des Veys.

Descriptif des actions par WP

Les projets développés par le LERN en 2004 s'articulent autour des 5 thématiques (Workpackage) suivantes : Caractérisation *in situ* des mortalités estivales (WP2), Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales (WP4), Synergie Morest-REPAMO-REMORA (WP5), Caractérisation de l'environnement (WP6) et Gestion et communication (WP7).

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.1 - Effet génétique

Sous-tâche 2.1.5 - Maintien des performances "R" et "S" au cours du second été en baie des Veys

Présentation

Au cours des années précédentes, le maintien des performances "R" et "S" au cours du second été a été bien observé sur les sites ateliers de Marennes-Oléron (BMO) (Degrémont et al., 2002b ; 2002c ; 2002a) et de la rivière d'Auray (RA) (Bedier & al., 2002). En baie des Veys, seul le maintien des performances "R" a pu être testé au cours de l'été 2002 (Degrémont et al., 2002a).

Matériel et méthode

En 2004, il est proposé, sur le site de la baie des Veys, de renouveler cette expérimentation sur les deux souches "R" et "S" issues de la génération produite en 2003 (G3) âgées de 18 mois. Quatre cheptels de références serviront de support à cette action. Ils sont présentés dans le tableau suivant.

| Age | Souche | historique | Identification |
|-----------------|---------------------|---|-----------------|
| 18 mois (G2) | "Résistante" (R) | Ayant exprimé des mortalités au cours de l'été 2003 en BDV (M) | G3R-M |
| | | Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (IM) | G3R-IM |
| | "Sensible" (S) | Ayant exprimé des mortalités au cours de l'été 2003 en BDV (M) | G3S-M |
| | | Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (IM) | G3S-IM |
| | TEMOIN | Diploïdes d'origine professionnelle (issues de télécaptage ayant connu l'été 2003 en BDV) | Lot F (de SUMO) |

Il n'est pas prévu de suivi temporel particulier de la mortalité dans la mesure où la réponse à la question posée résultera du constat effectué sur les 4 cheptels sélectionnés en fin d'élevage, après que soit passé la période d'expression de la mortalité en baie des Veys (fin du mois d'octobre 2004).

Résultats attendus

Il a été montré, sur les autres sites ateliers de Morrest, que des cheptels ayant exprimé une mortalité au cours de la première année étaient susceptibles d'être moins "sensibles" au cours de la seconde année. Cette hypothèse sera vérifiée en 2004 en BDV.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Selon le besoin et la demande, des liens éventuels avec d'autres actions pourront être envisagés (i.e. Tâche 3.2.2. ; Tâche 2.2.0..etc). ils sont encore à définir.

Calendrier

Le lancement de cette expérimentation est prévu pour le mois de mars 2004 ; date à laquelle le bilan final sera réalisé et déterminée en fonction des niveaux de mortalités et de leur dynamique temporelle suivis dans le cadre de SUMO (Cf. ci après).

Références

Bedier E. et al. (2002). (TOP FLOP) Comparaison *in situ* de familles F1 de phénotype survie opposé - Présentation, données environnementales et mortalités Séminaire Morest 2002, BREST, 13-15 nov 2002. BREST.

Degrémont, L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002a). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, (TOP-CARES) Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. Séminaire Morest 2002, BREST, 13-15 nov 2001.

Degrémont, L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002b). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, Lots consanguins Séminaire Morest 2002, BREST, 13-15 nov 2001.

Degrémont, L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002c). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, sélection divergente. Séminaire Morest 2002, BREST, 13-15 nov 2001.

Toutes ces références sont consultables :

<http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-1seldivLD.pdf>

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.1 - Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur 3 sites ateliers de Morest (NIRVANA)

Présentation

Cette action de collaboration entre les laboratoires côtiers (LERN, LERPC et LCB) se décompose en 2 parties :

- relation entre mortalités et température sur les trois sites ateliers de Morest = "analyse : Nirvana"
- relation entre mortalités et apports d'eau douce sur les sites ateliers de Morest

L'objectif de cette tâche est de préciser la relation mortalité et température sur les 3 sites atelier de Morest au cours d'élevages effectués entre 2001 et 2003 sur les 3 sites. La même démarche est développée dans le cadre de la relation entre mortalité et apport d'eau douce; l'apport d'eau douce pouvant être approchée par les dessalures saisonnières, confortées par des informations météorologiques. (Soletchnik & Ropert, 2002)

Ces traitements et analyses sont dépendants d'une collaboration de travail en constitution de bases de données et analyses au niveau des trois labos : LERN, LERPC et LCB.

Matériel et méthode

- Traitement et analyse de données sur l'environnement et la mortalité en provenance des trois labos.
- Prise en compte d'élevages sur lesquels la mortalité se sont manifestées de façon aiguë, et pour lesquels nous disposons simultanément de données thermiques haute fréquence (sondes à enregistrement en continu).

Résultat attendu

Préciser les relations mortalité, température et apport d'eau douce dans le cadre de la problématique Morest.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- LERPC (P. Soletchnick),
- LCB (J. Mazurié ; E. Bedier ; J.F. Bouget)

Référence

Soletchnick P. et M. Ropert (2002). Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charentes-Maritimes) de 1997 à 2002. Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 nov 2001.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP6_Babela.pdf

Sous-tâche 2.2.5 - SUMO - Suivi de la dynamique spatio-temporelle en baie des Veys

Présentation

Cette tâche fait suite au travail développé par le LCN depuis 4 ans (Kopp & Ropert, 1999; Ropert & Costil, 2001; Dubois & Ropert, 2002; Ropert, 2002; Ropert *et al.*, 2003). Son objectif est de permettre de disposer, à tout moment de l'année, d'un outil de terrain efficace lui permettant d'appréhender la dynamique spatiale et temporelle des mortalités. Il repose sur un réseau de six stations ateliers regroupant différents cheptels, de classes d'âge et/ou d'origine différentes, représentatifs des pratiques culturelles locales.

Matériel et méthode

En 2004, 3 lots seront disposés sur le terrain. Deux d'entre eux, déjà présent en 2003, sont des huîtres adultes de 30 mois (3^{ème} année d'élevage) : 1 lot triploïde (Lot D) et 1 lot diploïde (lot E). Le 3^{ème} lot (Lot F) sera constitué d'huîtres âgées de 18 mois, diploïdes d'origine professionnelle (Captage naturel de Vendée). Ces 3 cheptels seront répartis sur les 6 stations de suivis. Comme les années précédentes, la mortalité sera évaluée par maintien à effectif constant de 3 poches ostréicoles. Seules 3 des 6 stations seront suivies régulièrement (mensuel à bi-mensuel en période estivale). En cas d'apparition d'une mortalité anormale (supérieure à 0,1 %.J⁻¹) sur l'une des 3 stations pilotes, l'ensemble du réseau fera alors l'objet d'un suivi.

Les paramètres biométriques (croissance, qualité) seront évalués selon une fréquence saisonnière (fin de printemps, fin d'été, fin d'automne).

Les paramètres environnementaux (climatologie, hydrologie) sont également suivis durant toute cette période en s'appuyant sur les données acquises par Météo-France ainsi que celles du Réseau Hydrologique Normand (RHLN de la DEL). Dans le prolongement des suivis réalisés par le LCN depuis 1996, les paramètres de température, salinité et oxygène feront l'objet d'une acquisition haute-fréquence (10 minutes) au moyen de sondes automatiques disposées sur la station n° 3 au cours de toute l'année.

Résultat attendu

Outre le suivi en "temps réel" de la dynamique spatio-temporelle des mortalités, ce travail vient compléter les 4 premières années d'acquisition permettant par là même une bonne appréhension de la variabilité inter-annuelle des mortalités pour ce bassin de production. L'ensemble de ces données ainsi que celles à caractère environnemental contribuent également à venir enrichir les connaissances plus générales des relations environnement-Mortalité (Cf. Tâche 2.2.1. précédente).

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Université de Caen : UMR PE2M (K. Costil)

Calendrier

Cette approche sera développée sur l'ensemble du cycle d'élevage, du mois de mars 2004 à mars 2005. L'effort d'échantillonnages sera concentré autour de la période d'expression de la mortalité (traditionnellement entre les mois de juillet et d'octobre)

Références

Dubois B. et M. Roper (2002). Contribution à l'étude des mortalités de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), en baie des Veys : Programme SUMO : dynamique des mortalités en relation avec la reproduction. Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 nov 2001.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP2Sumo.pdf

Kopp J. et M. Roper (1999) Mortalités récentes en baie des Veys : observations et suggestions. Ifremer DRV/RA/LCN. 12 p.

Roper M. (2002). Note d'information Morest : Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en Baie des Veys Ifremer DRV/RA/LCN. 2 p.

Roper M. et K. Costil (2001). Bilan des mortalités ostréicoles en baie des Veys (baie de Seine Occidentale) entre 2000 et 2001 : résultats provisoires acquis dans le cadre de l'étude baie des Veys 2000. Séminaire Morest 2001, NANTES, 21-23 nov 2001.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP6dynam3part1.PDF.pdf

Roper M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au défi Morest en 2002. Ifremer. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Sous-tâche 2.2.9 - Effet sédiment, interaction avec les mortalités (DYNABDV)

Présentation

Ce projet résulte directement de deux résultats obtenus dans Morest au cours des années précédentes. D'une part, sur le site atelier de Marennes-Oléron, l'hypothèse de l'existence d'un "stress environnemental aigu" est associée à la brutalité du signal de mortalité observé sur des élevages réalisés à 15 cm du sol. Parmi les explications possibles, la piste d'une toxicité d'origine chimique du sédiment associée à un changement qualitatif de régime alimentaire (phytoplancton – phytobenthos) semblent les plus pertinentes. (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b). D'autre part, en baie des Veys, la réactualisation de la cartographie sédimentaire de la zone conchylicole a permis de faire ressortir une forte tendance à l'envasement sur le secteur de Géfosse, le plus sensible du bassin en terme d'expression de la mortalité (Sylvand *et al.*, 2003).

En 2004, il est proposé de tester, sur le secteur de Géfosse en baie des Veys, l'éventuelle existence d'un "stress environnemental aigu" de même nature qu'en Charente-Maritime à travers le suivi de cheptels placés à 15 cm du sédiment comparés à un témoin situé à plus de 50 cm (pratique culturale normale pour ce secteur)

Matériel et méthode

Afin d'éviter de multiplier les suivis et les cheptels, cette approche sera développée en parallèle à la Tâche 2.1.5 présentée précédemment (Maintien des performances "R" et "S" au cours du second été) qui servira de témoin. Les mêmes cheptels seront doublés pour être disposés sur une table ostréicole basse (15 cm du sédiment). Un simple bilan final sera réalisé en fin de période à risque (a priori fin octobre)

Au cours de l'année, les paramètres environnementaux (climatologiques et hydrologiques) seront suivis (tâche 2.2.5). La toxicité du sédiment sera évaluée à travers la technique des tests de survie larvaire (DEL-PC). Dans le cadre de l'hypothèse d'un stress aigu d'origine sédimentaire lié à des re-largage toxique (H₂S et NH₄⁺) une première approche de la chimie du sédiment sera tentée en synergie sur les 3 sites ateliers (LERN - LER/PC – LCB - DEL/PC).

D'autre part les données acquises dans le cadre du RHLN¹ (Chlorophylle "a", NH4+) dans la colonne d'eau pourront également être exploitées.

Résultat attendu

Il s'agit de vérifier si l'hypothèse de l'existence d'un stress environnemental aigu, développée dans le cadre du "Modèle de mortalité de Charente", peut être transposé sur un autre écosystème tel que celui de la baie des Veys.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Toxicité du sédiment : DEL-PC (F. Quiniou)
- Chimie du sédiment : DEL-PC (J. Knoery)

Calendrier

Cette approche sera développée selon le même calendrier que celui de la tâche 2.1.5 (mars à octobre 2004).

Références

Soletchnik P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMIQUE des MORTALITÉS estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP2_Dynamorconcl.pdf

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi Morest en 2002. Ifremer DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

Sylvand B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Ropert (2003). Nouvelle cartographie sédimentaire de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en baie des Veys (baie de Seine occidentale, Manche orientale). GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 14 p.

WP 4 - Tests expérimentaux et/ou in situ pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.3 - Réduction des mortalités d'adultes

Sous-tâche 4.3.3 - Réduire les mortalités d'adultes : Transferts entre la baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin

Présentation

Dans le cadre des "tests expérimentaux et/ou in-situ pour s'affranchir des mortalités" le LCN et le SMEL ont initié depuis 2002 différentes actions. Sur la base de l'hypothèse d'une synergie entre la ressource trophique, l'effort de reproduction et l'ampleur des mortalités, il a été proposé, depuis 2002, d'écarter de la baie des Veys des cheptels identifiés "à risque" pendant la période de forte disponibilité trophique (avril-juin) en les plaçant temporairement sur un site moins riche (St Germain sur Ay, Côte Ouest Cotentin). Les résultats sont apparus très pertinents en terme de mortalité (réduction de la mortalité de 90 % par rapport à un témoin maintenu en baie des Veys) (Ropert *et al.*, 2003) Ils ont également permis de mettre en évidence l'existence d'une période à risque antérieur à celle d'expression de la mortalité, venant corroborer les observations réalisées à Marennes-Oléron dans le cadre de DYNAMOR (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b). En outre, au cours

¹ Réseau Hydrologique Normand (DEL-LERIN)

de l'été 2003, l'expérimentation a été renouvelée dans le but d'évaluer l'impact de ces transferts en terme de croissance et de qualité. Les résultats, contre toute attente, ont pu mettre en évidence le caractère positif de ces transferts en terme de rendement biologique d'élevage (10 à 30 % de gain de poids de poche) et l'absence d'effet négatif en terme de croissance individuelle si les huîtres sont replacées en baie des Veys avant le mois d'août (Ropert & Blin, 2003)

Lors du séminaire Morest de novembre 2003, la profession a fait part de son intérêt pour ce travail en suggérant plusieurs possibilités d'application à grande échelle (segmentation des phases d'élevage, permutation temporaire de cheptels entre professionnels). Toutefois, le caractère exceptionnel des conditions climatiques de l'été 2003 (canicule) n'autorise pas un transfert immédiat à l'échelle professionnelle de ces pratiques. C'est pourquoi il est proposé, en 2004, de poursuivre les tests dans ce domaine.

Matériel et méthode

Il est prévu en 2004 de focaliser sur une permutation de cheptel entre les deux sites expérimentaux de la baie des Veys et de la côte Ouest Cotentin. Cette permutation sera initiée dès le début du bloom de phytoplancton en baie des Veys (mars-avril). Les huîtres seront alors transférées sur la Côte Ouest pendant que celles de Côte Ouest seront placées en baie des Veys. A partir de la mi-juillet (fin de la période à risque en 2002 et 2003), les retours respectifs des deux cheptels sur leur site d'élevage initiaux pourront être envisagés. Un bilan final (mortalité/croissance/rendement) sera effectué à la fin du mois d'octobre, après que la mortalité se sera exprimée en baie des Veys.

Pendant toute la durée du transfert, un suivi bimensuel d'un indice de condition (Walne et Mann) sera réalisé pour évaluer qualitativement les dynamiques de reproduction respectives sur les deux sites de transfert.

Les données environnementales (climatologie et hydrologie) feront l'objet d'une acquisition dans le cadre des tâches déjà présentées en baie des Veys. La température (déterminante dans les processus de dynamique de reproduction) fera l'objet d'un suivi haute fréquence sur le site de côte ouest.

Résultat attendu

Le premier résultat attendu va dans le sens d'une confirmation des résultats déjà observés les années précédentes : réduction significative des mortalités et absence d'impact négatif pour les huîtres issues de la baie des Veys. En outre, dans le cadre de la permutation, l'attention sera plus particulièrement portée sur l'impact envisageable sur les cheptels permutés de la côte ouest (mortalité/croissance).

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Syndicat Mixte d'Équipement du Littoral (SMEL) : J.L. Blin

Calendrier

Les dates de transfert et de suivis seront déterminées avec précision en relation avec les paramètres environnementaux (température, bloom phyto) et biologiques (indice de Walne et Mann).

Références

Soletchnik P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMIQUE des MORTALITÉS estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP2_Dynamorconcl.pdf

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

Ropert, M. et J.L. Blin (2003). Transferts de cheptels entre la Baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin Tâche 4.4.1 "réduire l'intensité de la reproduction pendant la phase critique" du WP4. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP4_transferts.PDF

Ropert M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003) Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au défi Morest en 2002. Ifremer DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Tâche 4.5 - Veille et alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques

Présentation

Les travaux et suivis de terrain des 3 dernières années (Soletchnik, 2001 ; Mazurié, 2001 ; Soletchnik P. & M. Ropert, 2002; Ropert M. *et al.*, 2003; Soletchnik P. *et al.*, 2003b Misko, 2003; Misko *et al.*, 2003) mettent en évidence le caractère déterminant de la dynamique thermique et des débits et flux des intrants dans les processus de mortalités estivales.

Dans cet esprit, et sur la base des données accumulées depuis 6 ans en Normandie, une réflexion doit être menée sur la possibilité de mettre en place un système de veille et d'alerte intégrant ces paramètres.

Matériel et méthode

S'assurer d'une mise à jour régulière et rapide des données hydrologiques acquises sur le terrain et de celles, climatologiques, acquises auprès de Météo-France.

Il est proposé par le LERN de se charger de la diffusion de ces informations, au moins pour les données de température en continu.

Résultat attendu

Contrôle et suivi de la température simultanément sur les 3 sites ateliers de Morest.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer DEL/DRV/RA/LER/PC (P. Geairon)
- Ifremer DRV/RA/LCB (J.F. Bouget)

Calendrier

Tout au long de l'année

Références

Mazurié J. - Caractérisation des mortalités estivales d'huîtres Creuses en vue de l'élaboration d'un programme national d'étude. ANNEXE 1 . 44pp (+ fiches)

Misko P. (2003). Etude des apports terrihènes en baie des Veys (Volet environnement de Morest) Institut Universitaire Européen de la Mer / Ifremer-DEL-SRB. R.INT.DEL/SR/03.10/Brest. 78 p.

Misko P., C. Bacher, J.F. Samain et M. Ropert (2003). Lien entre les apports des bassins versants en Baie des Veys et les mortalités estivales survenues entre 1993 et 2002. Tâche 6.1.2. et 6.3.3. du WP6 : Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP6_Misko.pdf

Ropert M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. Ifremer DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Soletchnik P. (2001). Impact of the climatic change on an estuarian ecosystem : the Marennes Oléron Bay. French IGBP-WCRP news letter, 12, 37-41.

Soletchnik P. (2001) Évolution à moyen terme d'un écosystème Estuarien : Le Bassin de Marennes - Oléron. Séminaire Morest 2001, Nantes, 21-23 Novembre 2001.

Soletchnik P. et M. Ropert (2002). Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charentes-Maritimes) de 1997 à 2002. Séminaire Morest 2002, BREST, 13-15 nov 2001.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP6_Babela.pdf

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

WP6 - Caractérisation de l'environnement

Tâche 6.2 - Acquisition de données

Sous-tâche 6.2.5. - Première approche de la production de Biodépôts en baie des Veys

Présentation

Dans le cadre des inter relations Environnement/Mortalités, les travaux réalisés dans le bassin de Marennes-Oléron mettent en évidence une source potentielle de stress environnemental aigu pouvant avoir comme origine le compartiment sédimentaire (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b). D'autre part, de nombreuses questions se posent quant au rôle joué par la matière organique particulaire dans l'équilibre de l'écosystème. Parmi les sources identifiables de cette matière organique (apports terrigènes, production primaire et secondaire...etc) la biomasse conchylicole constitue un maillon qu'il est difficile d'ignorer. En effet de par ses activités de filtration et d'assimilation puis d'excrétion, les biomasses conchylicoles vont contribuer à transformer cette matière organique particulaire dont une partie non négligeable va constituer les biodépôts (fécès et pseudo-fécès). Les travaux de Sornin (1981) ont démontré que la présence d'élevages conchylicoles contribuait de manière significative à l'enrichissement du compartiment sédimentaire en matière organique particulaire en accélérant sa sédimentation (biodépôts).

Jusqu'à présent aucune étude particulière ne s'est intéressée à cette problématique en baie des Veys. Or l'extrapolation des résultats existants (Sornin, 1981; Sornin *et al.*, 1983; Sornin, 1984; Razet *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1991) à un écosystème conchylicole tel que celui de la baie des Veys permet de supposer que cette production représente plusieurs tonnes par jour (Ropert, 1999).

La démarche proposée en 2004 consiste en une première approche de cette problématique à travers des essais de mesures in-situ de la production de biodépôts par les huîtres. Il s'agit pour cette année d'une démarche purement expérimentale et technique visant à évaluer la faisabilité de mise en place d'un suivi plus approfondi par la suite. Ce travail exploratoire s'inscrit dans un projet à plus long terme visant à permettre d'intégrer l'ensemble des compartiments de l'écosystème dans une démarche de modélisation (Tâche 6.3)

Matériel et méthode

Cette année l'accent sera porté sur le développement et la viabilisation d'un système de collecteur à biodépôts. L'objectif est de permettre de disposer d'un système peu encombrant et de manipulation aisée sur le terrain. Il doit également se montrer résistant aux contraintes environnementales (houle, fouling...etc). Le principe reposera sur la fabrication de 2 collecteurs destinés à être placés sous deux poches ostréicoles indépendantes. Un lot d'huîtres (50 à 100 individus) sera disposé dans une seule des 2 poches, l'autre étant destinée à servir de témoin de sédimentation. Le matériel sera disposé sur le terrain pour des périodes de 24 heures. Par différence entre les particules récoltées dans les deux systèmes, il sera possible d'appréhender la fraction issue des biodépôts.

Ces biodépôts seront analysés en terme de biomasse (poids secs) et la fraction de matière organique sera évaluée par perte au feu.

En fonction de la disponibilité du GEMEL, des pièges à sédiments pourront être disposés sous les tables à huîtres afin d'essayer de quantifier la fraction de ces biodépôts susceptible d'être piégée au niveau sédimentaire.

Résultat attendu

L'objectif est d'essayer de développer un outil efficace destiné ensuite à permettre d'appréhender la variabilité spatiale et temporelle de la production de biodépôts par les biomasses conchyliques en élevage.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- GEMEL (B.Sylvand)

Calendrier

Le calendrier n'est pas fixé. Des essais *in situ* seront effectués dès que le matériel sera prêt à être testé.

Références

Soletchnik P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMique des MORTalités estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP2_Dynamorconcl.pdf

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi Morest en 2002. IFREMER. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

Martin J.L. M., J. M. Sornin et M. Marchand (1991). The significance of oyster biodeposition in concentrating organic matter and contaminants in the sediment. *E.A.S N° Spec.*: 207.

Razet D., M. Héral, J. Prou, J. Legrand et J. M. Sornin (1990). Variations des productions de biodépôts (fèces et pseudofèces) de l'huître *Crassostrea gigas* dans un estuaire macrotidal : baie de Marennes-Oléron. *Halictis* 20: 143-161.

Roport M. (1999). Caractérisation et déterminisme du développement d'une population de l'annélide tubicole *Lanice conchilega* (Pallas, 1766) (Polychète Térébellidé) associé à la conchyliculture en baie des Veys (baie de Seine Occidentale). Thèse de 3ème Cycle. Muséum National d'Histoire Naturelle, Environnement Marin; 172 p.

Sornin J. M. (1981). Processus sédimentaires et biodéposition liés à différents modes de conchyliculture. baie de Cancale, Anse de l'Aiguillon et bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doct. 3^{ème} cycle. Univ. de Nantes, Sédimentologie marine; 188 p.

Sornin, J. M. (1984). Role et conséquence de la biodéposition à l'interface eau/sédiment. *J. Rech. Océanogr.* 9 (1): 38-40.

Sous-tâche 6.2.6 - Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en baie des Veys : Biocénoses associées et tendances évolutives

Présentation

Dans le cadre de la problématique de la relation Sédiment/Mortalité (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b) l'année 2003 a été l'occasion de réaliser un nouveau bilan sédimentaire en baie des Veys (Sylvand *et al.*, 2003). Lors des campagnes d'échantillonnage associées à ce travail, un échantillonnage du macrozoobenthos a également été réalisé. Faute de temps l'ensemble de ces prélèvements n'ont pu qu'être fixé.

L'année 2004 sera l'occasion de traiter et d'analyser ces échantillons.

Résultat attendu

Les espèces seront inventoriées et les individus dénombrés. Les résultats, comparés à ceux obtenus précédemment, donneront un nouvel état des lieux en fonction de la signification environnementale des espèces rencontrées, de leur abondance et de leur variation d'effectifs dans le temps (espèces estuariennes, marines de milieu abrité ou battu, opportunistes, inféodées à la matière organique, etc...).

La superposition de ces résultats avec ceux obtenus en sédimentologie (granulométrie, teneur en fines, C5) donneront des indications environnementales complémentaires.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- GEMEL (B. Sylvand)

Calendrier

1^{er} semestre 2004.

Références

Soletchnik P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMique des MORtalités estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle

http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP2_Dynamorconcl.pdf

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

Sylvand B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Ropert (2003). Nouvelle cartographie sédimentaire de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en baie des Veys (baie de Seine occidentale, Manche orientale). GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 14 p.

Sous-tâche 6.2.7 - Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en baie des Veys : Bilan topographique et tendances évolutives

Présentation

La connaissance de l'évolution des fonds sédimentaires sur lesquels reposent les parcs conchylicoles de la baie des Veys est un élément essentiel pour la compréhension du fonctionnement de l'écosystème en relation avec la production (Ropert, 1999, Sylvand 2003a, 2003b). Depuis 1995, les contraintes liées aux processus d'exhaussement des fonds (ensablement) font l'objet d'un suivi inter-annuel par le laboratoire Ifremer de Port-en-Bessin (GRESARC, 1995, 1998, 2000).

Matériel et Méthode

Ce travail, repose sur le développement d'un modèle numérique de terrain (MNT) à maille fine (~15 m) issu d'un semis d'environ 4 000 points cotés sur une superficie d'environ 300 ha. L'acquisition des données de terrain est réalisée au moyen d'un D.G.P.S. RS4400 de marque Trimble. Les mesures sont réalisées dans le système de référence Lambert-IGN 69 grâce à une polygonale implantée au DGPS. La précision des coordonnées dans le système de référence absolu utilisé est de l'ordre du centimètre tant en altimétrie qu'en planimétrie (GRESARC, 2000).

Résultat attendu

Outre l'intérêt de ce travail dans le cadre de l'amélioration des connaissances environnementales et de leur utilisation au quotidien sur le terrain (orientation, identification...etc) (Ropert, 2003), il permettra de disposer d'une bathymétrie fine exploitable dans le cadre de la Tâche 6.3 (Modélisation). De plus, confronté aux levés topographiques déjà réalisés par le passé, il permettra d'évaluer les dernières tendances évolutives en terme de bilan sédimentaire (érosion/accrétion) au cours de ces dernières années. Enfin, ce travail pourra être mis en relation avec la cartographie sédimentaire réalisée en 2003 dans le cadre de Morest afin d'expliquer les particularités observées sur le plan de la nature des fonds (envasement).

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Groupe de Recherche sur les Environnements Sédimentaires Aménagés et le Risques Côtiers (GRESARC)

Calendrier

1^{er} semestre 2004.

Références

GRESARC (1995). Topographie des zones conchylicoles de Grandcamp-Maisy. GRESARC / Ifremer 8 p.

GRESARC (1998) Mise en place de repères et suivi topographique de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy. GRESARC / Ifremer 3 p.

GRESARC (2000) Suivi topographie de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy GRESARC / Ifremer 14 p.

Roport M. (1999) Caractérisation et déterminisme du développement d'une population de l'annélide tubicole *Lanice conchilega* (Pallas, 1766) (Polychète Térébellidé) associé à la conchyliculture en baie des Veys (baie de Seine Occidentale). Thèse de 3ème Cycle. Muséum National d'Histoire Naturelle, Environnement Marin; 172 p.

Roport M. (2003) Les caractéristiques conchylicoles dans le contexte de la dynamique évolutive de la baie des Veys. Comité Scientifique du Parc Naturel Régional des Marais du Cotentin., 18 février 2003. Les Veys.

Sylvand B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Roport (2003a). baie des Veys : Dynamique sédimentaire associée à la conchyliculture. Tache 6.2.4. du WP4 : Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

Sylvand B., C. MARion, A. Lecouturier et M. Roport (2003b). Nouvelle cartographie sédimentaire de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en baie des Veys (baie de Seine occidentale, Manche orientale). GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 14 p.

Tâche 6.3 - Modélisation

Sous-tâche 6.3.1 - Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle

Présentation

Cette tâche s'inscrit dans la suite du travail développé autour de la question des apports d'eau douce en baie des Veys en 2003 (Misko, 2003; Misko *et al.*, 2003). Son objectif, en s'appuyant le code de calcul Mars-2D et de permettre la simulation du devenir des apports des bassins versants en baie des Veys (Denis & Lagadeuc, 2002), et leur impact potentiel pour la conchyliculture, à travers différents scénarii définis en fonction de la variabilité temporelle à différentes échelles. Ce travail sera réalisé dans le cadre d'un stage de DEA coencadré par DEL-EC (C. Bacher) et LER/N (P. Riou).

Préalablement à la mise en œuvre de simulations de scénarii, le modèle sera confronté aux données déjà acquises par le laboratoire Ifremer de Port en Bessin (mesures de courant, mesures en continu de salinité et température en zone littorale et à l'embouchure des rivières) à des fins de validation du code 2D. Les temps de résidence seront ensuite évalués et une analyse de variabilité des paramètres environnementaux réalisée.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche
- DEL-EC (C. Bacher)

Calendrier

Mars à septembre 2004

Références

Daniel A., R. Le Goff, (2002) Evaluation de l'état d'eutrophisation des eaux côtières et estuariennes de Basse-Normandie. Rapport Ifremer RST.DEL/02.02/PB, 72 pp.

Denis V. et Y. Lagadeuc (2002) Suivi de la qualité des eaux de la baie des Veys. Inventaire et analyse des données hydrologiques de la Baie des Veys et de son bassin versant. Partie 1 : Données marines. Partie 2 : Données " rivières " uniquement. université de Caen - LBBM. Rapport Laboratoire Biologie Biotechnologie Marines pour l'Agence de l'eau Seine-Normandie et le Minist. Aménagt. Territ. Environ. (MATE). 60 p.

Misko P. (2003) Etude des apports terrihènes en baie des Veys (Volet environnement de Morest) Institut Universitaire Européen de la Mer / Ifremer-DEL-SRB. R.INT.DEL/SR/03.10/Brest. 78 p.

WP7 - Gestion de données, information et communication

Tâche 7.1. - Gestion de données

Présentation

La contribution du LERN a cette tâche s'intègre dans un objectif à large échelle de conception, réalisation et administration d'un outil en réseau de gestion de données en vue de standardiser la saisie des données communes à plusieurs équipes et de faciliter l'extraction de ces données. Cette tâche représente une étape d'un projet plus général de "Système d'Information Aquacole" ou SIA, Morest offrant l'opportunité d'aborder la question de façon concrète. Ces données communes concernent l'ensemble des données obtenues sur les lots mis en tests sur les différents sites ateliers : données de croissance et survie des lots et mesures physiologiques.

L'année 2004 doit permettre le test en direct des deux outils, base de données et module de saisie, lors des essais terrains. Les données des essais Morest précédents, actuellement sous Excel, doivent en partie être intégrées dans la base.

Résultats attendus

- Un système de gestion cohérent et pratique
- Une sauvegarde d'une grande partie des données Morest
- Des outils d'extractions (requêtes Access)

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- TMSI/ISI (J.C. Masson)
- TMSI/RIC (G. Checinski)
- LCB (A.G. Martin, P.G. Fleury, H. Palvadeau)
- LER/PC (P. Soletchnik)
- LCPL (H. Palvadeau)

Calendrier

A partir de Mars 2004

Références

Site Internet Remora : <http://ifremer.fr/remora>

Cahier des charges SIA - A.G. Martin, J.C. Masson - document interne 21/07/03

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|--|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur 3 sites ateliers de Morest</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi dynamique spatio-temporelle des mortalités en BDV</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV Effet sédiment, interaction avec les mortalités</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tetraploïdes R et S.....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Ecloserie/ Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nurserie :</i> | 4.2.4 | |
| <i>- Nurserie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| <i>- Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| <i>- Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en Baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | | |
| <i>- Transferts entre la Baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin</i> | 4.3.3 | |
| <i>- BDV Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrans des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |

| | | |
|--|-------|--|
| Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques | 4.5 | |
| WP6. Caractérisation de l'environnement | | |
| Recensement de données physiologies associées à différents sites | | |
| Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites | 6.1 | |
| <i>Estimation des débits et des flux des bassins versants :..... (voir 2.2.1) 2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i> | | |
| <i>Complément débits, MO et pesticides particulières issus des bassins Versants en BDV</i> | 6.1.1 | |
| Acquisition de données | 6.2 | |
| <i>Herbicides sédiment oulet particulaire comparatif eau</i> | 6.2.1 | |
| <i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i> | 6.2.2 | |
| <i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?, (Phytolphytobenthos)</i> | 6.2.3 | |
| <i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i> | 6.2.4 | |
| <i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i> | | |
| <i>Première approche de la production des Biodépôts en BDV</i> | 6.2.5 | |
| <i>Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en BDV : Biocénoses associées et tendances évolutives</i> | 6.2.6 | |
| <i>Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en BDV : bilan topographique et tendances évolutives</i> | 6.2.7 | |
| | | |
| Modélisation | 6.3 | |
| <i>Simulation du devenir des apports des bassins versants en baie des Veys : impact potentiel pour la conchyliculture</i> | 6.3.1 | |
| <i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.2 | |
| <i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i> | 6.3.3 | |
| WP7. Gestion de données, information et communication | | |
| Gestion des données | 7.1 | |
| Information, communication et partage | 7.2 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2.1.5 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| 2.2.1. | | | | | | | | | | | | |
| 2.2.5. | 2003 | 2003 | | | | | | | | | | |
| 2.2.9. | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | |
| 4.4.3. | | | | | | | | | | | | |
| 4.5. | | | | | | | | | | | | |
| WP 5 | | | | | | | | | | | | |
| WP 6 | | | | | | | | | | | | |
| 6.2.5. | | | | | | | | | | | | |
| 6.2.6. | | | | | | | | | | | | |
| 6.2.7. | | | | | | | | | | | | |
| 6.3.1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 7 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Année 2001

Communications pour colloque ou groupe de travail

Ropert M. (2001). Suivi à moyen terme des conditions environnementales en baie des Veys (baie de Seine Occidentale) : Suivi hydrologique en continu durant l'été 2001 dans le cadre de Morest. *Présentation orale aux journées Morest*, Nantes, 21-23 Novembre 01.

Ropert M. et K. Costil (2001). Bilan des mortalités ostréicoles en baie des Veys (*baie de Seine Occidentale*) entre 2000 et 2001 : résultats provisoires acquis dans le cadre de l'étude baie des Veys 2000. *Présentation orale aux journées Morest*, Nantes, 21-23 Novembre 01.

Notes à DPMCM, régions, groupes de réflexion IFREMER ou autres

LCN (13 juillet 2001) – baie des Veys : mortalités anormales d'avril 2001. Note Interne Morest/REPAMO. 3 p.

LCN (10 août 2001) – Alerte aux mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note Interne Morest/REPAMO. 3 p.

LCN (21 août 2001) – Mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note d'information aux Affaires Maritimes (RA/PB 01-031). 3 p.

LCN (05 septembre 2001) – Mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note d'information aux Affaires Maritimes (RA/PB 01-033). 3 p.

LCN (19 septembre 2001) – Mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note d'information aux Affaires Maritimes (RA/PB 01-036). 3 p.

LCN (05 octobre 2001) – Mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note d'information aux Affaires Maritimes (RA/PB 01-037). 3 p.

LCN (22 octobre 2001) – Mortalités ostréicoles en baie des Veys. Note d'information aux Affaires Maritimes (RA/PB 01-042). 3 p.

Année 2002

Colloques internationaux, Abstracts publiés et proceedings.

Degrémont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal and J.F. Samain (2002). Genetic basis of survival in juvenil cupped oysters (*Crassostrea gigas*). 7th World congress on genetics applied to livestock production, Montpellier, France, August 19-23

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Degrémont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet and J.F. Samain (2002). Relationship between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. 94nd Annual Meeting of National Shellfisheries Association, Mystic, Connecticut, USA, April 14-18. J. Shellfish Res.19(1).p. 616 (abstract)

Communications pour colloque ou groupe de travail

Degrémont L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, Lots consanguins. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

<http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-1selconsLD.pdf>

Degrémont L., Boudry P., Bedier E, Ropert M. et Soletchnik P. (2002). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, sélection divergente. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

<http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-1seldivLD.pdf>

Degrémont L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002). Caractérisation *in situ* des mortalités estivales. Bases génétiques : Seconde génération, (TOP-CARES) Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

<http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-1Topcares.pdf>

Dubois B. et M. Ropert (2002). Contribution à l'étude des mortalités de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), en baie des Veys : Programme SUMO : dynamique des mortalités en relation avec la reproduction. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP2Sumo.pdf

LCPC, LCN, LPI, LEMAR, IHP. (2002).BABE : comparaison des sites de Ronce et baie des Veys, incidence sur la reproduction et les mortalités. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02).

<http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-2Babe.pdf>

Ropert M. et J.L. Blin., (2002a). Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique : Transferts de lots entre Baie des Veys et côte Ouest. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP4LCN1ponte.pdf

Ropert M. et J.L. Blin., (2002b). Retarder la date d'implantation des huîtres en baie des Veys. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP4LCN3retard.pdf

Ropert M. et B. Sylvand (2002). Les caractéristiques conchylicoles dans le contexte de la dynamique évolutive de la baie des Veys.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02_WP6dynam3part1.PDF.pdf

Soletchnik P. et M. Ropert (2002). Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charentes-Maritimes) de 1997 à 2002. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP6_Babela.pdf

Soletchnik P., M. Ropert, E. Bedier, et J. Moal (2002). Synthèse des résultats 2002 de la tâche WP2-2 du programme Morest : Suivi interdisciplinaire de la dynamique des mortalités. Présentation orale au Séminaire Morest 2002, (Brest, 13-15 Novembre 02)

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/Restit_M02WP2_2.pdf

Notes à DPMCM, régions, groupes de réflexion Ifremer ou autres

LCN. (12/7/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (23/7/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (13/8/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (22/8/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (4/09/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (14/09/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (10/10/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN. (21/10/02) - **Note d'information Morest** : suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

Année 2003

Publications revues scientifiques ou technologiques avec comité de lecture

L. Lambert C. P. Soudant, L. Dégremont, G. Choquet, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, C. Paillard., P. Soletchnik, J. Jean-Pierre, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet et J.F. Samain (2004). Hemocyte parameters in families of *Crassostrea gigas* reared under different environmental conditions and selected for differential survival During summer. *J. Exp. Biol. (Soumis)*.

Colloques internationaux, Abstracts publiés et proceedings

Dégremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bédier, A. Huvet, J. Moal et J.F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oyster. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Dégremont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, P. Boudry (2002). Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters *Crassostrea gigas*. Proceedings of the World. Congress on genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23, pp. 481-484.

Delaporte M., J. Moal, P. Soudant, C. Lambert, S. Pouvreau, M. Enriquez Diaz, L. Dégremont, P. Soletchnik, B. Gagnaire et M. Ropert (2003). Effect of environmental and nutritive conditions on defence mechanisms of oysters during an annual cycle. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Fleury P.G., E. Le Ber, F. Cornette, S. Claude, H. Palvadeau, S. Robert, M. Ropert, C. Simonne, F. D'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli P. Guilpain (2003). Comparison of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing results (survival, growth, quality) in French farming areas, after a 10-years monitoring (1993-2002) by the Ifremer/Remora network. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnière, et al. (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Samain J.F., P. Boudry, J. Moal, A. Huvet, C. Lambert, J.L. Nicolas, T. Burgeot, S. Pouvreau, J.L. Martin, M. Ropert, M. Mathieu, E. Bédier, P. Soletchnik et A.G. Martin (2003). Introduction to The Morest project (Mortalités estivales), an integrated approach to understand *Crassostrea gigas* oyster summer mortality in France. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Dégremont, E. Bédier, J.F. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, et al. (2003). Characterisation of Summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. 95th annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003. New Orleans, Louisiana, USA. (abstract)

Communication interne et extérieure limitée (rapport interne)

Ropert M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003) Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Communications pour colloque ou groupe de travail

Bedier E., J. Moal, M. Ropert, K. Costil, C. Lambert et P.G. Fleury (2003) BERAY : Comparaison des souches "R" et "S" dans deux écosystèmes et pour deux classes d'âge. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03WP2_beray.pdf

Ropert M., P. Soletchnik, E. Bedier et P.G. Fleury (2003). Bilan synthétique des mortalités estivales de "référence" survenues sur les 3 sites ateliers de Morest en 2003. Introduction du WP2 : caractérisation des mortalités *in situ*. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

Misko P. et M. Ropert (2003). Lien entre les apports des bassins versants en baie des Veys et les mortalités estivales survenues entre 1993 et 2002. Tâche 6.1.2. et 6.3.3. du WP6 : Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP6_Misko.pdf

Ropert M. et J.L. Blin (2003). Transferts de cheptels entre la baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin Tâche 4.4.1 "réduire l'intensité de la reproduction pendant la phase critique" du WP4. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP4_transferts.PDF

Sylvand B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Ropert (2003). baie des Veys : Dynamique sédimentaire associée à la conchyliculture. Tache 6.2.4. du WP4 : Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP6_BDV.PDF

Notes à DPMCM, régions, groupes de réflexion Ifremer ou autres

LCN, Note d'information Morest du 17 juillet 2003: Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN, Note d'information Morest du 30 juillet 2003 : Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN, Note d'information Morest du 28 aout 2003 : Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN, Note d'information Morest du 09 septembre 2003: Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN, Note d'information Morest du 29 septembre 2003: Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

LCN, Note d'information Morest du 08 octobre 2003: Suivi de la dynamique spatiale et temporelle des mortalités en baie des Veys (2 p.)

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-------------------|----------------|---------------------|
| Michel Ropert | C | 8 |
| Philippe Riou | C | 1 |
| Eric Le Gagneur | TA | 4 |
| Charlotte Simonne | TA | 3 |
| CDD (?) | TA (CDD) | 9 |

Ifremer - DRV/RA/LCB - La Trinité-sur-Mer

Adresse : Ifremer - Station
Laboratoire Conchylicole de Bretagne
12 rue des Résistants
56470 La Trinité sur Mer

Responsable : Édouard Bédier

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

1. **Tâche 1.7** Bilan des indices de stress (CESAM)
2. **Tâche 2.2.1.** Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur les 3 sites ateliers de MOREST (NIRVANA).
3. **Tâche 2.2.2.** Traitement des données de la tâche BERAY03
4. **Tâche 2.2.6.** Étude intra site de la dynamique des mortalités en baie de Quiberon (FORMER04)
5. **Tâche 2.2.7.** Suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogène-sédiment: application au naissain (DYNAMAMAURAY)
6. **Tâche 2.2.11.** Étude de la différenciation liée aux périodes de captage naturel (CANARD)
7. **Tâche 3.2.1** Participation à GIGAREPRO04 (indices de vitalité)
8. **Tâche 4.2.2.** Prévention des pertes en 1^{ère} année par réduction des ressources trophiques (RETRO)
9. **Tâche 4.2.3.** Prévention des pertes en 1^{ère} année par augmentation de la densité (CHAPO)
10. **Tâche 4.5.** Veille et alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques
11. **Tâche 7.1** Gestion des données du projet MOREST
12. **Tâche 7.2** Information et communication du projet MOREST

1 -Descriptif de l'activité

Introduction

Le Laboratoire Conchylicole de Bretagne gère l'un des sites ateliers du programme Morest. Ce site s'avère l'un des plus significatifs en terme d'intensité de mortalités sur le naissain de 1^{ère} année. A la suite des actions menées en rivièrre d'Auray en 2002, et qui avait permis, de mettre en évidence des stratégies de reproduction différentes selon les lots "R" et "S" en 2^{ème} année, le LCB a poursuivi en 2003 sur le site de Fort Espagnol un certain nombre d'actions relevant d'une implication dans les différents WP :

- mise au point d'outils de test physiologique par la mesure de la force musculaire d'adduction valvaire (WP1);
- suivi des familles G2 en deuxième année, en connexion avec le site de la baie des Veys (BERAY, WP2, Sous-Tâche 2.2.1);
- caractérisation des mortalités estivales des familles G3SD (WP2, Sous-Tâche 2.1.2);

- démarrage d'une action en eau profonde en baie de Quiberon prenant en compte la spécificité des pratiques culturelles régionales dans la problématique Morest (FORMER, WP2, Sous-Tâche 2.2.2 en collaboration avec DEL/PC);
- influence de la réduction de l'effort de reproduction pendant la phase critique par le temps d'exondation (WP4, Tâche 4.2);
- analyse des paramètres environnementaux en collaboration avec DEL/MPL (WP6)
- adaptation du système de gestion des données Morest et mise en place du site Extranet Morest ainsi que son alimentation régulière avec les résultats des participants au programme (WP7).

Ces différentes implications seront poursuivies en 2004, de manière à terminer l'acquisition et l'exploitation des données de certaines tâches démarrées en 2003, de permettre l'application au naissain de 1^{ère} année d'hypothèses de mortalité établies sur des animaux de 18 mois ou de proposer des sorties de crises élaborées sur la base des différents modèles proposés.

Le laboratoire participera également à des analyses de synthèse concernant aussi bien les outils (indicateurs de stress) que les caractérisations des mortalités sur la base de données existantes. La gestion des données Morest, ainsi que la communication continueront à être coordonnées à partir du Laboratoire Conchylicole de Bretagne.

WP 1 - Mise au point d'outils

Tâche 1.7 - Bilan des indices de stress CESAM

Responsable : Pierre-Gildas Fleury - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

Un certain nombre d'indices (herméticité, force musculaire,...) ont été utilisés pour quantifier par un test simple la résistance d'une huître ou d'un coquillage à un stress, physiologique ou environnemental. Ces indices (ou ces tests) utilisent les diverses fonctions vitales des mollusques pour caractériser les mécanismes des mortalités, des baisses de performances ou les facultés de récupération.

Une synthèse des expérimentations utilisant ces outils, et un catalogue répertoriant leurs avantages et inconvénients ainsi que leurs champs d'application seront réalisés en 2004.

Résultat attendu

Possibilité de description d'état d'affaiblissement des animaux en l'absence de mortalité, donc possibilité de caractérisation précoce non plus des états mais des aptitudes des animaux à la survie estivale.

Offrir aux utilisateurs un panel d'indices et d'indicateurs fonctionnels permettant de quantifier de manière simple la résistance d'un mollusque.

Matériel et méthode

Élaboration par le coordinateur de la tâche d'un projet de fiche-type par indice ou type d'indices, et concertation avec les différents acteurs (intervenants Morest, collaboration avec lev Mapa)

Rédaction des diverses fiches (une par indice ou par type d'indices) et compilation dans un catalogue.

Références bibliographiques

Fleury P.G. et J. Mazurié (2003). Vitalité, stress et risque de mortalité : comment les définir et comment les mesurer chez les mollusques bivalves ? Atelier de travail sur les indicateurs de stress des mollusques bivalves, Québec (Canada) 24-26 février 2003.

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnaire, A. Huvet and J.F. Samain. Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 339.

Mazurié J. (2001). Qualification des bivalves par épreuves létales et test d'herméticité : démarche, méthodologie et résultats 1995-2001. Rapport Ifremer DRV/RA/LCB, 46 p.

Myrand B., R. Tremblay et P.G. Fleury (2003). Peut-on caractériser (quantifier?) une bonne vitalité (inversement un stress?) chez les mollusques bivalves. Compte-Rendu sommaire de l'Atelier sur les indices de stress des bivalves. Québec (février 2003) Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LCB- La Trinité-sur-Mer - P.G. Fleury et J. Mazurié
- Ifremer - DRV/RA/UMR-PE2M - Plouzané - S. Pouvreau, G. Le Moullac, J. Moal, J.R. Le Coz, A. Huvet
- ifremer - DRV/RA/LCPL - Bouin - J. Haure
- ifremer - DEL/DRV/RA/LER-PC - La Tremblade - P. Soletchnik
- CREMA - L'Houmeau - M. Alunno-Bruscia
- UBO-LEMAR - Plouzané - C. Lambert

WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.1 - Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur les 3 sites ateliers de Morest. NIRVANA.

Responsables : J. Mazurié, E. Bédier - Laboratoire Cconchylicole de Bretagne

Résumé

Cette action de collaboration entre les laboratoire côtiers (LERN , LERPC et LCB) se décompose en 2 parties :

- relation entre mortalités et température sur les trois sites ateliers de Morest = "analyse : Nirvana"
- relation entre mortalités et apports d'eau douce sur les sites ateliers de Morest.

L'objectif de cette tâche est de préciser la relation entre mortalité et température sur les 3 sites ateliers de Morest au cours d'élevages effectués entre 2001 et 2003 sur les 3 sites. La même démarche est développée dans la cadre de la relation entre mortalité et apport d'eau douce; l'apport d'eau douce pouvant être approchée par les dessalures saisonnières, confortées par des informations météorologiques. (Soletchnik & Ropert, 2002).

Ces traitements et analyses sont dépendants d'une collaboration de travail de synthèse à effectuer à partir des bases de données de mortalité (*Crassostrea gigas*) et environnement dans différentes régions et bassins ostréicoles, au niveau des trois labos : LERN, LERPC et LCB.

| Actions de la WP2.2.1 impliquant le LCB | Bases de données | Acteurs | Réf action |
|---|--|-------------------------------|------------|
| Caractérisation des mortalités. Analyse des bases de données existantes | | | |
| Caractérisation de la mortalité selon les bassins ostréicoles en France (huîtres de 1an et 2 ans) (10 ans de données). | REMORA | P.G. Fleury, J. Mazurié & Co | BM-1 |
| Relation entre mortalité et environnement | | | |
| Relation entre la mortalité et les apports en eau douce sur les 3 sites ateliers de Morest depuis 10 ans (comparaison inter annuelle) | REMORA + bases météo et hydro | P. Soletchnik, M.Ropert & Co. | ME-1 |
| Relation entre la mortalité température et indice de croissance sur les 3 sites ateliers de Morest et au cours de quelques cycles d'élevage (analyse "fine"). | Morest, Croissance et profils thermiques | P. Soletchnik, M.Ropert & Co. | ME-2 |
| Influence de la pluie et de la température sur la croissance de <i>Crassostrea gigas</i> , selon les profils de bassins ostréicoles bretons | | J. Mazurié & Co | ME-3 |

Résultats attendus

Caractériser les mortalités estivales (BM1, BM2)

Préciser les relations mortalité, température et apport d'eau douce dans le cadre de la problématique Morest (ME1, ME2).

Préciser les comparaisons intersites (BM1, ME1, ME2).

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DEL/DRV/RA/LER-PC - La Tremblade - P. Soletchnik

- Ifremer - DEL/DRV/RA/LERN - Port-en-Bessin - M. Ropert

- Université de Caen - UMR/PE2M - K. Costil

Références bibliographiques

Soletchnik P. et M. Ropert (2002) Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charentes-Maritimes) de 1997 à 2002. Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 novembre 2001.

Sous-tâche 2.2.2. - BERAY03 - Traitement des données de la tâche

Responsable : E. Bédier - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

Il s'agit dans cette tâche de terminer le travail d'analyses (histologie quantitative, biochimie) des échantillons collectés en 2003 au cours de la tâche BERAY, et d'en effectuer la synthèse et l'interprétation.

Références bibliographiques

Bédier E., M. Ropert, A. Langlade, V. Hugonnet, J.F. Bouget, S. Claude, J. Mazurié, E. Le Gagneur, C. Simmonet, F. Quiniou et X Caisey (2003). Comparaison des lots d'huîtres "R" et "S" dans deux écosystèmes *Évolution des mortalités et des indices biométriques* Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Costil K. et S. Pouvreau (2003). Beray: comparaison des souches "R" et "S" dans deux écosystèmes. Reproduction des huîtres de la G2 ("18 mois") à Auray et en baie des Veys. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Sous-tâche 2.2.6 - FORMER04 - Étude intra site de la dynamique des mortalités en baie de Quiberon

Responsable : E. Bédier - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

L'objectif de cette tâche est de poursuivre les actions initiées en 2003 afin de prendre en compte, dans l'étude des mortalités estivales, la spécificité des pratiques culturales en eau profonde pratiquées en Bretagne Sud et de comparer les dynamiques de mortalité survenant dans l'environnement particulier de l'eau profonde (semis au sol, exondation, nourriture, température) et dans celui de l'estran suivi en 2003 avec BERAY, et en 2004 avec DYNAMAURAY (Tâche 2.2.7).

Matériel et méthode

Le dispositif expérimental sera calqué sur celui utilisé en 2003 et utilisera des structures métalliques relevables permettant de positionner sur deux hauteurs par rapport au sédiment les mêmes lots de naissain que ceux utilisés pour DYNAMAURAY. Afin de faciliter les interventions, il sera relevé une structure par échantillonnages, chaque structure supportant la totalité des lots nécessaires.

Un site principal (MeR) sera instrumenté au niveau des paramètres environnementaux et une quinzaine de points supplémentaires seront positionnés sur la baie avec le concours des professionnels. L'influence du sédiment sera pris en compte par des analyses chimiques (J. Knoery) et écotoxicologiques (F. Quiniou).

Les suivis porteront sur :

- Suivi biométrique, paramètres environnementaux, force musculaire
- Bactériologie
- Histologie quantitative (?)
- Analyse chimique sédiment
- Écotoxicologie

Résultat attendu

Le suivi spatial et temporel des mortalités et des conditions sédimentaires permettra de dresser une carte des mortalités au niveau de la baie de Quiberon, et de les relier à une éventuelle toxicité du sédiment. La comparaison des suivis en eau profonde et sur estran (Tâche 2.2.7) permettra par ailleurs de vérifier la relation existant sur les deux sites entre mortalité, maturation et conditions environnementales.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/LGP - La Tremblade : Production du naissain "R" et "S"
- Ifremer - DRV/RA/LCPL - Station de Bouin : nursage du naissain "R" et "S"
- Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M - Plouzané : Bactériologie, histologie quantitative sur CN
- Ifremer - DEL/PC - Nantes : Analyse chimique sédiment
- Ifremer - DEL/PC - Brest : Écotoxicologie

Calendrier d'exécution 2004

Le calendrier des prélèvements sera réparti de mars à octobre, avec une fréquence variable selon le type de suivi, avec un resserrement du pas d'échantillonnage autour de la période critique, soit de la mi-août à fin septembre.

Références bibliographiques

Burgeot T., D. Moraga, C. Lelong, T. Renault, J. Haure, F. Quiniou (2003). Contributions au séminaire Morest 2002, rapport d'activité 2002 Défi Morest : Volet écotoxicologie. 10p.

Fleury P.G., A. Langlade, J.F. Bouget, S. Claude, J.R. Knoery & F. Quiniou (2003). Essai de caractérisation des mortalités d'huîtres creuses en eau profonde (baie de Quiberon). Séminaire Morest, La Rochelle, 2-28 novembre 2003.

Martin A.G., P.G. Fleury, G. Tigé, T. Hirata, Y. Le Coguic, A. Langlade et J. Mazurié (1999). Évolution et estimation des mortalités estivales de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* en baie de Quiberon de mai à septembre 1998. DRV/RST/RA/LCB/99-01 .

Mazurié J., M. Foucart, A. Langlade, J.F. Bouget, P.G. Fleury, J.P. Joly, A.G. Martin. (2002). Analyse des pratiques, contraintes et performances d'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, en 2001, sur différentes concessions en eau profonde de la baie de Quiberon. DRV/RST/RA/LCB/2002-008 ; 62p.

Mazurié J., P.G. Fleury, J.F. Bouget, S. Claude, T. Hirata, A. Langlade, A.G. Martin et B. North (2000). Comparaison des performances d'élevage et de vitalité de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, en 3 sites du Morbihan, de mai 1999 à mars 2000. DRV/RA/RST/00-14, 48p.

Sous-tâche 2.2.7 - DYNAMAURAY - Suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogène-sédiment appliqué au naissain

Responsable : E. Bédier - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

La tâche DYNAMAURAY vise à poursuivre d'une part (1) les études DYNAMO02 et DYNAMO03 menées au LER-PC et ayant conduit à la mise en évidence, dans les conditions d'éstran, de stress environnementaux liés à la présence du sédiment; et (2) d'autre part les caractérisations *in situ* ayant conduit à des relations entre la maturation et la mortalité. L'ensemble de ces actions ont été menées chez des huîtres de 18 mois, or les sites de Marennes-Oléron et de la rivière d'Auray sont caractérisés par des mortalités de naissain : l'objectif de la tâche est de vérifier, pour des animaux de cette classe d'âge, les hypothèses de stress et de relation entre maturation et mortalité.

Matériel et méthode

Le dispositif expérimental vise à suivre la dynamique des mortalités sur du naissain d'un an (captage naturel, lots d'écloserie "R" et "S") placé à deux hauteurs par rapport au sédiment. Dans la mesure du possible, du naissain 3N sera ajouté au dispositif. Ce dernier permettra de croiser les effets génétiques des phénotypes "résistants" et "sensibles", l'effort de reproduction (2N et 3N) et l'effet environnemental lié au sédiment.

La présence du naissain de CN a pour objectif de constituer le témoin de naissain "professionnel", de permettre de disposer de naissain tôt au printemps, et de constituer un pont avec la tâche GIGAREPRO04 dont l'objectif est également de valider sur du naissain d'un an le schéma écophysio-logique établi à Argenton sur du 18 mois.

Un suivi pluridisciplinaire sera effectué dans la mesure de la possibilité des prélèvements et des mesures sur du naissain et vise à encadrer au maximum les phénomènes survenant pendant la période critique de mortalité, ie autour de la 2^{ème} quinzaine de juin sur le site d'Auray. Compte tenu de la date de disponibilité du naissain d'écloserie, les suivis seront ciblés sur le naissain de captage naturel, qui pourra être mis sur site dès le mois d'avril 2004.

- Suivi biométriques, paramètres environnementaux, force musculaire,
- Bactériologie,
- Histologie quantitative,
- Analyse chimique sédiment,
- Écotoxicologie,
- Biochimie,
- Ecophysio-logie SFG

Cette tâche sera connectée aux tâches 3.2.1 GIGAREPRO04 et 2.2.6 FORMER04 (suivi du même cheptel), ainsi qu'aux tâches 2.2.8 DYNAMOR04 et 2.2.9 DYNABDV pour la problématique de l'influence du sédiment dans les épisodes de stress aigu.

La disponibilité et la taille du naissain "R" et "S" va conditionner les possibilités d'étude de ces cheptels qui, en tout état de cause, ne pourront pas être disponibles, selon toute vraisemblance avant le début du mois de juin 2004.

Résultats attendus

Les résultats attendus de la tâche en 2004 vise à encadrer au maximum les phénomènes survenant pendant la période critique de mortalité sur des animaux de 1 an et de vérifier sur ce cheptel, dont les mortalités estivales constituent l'objet même du programme sur les sites de Marennes Oléron et de Bretagne Sud, les modèles développés sur les animaux de 18 mois et établis sur l'existence de stress environnementaux survenant en période de maturation et de déficit physiologique.

Calendrier d'exécution 2004

Le calendrier des prélèvements sera réparti de mars à octobre, avec une fréquence variable selon le type de suivi, avec un resserrement du pas d'échantillonnage autour de la période critique, soit de la mi-mai à la mi-juillet.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche,

- Ifremer - DRV/RA/LGP - la Tremblade : Production du naissain "R" et "S"
- Ifremer - DRV/RA/LCPL - Station de Bouin : nursage du naissain "R" et "S"
- Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M - Plouzané : Bactériologie, histologie quantitative sur CN
- Ifremer - DEL/PC -Nantes: Analyse chimique sédiment
- Ifremer - DEL/PC -Brest: Écotoxicologie
- Université Caen UMR/PE2M : Histologie quantitative sur R/S
- Ifremer - DRV/RA/LCPL - Bouin : Physiologie ?
- CREMA L' Houmeau : Physiologie ?

Références bibliographiques

Soletchnik P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMIQUE des MORTALITÉS estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire. Conchylicole de Poitou-Charentes au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

Sous-tâche 2.2.11 - CANARD - Étude de la différenciation liée aux périodes de captage naturel ()

Responsable : P.G. Fleury - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

Les dynamiques différentes de maturation observées entre les phénotypes "R" (résistant) et "S" (sensible) amènent à poser la question de l'existence, au sein des populations naturelles, d'individus de caractères similaires en fonction des périodes de ponte précoces et tardives. L'objectif est donc de capturer de manière différenciée des larves précoces et tardives dans un bassin naisseur, en l'occurrence Arcachon et de vérifier sur site les performances du naissain ainsi récolté.

Matériel et méthode

2004 : Les lots à tester seront captés sur le bassin d'Arcachon lots à tester. Pour éviter les mélanges de ponte, le captage "P" le plus pur possible sera retiré tôt après la fixation et transfert à la nurserie de Bouin fin juin. Les pontes tardives "T" seront obtenues par pose des collecteurs le plus tard possible en saison afin d'éviter le mélange de différentes catégories de ponte selon les secteurs, puis transférées à Bouin en octobre 2004.

Les dates de pose des collecteurs seront définies en fonction du suivi des pontes opérées par la station d'Arcachon.

2005 : Les performances d'élevage et indices de vitalité seront comparés sur le site de Fort-Espagnol (rivière d'Auray), caractérisé comme site à mortalité estivale de naissain.

Les performances de ce naissain seront comparées à celles du naissain "R" et "S" d'écloserie produit à l'été 2004 à La Tremblade.

Résultat attendu

On attend de cette tâche une confirmation *in situ* de l'existence au sein des populations naturelles de deux stratégies de reproduction conduisant à des morbidités différentes.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Station Arcachon : suivi reproduction et pose collecteur

Écloserie de La Tremblade : production du naissain "R" et "S"

Nurserie de Bouin : nursage du naissain de juin 2004 au printemps 2005

Références bibliographiques

Maurer D., M. Comps et E. His (1986). Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis* (15) 309-317

Maurer D. (1989). Approche des relations entre la croissance de l'huître *Crassostrea gigas* et le milieu dans le Bassin d'Arcachon. Rapport Interne Ifremer DRV-89.034-RA/Arcachon : 33 p.

Maurer D., I. Auby, N. Masson, B. Sautour, C. Gle, F. D'Amico, C. Gueguen, M.P. Tournaire, G. Trut, C. Cantin (2003). Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Année 2002. *Rapport Ifremer DEL/AR*, 248 p. + Annexes.

WP 3 - Expérimentations phase I "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.2 - Energétique et température : définition des conditions limites

Sous-tâche 3.2.1 - Participation à GIGAREPRO04

Responsable : G. Fleury - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

Les expérimentations GIGAREPRO menées au LPI-Argenton en 2002 et 2003 ont consisté à analyser l'effet du niveau trophique sur l'état reproducteur, l'état physiologique, l'état immunitaire et l'état microbiologique de population d'huîtres âgées de 1 an en début d'expérimentation. L'analyse partielle de ces résultats montre qu'un milieu nutritif riche au printemps favorise l'hypertrophie des gonades en été chez *Crassostrea gigas* tout en réduisant l'efficacité de ponte, ce qui se traduit par un prolongement de la période de gamétogenèse active. Cette période se caractérise aussi par **une efficacité d'assimilation diminuée** et un **métabolisme accru**, ce qui engendre en période estivale une scope for growth négatif.

Réalisé pour l'instant sur du 12 mois, l'expérimentation 2004 en condition contrôlée vise à confirmer ou infirmer sur du **naissain naturel (6 mois)**, ce schéma paradoxal de détresse physiologique en période de gamétogenèse.

Le LCB s'impliquera en 2004 dans cette tâche pour tester les conditions physiologiques des naissains soumis aux différents niveaux trophiques en utilisant divers indices de vitalité.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M Plouzané

WP 4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.2 - Réduction des mortalités de juvéniles

Sous-tâche 4.2.2 - Prévention des pertes en 1^{ère} année par réduction des ressources trophiques RETRO

Responsable : J. Mazurié - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

La disposition du naissain entre avril et juin sur parc haut a conduit en 2003 à une amélioration significative de la survie estivale en bridant la croissance et la gamétogenèse. Nous proposons en 2004 de vérifier si le naissain ainsi "bridé" possède la capacité de compenser son retard de croissance, sans exprimer de mortalité additionnelle. L'essai réalisé une seule fois mérite aussi d'être réitéré et testé à plus grande échelle, si des ostréiculteurs sont intéressés.

Matériel et méthode

Le protocole prévu pour confirmer l'amélioration de survie par l'accroissement de hauteur et donc de durée d'exondation, est une reprise, légèrement modifiée du protocole de 2003 : un lot expérimental de naissain naturel standard (originaire d'Arcachon), sera réparti en avril-mai à différentes hauteurs d'exondation (niveaux hauts à coefficients 30-40 contre niveaux témoins à coefficients 70-80), puis redescendu en fin d'été. Le suivi portera sur la mortalité, ainsi que sur la gamétogenèse (intensité et cinétique).

Une proposition sera faite à quelques éleveurs de rivière d'Auray afin d'appliquer un protocole approché sur une partie de leur naissain, et de contrôler la mortalité comparée en fin d'été.

Résultat attendu

Méthode (utilisation de parcs de stockage) directement utilisable par les ostréiculteurs, sur leurs parcs de stockage.

Acquisition de connaissance sur le rôle de la gamétogenèse dans les mortalités.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

CREAA - D. Mille

Calendrier d'exécution 2004

Le naissain de captage sera disposé en avril - mai à différentes hauteurs d'exondation (niveaux hauts à coefficients 30-40 contre niveaux témoins à coefficients 70-80), puis redescendu en fin d'été.

Sous-tâche 4.2.3 - Prévention des pertes en 1^{ère} année par augmentation de la densité CHAPO

Responsable : J. Mazurié - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

L'accroissement de densité locale d'élevage, en milieu ouvert, se traduit principalement par la réduction de l'accès à la nourriture ambiante. Les effets de la densité, en terme d'amélioration de survie, sont à comparer à ceux obtenue en 2003 par exondation.

Indépendamment de ce bénéfice potentiel, on attend également de la comparaison de densité l'analyse d'un éventuel processus infectieux densité-dépendant, et même d'une distance de sécurité apte à bloquer la propagation de germes pathogènes ou opportunistes, une fois exprimée une mortalité chez quelques individus.

Matériel et méthode

L'accroissement de densité sera testé selon 3 modalités expérimentales :

- augmentation de densité en poches : soit en augmentant le nombre d'huîtres au sein d'une poche ostréophile standard, soit en réduisant la taille de la poche
Cette méthode présente l'avantage de représenter fidèlement les pratiques professionnelles, mais est confrontée au risque de propagation incontrôlée d'un début de mortalité (sous l'effet de germes pathogènes ou opportunistes).
- Collage d'une centaine d'huîtres, sur plaque ou grillage ajouré, à différents espacements de manière à explorer le facteur épidémiologique.

Résultat attendu

Méthode (accroissement de densité) directement utilisable par les ostréiculteurs, sans changement de parc ou de mode d'élevage.

Acquisition de connaissance sur l'épidémiologie à petite échelle spatiale.

Références bibliographiques communes aux tâches du WP4

Cheney D., R. Elston, B. MacDonald, K. Kinnan, A. Suhrbier (2001). Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : influences of culture methods, site conditions and stock selection. WAS Aquaculture 2001. Book of abstracts.

Gillmor R.B. (1982) : Assessment of inertidal growth and capacity adaptations in suspension feeding bivalves. Mar.Biol 68 : 277-286

Gouletquer P., I. Lombas, J. Prou (1987). Influence du temps d'immersion sur l'activité reproductrice et sur la croissance de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. *Haliotis* 16 (1987) ; 453-462

Handley S.J. (1997). Optimizing subtidal oyster production, Marlborough Sounds, New Zealand : spionid polychaete infestations, water depth and spat stunting. *Journal of shellfish research* 1997, 16 (1) : 143-150

Katayama K.; Z. Ikeda; M. Shinohara (1979). The growth and survival of the seed oyster *Crassostrea gigas* with different hardening effects. *Bull. Fish. Exp. Stn. Okayama Prefect.*, 1978, 176-180, 1979

Sous-tâche 4.5 Veille et alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques (*Responsable LCB: J-F Bouget*)

Responsable : J.F. Bouget - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Les travaux et suivis de terrain des 3 dernières années (Misko, 2003; Misko et al., 2003; Ropert et al., 2003; Soletchnik et al., 2003b) mettent en évidence le caractère déterminant de la dynamique thermique et des débits et flux des intrants dans l'apparition des processus de mortalités estivales.

Sur la base des données accumulées depuis 3 ans sur les trois sites ateliers, une réflexion doit être menée sur la possibilité de mettre en place un système de veille et d'alerte intégrant ces paramètres.

Matériel et méthode

S'assurer d'une mise à jour régulière et rapide des données hydrologiques acquises sur le terrain et de celles, climatologiques, acquises auprès de Météo-France.

Il est proposé par le LERN de se charger de la synthèse et de la diffusion de ces informations, au moins pour les données de température en continu.

Résultat attendu

Contrôle et suivi de la température simultanément sur les 3 sites ateliers de Morest.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Ifremer - DEL/DRV/RA/LER/PC - La Tremblade - P. Geairon
- Ifremer - DRV/RALCB - La Trinité-sur-Mer - J.F. Bouget

Calendrier d'exécution 2004

Tout au long de l'année

Références bibliographiques

Mazurié J. (2001) Caractérisation des mortalités estivales d'huîtres creuses en vue de l'élaboration d'un programme national d'étude. 44pp (+ fiches).

Misko P., C. Bacher, J.F. Samain et M. Ropert (2003). Lien entre les apports des bassins versants en baie des Veys et les mortalités estivales survenues entre 1993 et 2002. Tâche 6.1.2. et 6.3.3. du WP6 : Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.

Misko P. (2003). Etude des apports terrigènes en baie des Veys (Volet environnement de Morest) Institut Universitaire Européen de la Mer / Ifremer-DEL-SRB. R.INT.DEL/SR/03.10/Brest. 78 p.

Ropert M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. IFREMER. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Soletchnik P. (2001). Impact of the climatic change on an estuarian ecosystem : the Marennes Oléron Bay. *French IGBP-WCRP news letter*, 12, 37-41.

Soletchnik P. et M. Ropert (2002). Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la Baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charente-Maritime) de 1997 à 2002. Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 nov 2002.

Soletchnik P. (2001) Évolution à moyen terme d'un écosystème Estuarien :Le Bassin de Marennes - Oléron. Séminaire Morest 2001, Nantes, 21-23 Novembre 2001.

Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

WP 5 - Synergies REPAMO - Morest - REMORA

Tâche 5.1 - Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes

Tâche 5.1.3 - REMORA

Responsable : P.G. Fleury - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Cf Tâche 2.2.1. Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur les 3 sites ateliers de Morest. NIRVANA

WP 7 - Descriptif des actions

Tâche 7.1 - Gestion des données du projet Morest

Responsable : A.G. Martin - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

L'objectif de cette tâche est la conception, la réalisation et l'administration d'un outil en réseau de gestion de données en vue de standardiser la saisie des données communes à plusieurs équipes et de faciliter l'extraction de ces données. Cette tâche représente l'étape d'un projet plus général de Système d'Information Aquacole ou SIA, Morest offrant l'opportunité d'aborder la question de façon concrète.

Matériel et méthode

L'année 2004 doit permettre le test en direct des données terrain, des deux outils : la base MolluSCQ, développée depuis 2001 sur le modèle de la base Remora ; et le module de saisie développé sous Excel. Les données des essais Morest précédents, actuellement sous Excel, doivent en partie être intégrées dans la base.

En ce qui concerne les données environnementales, un outil de gestion directe des métadonnées a été mis en place dans le cadre du projet SIA, et est accessible en Intranet depuis septembre 2003.

Pour la haute fréquence, après un état des lieux de l'existant en Ressources Aquacoles, un rapprochement du Comité MAREL/ROSLIT est instauré. Pour la basse fréquence, l'état des lieux est prévu par enquête et la gestion doit s'unifier avec celle organisée dans la base Quadrigé.

Résultat attendu

Un système de gestion cohérent et pratique

Une sauvegarde d'une grande partie des données Morest

Des outils d'extractions (requêtes Access)

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- Participants au groupe de travail "Gestion des données Morest"

- Tous les laboratoires Ifremer impliqués dans le suivi des sites ateliers (DEL/DRV/RA/LER-PC, LER-N, DRV/RA/LCB et LCPL) et TMSI/IDM/RIC

Références bibliographiques

Site Internet Remora : <http://ifremer.fr/remora>

Cahier des charges SIA - A.G. Martin, J.C. Masson - document interne 21/07/03

Calendrier d'exécution 2004, petit tableau,

Mise à disposition des outils Base molluSCQ sous Access et Module de saisie sous Excel aux différentes équipes : fin mars 2004

Test par les différentes équipes de terrain au cours des opérations printemps-été 2004

Envoi des données validées à l'administrateur (actuellement la responsable de tâche)

Archivage des données sur la base centrale PostgreSQL, au fur et à mesure des envois

Disponibilité d'une grande partie des données Morest - novembre 2004

Tâche 7.2 - Information et communication du projet Morest (*Responsable LCB: A-G. Martin*)

Responsable : A.G. Martin - Laboratoire Conchylicole de Bretagne

Résumé

Après la création en 2001 d'un site Intranet Morest, suivie en mai 2002 de celle d'un site Extranet Morest accessible aux partenaires extérieurs à l'Ifremer, les deux sites se sont étoffés au fur et à mesure de l'avancée du programme en 2003.

La création d'un outil Internet de présentation grand public du programme et des résultats validés, prévue en 2003, a été repoussée au début 2004.

La mise à jour de façon réactive des deux sites Intranet et Extranet sera poursuivie en 2004

Matériel et méthodes

Utilisation de l'outils Web sur le modèle du site général Ifremer

Résultat attendu

Optimisation de la communication

Diffusion de l'information élargie au grand public

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Tous les partenaires sont impliqués dans cette tâche par l'apport de leur informations, documents d'avancement et synthèses adaptée aux différents publics.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 1. Mise au point d'outils | Tâche | 2004 |
|---|--------|------|
| Génétique | 1.1 | |
| Physiologie | 1.2 | |
| Immunologie | 1.3 | |
| Pathologie | 1.4 | |
| Écotoxicologie | 1.5 | |
| Écologie côtière | 1.6 | |
| Bilan indices de stress | 1.7 | |
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, stérols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juveniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juveniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - <i>VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| - <i>VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| - <i>VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle pathol/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypol/hyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |

| | | |
|--|-------|--|
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| <i>Juveniles</i> | 3.5.1 | |
| Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nurserie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (hémol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tétraploïdes R et S.....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Ecloserie/ Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (fillère, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nurserie :</i> | 4.2.4 | |
| - <i>Nurserie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| - <i>Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| - <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en Baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | 4.3.3 | |
| - <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i> | | |
| - <i>BDV Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrans des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |
| <i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i> | 4.5 | |
| WP5. Synergies REPAMO – MOREST - REMORA | | |
| Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes | 5.1 | |
| <i>Mortalités déclarées chez les professionnels</i> | 5.1.1 | |
| <i>Mortalités intervenues dans le cadre de MOREST</i> | 5.1.2 | |
| <i>REMORA (cf.2.2.1 NIRVANA)</i> | 5.1.3 | |
| Epidémiologie des pratiques culturelles | 5.2 | |
| WP7. Gestion de données, information et communication | | |
| Gestion des données | 7.1 | |
| Information, communication et partage | 7.2 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | |
| WP 5 | | | | | | | | | | | | |
| WP 6 | | | | | | | | | | | | |
| WP 7 | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet MOREST (2001 – 2002 – 2003)

Bédier E., P.G. Fleury, S. Claude, A. Langlade et Y. Le Coguic (2002). Comparaison de 2 lots d'huîtres génétiquement différenciées : mortalité, biométrie, maturation et force intervalvaire. *Journées Morest, Ifremer, Brest 13-15 novembre 2002.*

Bédier E., M. Ropert, A. Langlade, V. Hugonnet, J.F. Bouget, S. Claude, J. Mazurié, E. Le Gagneur, C. Simmonet, F. Quiniou et X Caisey (2003). Comparaison des lots d'huîtres "R" et "S" dans deux écosystèmes *Évolution des mortalités et des indices biométriques* Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Dégremont L, P. Boudry, E. Bédier, M. Ropert & P Soletchnik (2002). Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Lots consanguins. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Dégremont L, P. Boudry, E. Bédier, M. Ropert & P Soletchnik. Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Sélection divergente. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Dégremont L, J.P. Joly, E. Bédier, M. Ropert & P Soletchnik (2002). Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Degrémont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain and P. Boudry (2002). Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Communication orale 7th WGALP (Montpellier 19-23 août 2002)

Dégremont L., P. Boudry. et E. Bédier (2003). Effet de l'âge et du parcours zootechnique sur les mortalités estivales de cheptels d'écloserie sélectionnés. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Dégremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bédier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, and J.F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. *Journal of Shellfish Research* 22(1): 327

Enriquez-Diaz M., S. Pouvreau, C. Fabioux, Y. Le Cogucic, J.C. Cochard and M. Le Penneec. Reproductive strategy : variability of reproductive pattern in two populations genetically determined of *Crassostrea gigas* (2003). Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. *Journal of Shellfish Research* 22(1): 328

Fleury P.G., E. Croguennec., B. North. et N. Gaillard (2001). Évolution technique de la mesure et de l'enregistrement de la force musculaire adductrice des bivalves comme indice potentiel de leur vitalité. Rapport provisoire, 15 p.

Fleury P.G. (2002). Est-ce que REMORA peut contribuer à la compréhension des mortalités estivales d'huîtres juvéniles ? *Journées Morest, Ifremer, Brest 13-15 novembre 2002*.

Fleury P.G. et J. Mazurié (2003). Vitalité, stress et risque de mortalité : comment les définir et comment les mesurer chez les Mollusques bivalves ? Atelier de travail sur les indicateurs de stress des Mollusques bivalves, Québec (Canada) 24-26 février 2003.

Fleury P.G., A. Langlade, J.F. Bouget, S. Claude, J.R. Knoery & F. Quiniou (2003). Essai de caractérisation des mortalités d'huîtres creuses en eau profonde (baie de Quiberon). Séminaire Morest, La Rochelle, 2-28 novembre 2003.

Joly J-P., C. Garcia, T. Comtet et Y. Le Cogucic (2001). Relations MOREST-REPAMO : Observations sur la rivière d'Auray. *Journées Morest, Nantes, 21-23 novembre 2001*.

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Fourel, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.-P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, T. Renault, B. Gagnaire, A. Huvet and J.-F. Samain (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. *Journal of Shellfish Research* 22(1): 339

Martin A.G.. (2001) Présentation WP7 Morest – Avancement 2001 – Lien avec le SIA .(Document Powerpoint visible sur Intranet/Extranet Morest.

Martin A.G.. (2002) Présentation WP7 Morest – Avancement 2002 – Lien avec le SIA .(Document Powerpoint visible sur Intranet/Extranet Morest.

Martin A.G., P.G. Fleury, J.C. Masson, M. Ropert (2003). WP7 - Gestion de données, information et communication – avancement 2003 – lien avec le SIA – Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Mazurié J. (2001). Bilan Morest de novembre 2001. Tests herméticité : démarche, méthodologie et résultats partiels. *Journées Morest, Nantes, 21-23 novembre 2001*.

Mazurié J. (2001). Qualification des bivalves par épreuves létales et test d'herméticité : démarche, méthodologie et résultats 1995-2001. Rapport Ifremer DRV/RA/LCB, 46 p.

Mazurié J. (2001). Caractérisation des mortalités estivales d'huîtres creuses, en vue de l'élaboration d'un programme national d'étude (Morest). Ifremer DRV/RA/LCB, 50 p.

Mazurié J., M. Foucart, A. Langlade, J.F. Bouget, P.G. Fleury, J.P. Joly, A.G. Martin. (2002). Analyse des pratiques, contraintes et performances d'élevage de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, en 2001, sur différentes concessions en eau profonde de la baie de Quiberon. DRV/RST/RA/LCB/2002-008 ; 62p.

Mazurié J. (2003) Mortalités estivales d'huîtres creuses: bilan et interprétation suite au colloque Morest de La Rochelle (Novembre 2003). Document de travail.

Mazurié J., A. Langlade, S. Claude, J.F. Bouget et E. Bédier (2003). Prévenir la mortalité estivale du naissain d'huîtres creuses par les pratiques culturales. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Myrand B., R. Tremblay et P.G. Fleury (2003). Peut-on caractériser (quantifier?) une bonne vitalité (inversement un stress?) chez les Mollusques bivalves. Séminaire Morest. La Rochelle 26-28 novembre 2003.

Moal J., E. Bédier, P.G. Fleury, A. Langlade, Y. Le Cogucic, L. Dégremont, P. Boudry, J.R. Le Coz, S. Pouvreau, M. Enriquez-Diaz, C. Lambert, P. Soudant and J.F. Samain (2003). Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 345

Soletchnik P, M. Ropert, E. Bédier et J. Moal (2002) Synthèse des résultats 2002 de la tâche WP2-2 du programme Morest : Suivi interdisciplinaire de la dynamique des mortalités. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Dégremont, E. Bédier, J.F. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, N. Faury, O. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire and J.F. Samain (2003). Characterisation of Summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. Communication 95th Annual Meeting NSA – New Orleans 13-17 avril 2003. Journal of Shellfish Research 22(1): 354

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.-P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet and J.-F. Samain (2002). Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. (National Shellfisheries Association, Mystic, USA, 14-18 avril 2002)

Retiff R. (2003). Bilan des connaissances environnementales sur la rivière d'Auray: bilan hydrologique du site – bilan des apports des bassins versants. Rapport DEL/MPL. Stage IUT Génie Biologique Brest.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

Sur la base de 9 H/mois par an

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|-----------------------|----------------|---------------------|
| Édouard Bédier | C | 2.7 |
| Joseph Mazurié | C | 2.7 |
| Pierre-Gildas Fleury | C | 1 |
| Anne-Geneviève Martin | C | 1 |
| Jean-François Bouget | C | 2.7 |
| Aimé Langlade | T | 4 |
| Serge Claude | T | 1 |

Ifremer - DRV/RA/LCPL - Bouin

Adresse : Station Ifremer
Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire
Polder des Champs
85230 – Bouin - France

Responsable : E. J. THOUARD

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

WP 2 : Tâche 2.2.3 : Dynamor03 : Suite analyses et traitement de données
WP 2 : Tâche 2.2.11 : CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié)
WP 3 : Tâche 3.5.1 : Betonbloom (Juvéniles R, S (2n et 3n) à 3 niveaux trophiques (nurserie)
WP 4 : Tâche 4.2.4 : Nurserie (différents niveaux trophiques) (cf Betonbloom)
WP 7 : Gestion de données

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

EN 2003, Le travail réalisé par le DRV/RA/LCPL a été, comme les années précédentes depuis que le programme Morest existe, de pré grossir en nurserie les familles G3 produites par DRV/RA/LGP avant la mise sur sites ateliers.

Le laboratoire s'est également investi dans l'étude "DYNAMOR" (WP 2) pilotée par le DEL/DRV/RA/LCPC, pour dresser le bilan énergétique des individus à différentes périodes du suivi ainsi que dans la caractérisation de la reproduction.

Pour 2004, le DRV/RA/LCPL propose, en collaboration avec le DEL/DRV/LPC et le DRV/RA/LGP, de poursuivre l'analyse des données non traitées pour confirmer les premiers résultats obtenus. Ce travail devrait faire l'objet de publication avec la participation et l'implication des équipes concernées. Les compétences déjà développées en nurserie et en écophysiologie seront, en 2004, étendue à deux études spécifiques :

- étude de la survie de juvéniles "R" et "S" pré grossis à différents niveaux trophiques (BETON), étude pour laquelle le laboratoire réalisera la nurserie des lots ainsi que l'évaluation du « Scope for growth » en salle d'écophysiologie pour chacun des lots prégrossis avant leur transfert à La Tremblade
- étude de la survie de naissain naturel, capté à Arcachon, en fonction du caractère précoce ou tardif de son obtention (CANARD). Dans cette étude les différents lots seront prégrossis à Bouin avant d'être remis sur les sites expérimentaux sur estran.

WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâches 2.2. - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.3 - DYNAMOR03, suite analyses et traitement de données

Les résultats de 2003 ont mis en évidence des stratégies de la reproduction différentes selon l'origine des lots "R" ou "S" avec notamment un effort reproducteur moins important chez les individus résistants.

Ces résultats pourront être confirmés par des analyses d'images de coupes histologiques de la gonade des animaux prélevés en 2003 et conservés pour cet usage. Ce travail se fera en collaboration étroite avec les laboratoires DEL/DRV/LCPC et DRV/RA/LGP de Ronce les Bains.

Les résultats attendus devraient différencier le statut reproducteur des individus "R" et "S" sur deux points :

- effort de reproduction,
- stratégie de la reproduction.

Sous-tâche 2.2.11 - CANARD (Captage Naturel ARcachon Différencié)

L'origine de cette étude provient d'une hypothèse selon laquelle les animaux qui pondent précocement seraient de nature résistant "R" et transmettraient cette particularité génétique à leur descendance. A l'inverse, les individus qui se reproduisent tardivement auraient le caractère sensible "S" dont souffrirait également leur progéniture. Ce constat est régulièrement fait dans le bassin d'Arcachon.

En 2004, l'étude consiste à obtenir des lots de naissain issus de captage naturel précoce (mi-juillet) et tardif (mi-août) dans le bassin d'Arcachon (DEL Arcachon) et de les transférer, sur leur support de captage à Bouin pour y être pré grossis (DRV/RA/LCPL) jusqu'en mars 2005. A la suite de quoi, les animaux auront atteint une taille suffisante pour être transférés dans un site naturel à forte mortalité de naissain pour y être suivis (DRV/RA/LCB).

Des animaux de même âge (fixation fin juillet) et issus d'un pool "R" et d'un pool "S" (DRV/RA/LGP) suivront un parcours identique dès la phase de pré grossissement.

Cette étude devrait permettre de sélectionner les animaux de captage naturel en fonction de leur résistance et selon les dates de ponte.

WP3 - Expérimentation phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

Tâche 3.5 - Modèle d'infection

Sous-Tâche 3.5.1 - Juvéniles BETON (3 niveaux trophiques en nurserie)

Jusqu'à présent, les études menées dans le cadre de Morest ont prioritairement mis l'accent sur les animaux adultes. Ainsi, quelques pistes solides peuvent d'ores et déjà expliquer les mortalités estivales (effort reproducteur important, statut physiologique, proximité avec le sédiment, etc...). En revanche, il existe peu de données pour expliquer les mortalités de juvéniles (hormis la présence de pathogènes) qui ne répondent pas aux mêmes besoins physiologiques. Cette étude propose d'étudier la fragilité de naissains d'huîtres d'origines "R", "S", Triplo et Témoin Sauvage (TS) pré grossis à différents niveaux trophiques.

Il est proposé, en 2004, de pré grossir à Bouin (DRV/RA/LCPL) 5 lots de naissain d'huîtres en provenance du DRV/RA/LGP et à 3 niveaux trophiques selon les modalités suivantes :

- période : mai à mi-juillet,
- 5 lots de 10000 huîtres : diplo "R", diplo "S", triplo "R", triplo "S" et "TS",
- 3 niveaux trophiques : Eau de Mer Naturelle (4-5 µg/l de Chla), EMN + *Skeletonema costatum* (10 µg/l de Chla) et EMN + *S. costatum* (20 µg/l de Chla).

Durant la période de pré grossissement, il est prévu de réaliser 2 tamisages (intermédiaire et fin) et biométries des lots pour identifier la croissance et la mortalité des individus. Des prélèvements seront effectués pour apprécier l'évolution des gonades des animaux (DRV/RA/LGP) en histologie. En fin de pré grossissement, le bilan énergétique des animaux sera mesuré en écophysologie. Les lots de naissain d'huîtres seront ensuite transférés au DRV/RA/LGP dans des bacs bétons où seront appréciées les mortalités en fonction de l'origine des animaux et de leur parcours trophique.

Les résultats attendus de cette étude sont de vérifier si le niveau trophique peut entraîner, par le développement plus ou moins important de la gonade, une fragilité différentielle des juvéniles en milieu stressant.

WP 4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.2 - Réduction des mortalités des juvéniles

Sous-tâche 4.2.1 - Nurserie (différents niveaux trophiques (cf 3.5.1))

WP 7 - Gestion de données, information et communication

Pour mémoire, participation d'un agent du laboratoire à la réflexion (H. Palavadeau)

Calendrier

- A partir de Mars 2004

Références

- Site Internet Remora : <http://ifremer.fr/remora>
- Cahier des charges SIA - A.G. Martin, J.C. Masson - document interne 21/07/03

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|---|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA</i> | 2.2.12 | |
| WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités | | |
| Suite d'opérations 03 | | |
| GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression R et S (métab. énergétique, enzymes digestives) | 3.1 | |
| Energétique et température : définition des conditions limites | 3.2 | |
| Juvéniles | | |
| <i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i> | 3.2.1 | |
| Adultes | | |
| <i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites (R et S 18 mois, Origines MO et BDV)</i> | 3.2.2 | |
| - <i>VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)</i> | | |
| - <i>VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?</i> | | |
| - <i>VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)</i> | | |
| Stress | 3.3 | |
| <i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i> | 3.3.1 | |
| <i>Hypo/hyperoxie, H2S, NH3....</i> | | |
| Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes | 3.4 | |
| Approche gènes candidats | | |
| <i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i> | 3.4.1 | |
| <i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i> | 3.4.2 | |
| Modèle d'infection | 3.5 | |
| Juvéniles | 3.5.1 | |
| <i>Betonbloom : Juvéniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nursérie) puis</i> | | |

| | | |
|--|-------|--|
| Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de : | | |
| - Conditions de l'expression du virus Herpes | | |
| - Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique | | |
| <i>Adultes</i> | 3.5.2 | |
| - Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (héamol., appareil digestif, | | |
| - Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission | | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tetraploïdes R et S.....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Ecloserie/ Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nurserie :</i> | 4.2.4 | |
| - <i>Nurserie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| - <i>Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| - <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en Baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | 4.3.3 | |
| - <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i> | | |
| - <i>BDV Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrans des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |
| <i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i> | 4.5 | |
| WP7. Gestion de données, information et communication | | |
| Gestion des données | 7.1 | |
| Information, communication et partage | 7.2 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 2 (2.2.3) | | | | | | | | | | | | |
| WP 2 (2.2.11) | | | | | | | | | | | | |
| WP 3 (3.5.1) | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 (4.2.4) | | | | | | | | | | | | |
| WP 7 (7.1) | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Ernande B., P. Boudry, S. Heurtebise, J. Haure, J.L. Y. Martin (2001) Bases génétiques et plasticité de la croissance et de la survie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Communication orale et résumé aux journées conchylicoles de Nantes. 3-4 avril 2001.

Dégremont L. , E. Bédier; J.L. Martin; P. Soletchnik; J.P. Joly; M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain and P. Boudry (2002). Genetic basis of survival of juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*) in a multi-site field experiment. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production Août 2002 Montpellier.

Haure J., A. Huvet (2002). Réponses biologiques de *Crassostrea gigas* dans un milieu hypoxique. Journées Ifremer, Morest, Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 13-15 novembre 2002, Brest, France

Haure J., B. Ernande, H. Palvadeau, M. Nourry, C. Penisson et J.L.Y. Martin (2002) Mise en évidence du degré de tolérance de diverses populations d'huîtres *Crassostrea gigas* vis à vis de transferts multiples dans des écosystèmes de niveaux trophiques différents DRV/RST/RALCPL/2002-12 ; 22p.

Haure J. A. Fortin, B. Dupuy, M. Nourry, H. Palvadeau, M. Papin, C. Pénisson, et J.L. Martin - Etude comparative des caractéristiques et des performances de croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas* diploïde et triploïde en milieu contrôlé. Rapport de contrat Région Pays de Loire n°02-5964. Octobre 2003. 37 p.

Haure J. et al. (2003). Reproduction on the physiological functions. Effect on environment and groups of oysters. Colloque Morest, 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Soletchnik, P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMique des MORTalités estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|--------------|----------------|---------------------|
| E. Thouard | C | 7 |
| J. Haure | | |
| J.L. Martin | | |
| M. Nourry | T | 15 |
| M. Papin | | |
| H. Palvadeau | | |
| B. Dupuy | | |
| C. Penisson | | |

Demande budgétaire

Les crédits attribués au LCPL pour effectuer les tâches liées à Morest ne correspondent plus aux besoins réels si l'on considère la nouvelle organisation en projet qui exclue pour les laboratoires toute source de financement qui ne serait pas reliée directement à un projet.

La nurserie de Bouin et la production de phyto, ainsi que la salle de mesures écophysiologicals ne seront mises en service cette année que pour répondre aux besoins du programme Morest.

Le fonctionnement de ces équipements sera donc uniquement financé par Morest.

Tenant compte du fait que le centre de Nantes "couvre" la station pour les fluides et les frais généraux, il reste à financer les frais opérationnels.

Une estimation basée sur les dépenses de 2003 (et qui sera affinée en cours d'année), nous conduit à demander que les crédits qui nous sont accordés par Morest soient :

Pour le compte Achats : 5000 € (dotation actuelle : 3019 €)

Pour le compte Autres : 3000 € (dotation actuelle : 2400 €)

Pour le compte Missions : 2000 € (dotation actuelle : 1099 €)

La demande pour ce dernier compte est justifiée, entre autre, par le coût des astreintes de week-end (imputées en missions) que va générer la nurserie utilisée sur une plus longue période que les années précédentes.

Ifremer DRV/RA/LER/PC - La Tremblade

Adresse : Station Ifremer
Laboratoire Environnement et Ressources de Poitou - Charentes
Ronces les Bains
BP 133
17390 - La Tremblade

Responsable : Patrick Soletchnik

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé de votre action dans le projet :

Mortalité et environnement. Tâche WP2: caractérisation des mortalités estivales :

- (1) Etude du modèle de mortalité "plat - table" dans le sud du bassin de Marennes Oléron: Poursuite de l'analyse de dynamoR 2003 (WP2.2.3) et poursuite de l'étude du modèle sur estran (WP2.2.8).
- (2) Etude et analyses de données pour préciser les relations entre mortalités et l'environnement (WP2.2.1).

1 - Descriptif de l'activité

Suite aux opérations de recherche Dynamo et DynamoR (2002-2003) dont les analyses biologiques et de données vont se poursuivre en 2004 (**WP2.2.3**), l'étude terrain en 2004 se focalise sur la période de stress aigu et du pic de mortalité des cheptels à proximité du sédiment (**WP2.2.8**).

Dans un axe d'analyse de donnée, l'effort des laboratoires côtiers portera également en 2004 sur des analyses de données tentant de préciser les relations entre la mortalité de *Crassostrea gigas* et l'environnement sur les différents sites ateliers, s'intéressant dans un premier temps à l'effet de la température et à l'apport d'eau douce (**WP2.2.1**).

WP 2 - Caractéristique des mortalités estivales

Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

Sous-tâche 2.2.1 - NIRVANA - Synthèse caractérisation des mortalités

Les actions présentées ci-dessous sont des propositions de synthèses à effectuer à partir des bases de données de mortalité (*Crassostrea gigas*) et environnement dans différentes régions et bassins ostréicoles.

Ces études de synthèse sont proposées par les laboratoires côtiers : DEL/DRV/RA/LERN, DEL/DRV/RA/LERPC et DRV/RA/LCN (action : Joseph Mazurié, Michel Ropert et Patrick Soletchnik et collaborateurs)

| Intitulé des actions de recherche (analyse et publications) proposée dans la WP2.2.1 | Bases de données | Acteurs | Réf action |
|---|--|-------------------------------|------------|
| Caractérisation des mortalités. Analyse des bases de données existantes | | | |
| Caractérisation de la mortalité selon les bassins ostréicoles en France (huîtres de 1an et 2 ans) (10 ans de données). | REMORA | P.G. Fleury, J. Mazurié & Co | BM-1 |
| Analyses des mortalités en baie des Veys (4 ans de données et 6 stations d'étude) | SUMO | M. Ropert & K.Costil | BM-2 |
| Relation entre mortalité et environnement | | | |
| Relation entre la mortalité et les apports en eau douce sur les 3 sites ateliers de Morest depuis 10 ans (comparaison inter annuelle) | REMORA + bases météo et hydro | P. Soletchnik, M.Ropert & Co. | ME-1 |
| Relation entre la mortalité température et indice de croissance sur les 3 sites ateliers de Morest et au cours de quelques cycles d'élevage (analyse "fine"). | MOREST, Croissance et profils thermiques | P. Soletchnik, M.Ropert & Co. | ME-2 |
| Influence de la pluie et de la température sur la croissance de <i>Crassostrea gigas</i> , selon les profils de bassins ostréicoles bretons | | J. Mazurié & Co | ME-3 |

Résumé de l'action dans la tâche

Analyse de données, synthèses et publications

Résultat attendu

Caractéristiques des mortalités estivales (BM1, BM2).

Préciser les relations mortalité, température et apport d'eau douce dans le cadre de la problématique MOREST (ME1, ME2).

Préciser les comparaisons intersites (BM1, ME1, ME2).

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

- DEL/DRV/RA/LERN - Port-en-Bessin - M. Ropert,
- Université de Caen - UMR/PE2M - K. Costil,
- DRV/RA/LCN - la Trinité-sur-Mer - J. Mazurié, E. Bedier, J.F. Bouget

Sous-tâche 2.2.3 - Dynamor03 - Suite des analyses de matériel biologique et de données

Résumé de l'action dans la tâche

L'étude intégrée de la mortalité sur le modèle "plat - table" du sud du Bassin de Marennes Oléron en 2002 et 2003 a donné lieu à de nombreuses opérations de recherche qui demandent à être analysées en 2004.

Matériel et méthode

Prélèvements effectués pour être analysés en 2004 et investigation à poursuivre en pathologie (action T. Renault & Co.), en l'écotoxicologie (action T. Burgeot & Co.), en reproduction (action J. Haure, O. Le Moine and Co.), autres actions ?

Résultat attendu

Mieux comprendre le modèle de mortalité "plat table" de *Crassostrea gigas* dans le sud du Bassin de Marennes Oléron. Poursuite de l'étude.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Travail de collaboration avec les labos ayant encore à poursuivre l'investigation (20 labos impliqués dans dynamoR en 2003).

Références bibliographiques

Soletchnik P, O. Le Moine, N. Faury, D. Razet, P. Geairon and P. Gouletquer (1999). Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin de Marennes – Oléron. Etude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'information géographique (SIG). Aquat. Living. Resour. 12 (2) 131-143.

Calendrier d'exécution

(voir ci dessous)

Sous-tâche 2.2.8 - DYNAMOR04 - suivi léger (liens avec 6.2.4 à 6.2.6)

Résumé de l'action dans la tâche

Faisant suite des études Dynamo (2002) et DynamoR (2003), cette action de collaboration entre laboratoire côtier (Ecologie côtière) et équipes thématiques, se décompose en 2 parties :

tâche 2.8A : Suivi zootechnique et environnemental de "référence" au printemps - été 2004, associé à une étude sédimentaire fine autour de la période de mortalité (~ mi juin). Action : LERPC : F. Blouin, J.L. Seugnet (zootechnie et suivi de l'environnement) & P. Malestroit sur l'étude sédimentaire, avec collaboration (1) J. Knoery en formation - analyse chimique, (2) T. Renault en Pathologie, (3) V. Bouchet².

tâche 2.8B sur le même site atelier: Etude d'écologie microbienne et de challenges bactériens (F. Le Roux et L. Miossec) (voir pour le détail : fiche labo DRV/RA/LGP- La Tremblade).

Matériel et méthode

Elevage de cheptel diploïde de 18 mois de Mars à Août sur table de 15 cm. Suivi de la mortalité à 15 cm et contrôle de la mortalité à 70 cm au moment du pic de mortalité en Juin.

Suivi des paramètres physico chimiques (fréquence de mesure = 15 min) à l'aide d'une sonde multi paramètres (Ysi) au niveau d'élevage 15 cm. Précision sur le suivi au moment du pic de mortalité : (fréquence = 2 min). Paramètres = température, salinité, oxygène, NTU, pH.

Dans le sédiment : A chaque échantillonnage (voir ci dessous) sont effectués : (1) un carottage pour analyse chimique sulfure et ammonium = mesure de flux potentiel, (2) un "mini carottage" pour mesures de biomasse chlorophyllienne et matière organique détritique, (3) une mesure de scissométrie (?).

Dans la colonne d'eau (1) série de mesures d'ammonium et pH (eg + 1 heure après la basse mer) autour de la période de mortalité du mois de juin; (2) quelques mesures sur des cycles de marées + analyses "historiques" ; (3) test olfactifs pour les sulfures dans l'eau ; (4) cycles de mesures au flot in situ durant la période sensible.

| mars | | avril | | mai | | juin | | | | juillet | | aout | | |
|------|----|-------|----|-----|----|------|----|----|----|---------|---|------|---|--|
| | T0 | | 22 | | 26 | 9 | 14 | 17 | 21 | 24 | 1 | 22 | 5 | |

Echantillonnage 2004 en zootechnie et étude du sédiment

Résultats attendus

Etude appliquée qui doit permettre

- de préciser la dynamique de flux potentiel de sulfure et d'ammonium au niveau du sédiment ;
- de vérifier si ce flux potentiel est bien corrélé dans le temps (1) à une présence de sulfure et d'ammoniaque dans la colonne d'eau; (2) à un changement dans la biomasse algale vivante dans le sédiment ; (3) au pic de mortalité de *Crassostrea gigas*.

Lien avec les autres partenaires impliqués dans cette tâche

Ifremer DEL - Joël Knoery (Nantes), F. Quiniou (Brest)

² statut CNRS en thèse avec P.G.Sauriau (l'Houmeau) - étude sur les foraminifères des biodépôts du sédiment

Calendrier d'exécution
(voir plus loin)

Tableau récapitulatif des actions 2004

| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales in situ | | |
|---|---------------------------|--|
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire in situ des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : caractérisation des mortalités en relation avec la température sur les sites atelier du défi</i> | 2.2.1A | |
| <i>SALEAU : caractérisation des mortalités en relation avec les apports d'eau douce sur les sites atelier du défi</i> | 2.2.1B | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>Suite analyses et traitement de données de DynamoR (2003)</i> | 2.2.3 | |
| Comparaison intra site | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé intra site des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité intra site baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DynamoSS = suite en 2004 des études dynamo (2002) et dynamoR (2003)</i> | 2.2.8A- 2.2.8B | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé intra site de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| WP2.2.1 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2.2.3 | | | | | | | | | | | | |
| WP 2.2.8A | | | | | | | | | | | | |
| WP 2.2.8B | | | | | | | | | | | | |

2 - Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest (2001 – 2002 – 2003).

Abstracts publiés et proceedings

Degrémont L, E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, P. Boudry, 2002. Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Proceedings of the World Congress on genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23, pp. 481-484.

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Degrémont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet, J.F. Samain. Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. Journal of Shellfish Res. 19, 616 (abstract).

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Degrémont, E. Bedier, M. Bouget, B. Dubois, J.L. Martin, M. Enriquez Diaz, N. Faury, O. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire and J.F. Samain (2003). Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in France in relation to environmental parameters (abstract). J. Shellfish Res. 22, 354 (abstract).

Degremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bedier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal and J.F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. J. Shellfish Res. 22, 327 (abstract).

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Degremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bedier, T. Renault, B. Gagnière, A. Huvet & J.F. Samain (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. J. Shellfish Res. 22, 339 (abstract).

Communications

Degrémont L., E. Bédier, J.L. Martin, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, P. Boudry. Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Talk at the 4th World Congress on genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23.

Soudant P., C. Lambert, G. Choquet, S. Ford, C. Paillard, L. Degrémont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, J.P. Joly, M. Ropert, E. Bédier, A. Huvet, J.F. Samain. Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. Talk at the 94nd Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, Mystic, Connecticut, USA, April 14-18.

Thebault A., M. Robert et P. Soletchnik. (2001) Dynamique de la mortalité de naissain sur deux sites du Bassin de Marennes Oléron. Colloque Morest. Nantes (20-23) Novembre 01.

De Ambroggi C., Meissner A. et P. (2001) Soletchnik. Mortalité en laboratoire sur du naissain d'écloserie de la série 1 (caractérisation précoce). Colloque Morest. Nantes (20-23) Novembre 01.

Soletchnik P. (2001) Mortalité... et... mortalité. Colloque Morest. Nantes (20-23) Novembre 01.

LCPC, LCN, LPI, LEMAR IHP. Comparaison des sites de Ronce et baie des Veys, incidence sur la reproduction et les mortalités de *Crassostrea gigas*. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

LCPC, LGP, LPI,. Caractérisation finale de Cares 2001. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Soletchnik P., N. Faury, P. Geairon, D. Razet, P. Guilpain, J.L. Seugnet & O. Le Moine (2002). Étude pluridisciplinaire de la DYNAMIQUE des MORTALITÉS estivales dans le Bassin de Marennes - Oléron. Première partie : Dynamique des mortalités en relation avec la reproduction in situ et la température. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Le Moine O., T. Renault, N. Faury, P. Geairon, D. Razet, P. Guilpain, J.L. Seugnet, B. Gagnaire, N. Kerdudou & P. Soletchnik (2002) Synergie écologie côtière et activité hémocytaire. Analyse de la phagocytose en relation avec la dynamique de mortalité et la maturation de *Crassostrea gigas* dans différents environnements. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Ropert M & P. Soletchnik (2002) Première approche d'une comparaison entre deux sites ostréicoles : La baie de Veys (Basse Normandie) - Le Bassin de Marennes - Oléron (Charentes Maritimes) de 1997 à 2002. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Soletchnik P., M. Ropert, E. Bedier et J. Moal (2002) Synthèse des résultats 2002 de la tâche WP2-2 du programme Morest : Suivi interdisciplinaire de la dynamique des mortalités. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002

Degrémont L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert & P Soletchnik (2002) Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Lots consanguins. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Degrémont L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert & P Soletchnik. (2002) Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Sélection divergente. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Degrémont L., J.P. Joly, E. Bedier, M. Ropert & P Soletchnik (2002) Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Seconde génération. Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Degrémont L., A. Doner & P. Soletchnik (2002) Caractérisation *in situ* des mortalité estivales. Bases génétiques. Caractérisation en laboratoire de la seconde génération. Brest. Colloque Morest. (13-15) Novembre 2002.

Soletchnik P., M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, L. Degremont, J.F. Bouget, Dubois B., M. Enriquez-Diaz, N. Faury, P. Le Moine, T. Renault, B. Gagnaire & J.F. Samain (2003). Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* in France in relation to environmental parameters. 95 th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.

Degremont L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bedier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal & J.F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. 95 th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.

Lambert C., P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, S. Frouel, L. Degremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bedier, T. Renault, B. Gagnière, A. Huvet & J.F. Samain (2003). Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. 95 th Annual Meeting National Shellfisheries Association, New Orleans, Louisiana, April 13-17, 2003.

Soletchnik P., F. Blouin, P. Geairon, D. Razet, S. Robert, A. Couty, D. David & O. Le Moine (2003). Etude de la dynamique des mortalités estivales de *Crassostrea gigas*. Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron, Part I. Description *in situ*. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Soletchnik P., N. Malet, O. Le Moine, P. Malestroit, J.R. Knoery, J. Bretaudeau, D. Razet, F. Blouin & P.G. Sauriau (2003). Etude de la dynamique des mortalités estivales de *Crassostrea gigas*. Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron, Part II. Caractérisation des environnements. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Burgeot T., F. Geret, D. Menard, J. Haure, M. Papin, C. Penisson, H. Palvadeau, M. Noury, B. Dupuy, T. Renault, B. Gagnaire, A. Le Roux, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, D. Moraga, I. Boutet, D. Violeau, A. Royer, P.Y. Communal, A. Pffol Leskowicz, F. Quiniou, B. Klein, X. Caisey, D. Masson, N. Faury, P. Soletchnik (2003) Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron, Part III. Ecotoxicologie et bio-marqueurs de stress. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Haure J., P. Soletchnik, T. Renault, B. Gagnaire, N. Faury, N. Kerdudou, T. Burgeot, F. Blouin, P. Geairon, D. Razet, A. Couty, D. David, O. Le Moine, M. Papin, H. Palvadeau, B. Dupuy, C. Penisson, M. Nourry, J.L.Y. Martin, C. André, F. Gagné (2003) Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron. Part IV, Reproduction on the physiological functions. Effect on environment and groups of oysters. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Renault T, J.L. Nicolas, M. Garnier, D. Saulnier, F. Le Roux, P. Soletchnik, O. Le Moine (2003) Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron. Part V, Pathologie. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Soletchnik P., T. Burgeot, J. Haure, F. Le Roux, N. Malet, T. Renault & J.F. Samain (2003). Etude la dynamique des mortalités estivales de *Crassostrea gigas*. Etude du modèle "plat-table" du bassin de Marennes-Oléron. Part VI. Etude intégrée. Séminaire Morest 26-28 novembre 2003, La Rochelle.

Rapports internes DRV référencés

Contribution du laboratoire de Poitou - Charentes au défi Morest. Thématique écologie côtière. R.INT.RA /LCPC/2003-06. 36 pp.

Autres types de Rapports

Soletchnik P., 2001. Note Morest. Présentation des résultats et premières réflexions sur les mortalités de naissain *Crassostrea gigas*, familles génétiques (LGP La Tremblade) survenues dans les structures d'élevage de La Tremblade, en juin-juillet 2001, 5 p.

Soletchnik P., 2001. Mortalités de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur le littoral Atlantique. Contribution du LCPC au programme Morest, bilan des résultats en septembre 2001, 53 p.

Ambroggi (de) C. (2001). Mise au point d'un outil de caractérisation de l'état physiologique des cheptels d'huîtres. Mémoire d'Ingénieur ESITPA, IFREMER LCPC, 33 p + annexes.

Degrémont L, A. Doner, P. Soletchnik, 2002. Caractérisation précoce de la mortalité des lignées divergentes de *Crassostrea gigas* (G2). Premiers résultats, 9pp

Soletchnik P. et al., 2002. DYNAMO de Morest. Note d'information n°1 du 29 avril 2002, 1pp

Soletchnik P. et al., (2002). DYNAMO de Morest. Note d'information n° 2 du 17 mai 2002, 4pp

Soletchnik P. et al., (2002). DYNAMO de Morest. Note d'information n°3 du 13 juin 2002, 4pp

Soletchnik P. et al., (2002). DYNAMO de Morest. Note d'information n°4 du 3 juillet 2002, 2pp

Soletchnik P. et al., (2002). DYNAMO de Morest. Note d'information n°5 du 26 août 2002, 3pp : "Cas d'école"

Madec P. (2002). Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Performances d'élevage comparées dans deux écosystèmes du bassin de Marennes-Oléron. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du titre d'Ingénieur-Maître, EGID-BORDEAUX III, 58 p. + annexes.

Couty A. (2003). Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Rapport de stage IUP 3ème année, Metz, 33 p + annexes.

David, D. (2003) Influence des paramètres environnementaux sur la mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes Oléron. Rapport de stage IUT 2ème année, option Génie de l'environnement, Tours, 39 p + annexes.

3 - Moyens affectés au projet

Temps personnel affecté au programme

| Nom | Grade (C ou T) | Temps H/Mois par an |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| Patrick Soletchnik | Cadre C1 | 50 % (temps annuel) |
| Frédéric Blouin | Technicien | 15 % (temps annuel) |
| Jean Luc Seugnier | Pilote LTB | 5 % (temps annuel) |
| Pascale Malestroit | Technicienne | 3 % (temps annuel) |
| Oliver Le Moine | Cadre C1 | 1 % (temps annuel) |
| Daniel Razet | Cadre - Ingénieur | 1 % (temps annuel) |
| Philippe Geairon | Technicien | 1 % (temps annuel) |

Structures intermédiaires

CREAA - Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole - Le Château d'Oléron

Responsable : P. Blachier - Directeur
D. Mille - Responsable d'Exploitation

Adresse : Prise de Terdoux 17480 - La Château d'Oléron
Tél : 05 46 47 51 93 Fax : 05 46 47 53 15 e-mail : Creaa@wanadoo.fr

Fiche Programme Morest 2004

Intitulé des actions dans le projet :

- Sous-tâche 2.2.1 - NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités
- Sous-tâche 2.2.12 - CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA
- Sous-tâche 4.2.2 - Prévenir les pertes en 1ère année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)

1 - Descriptif de l'activité

Introduction

Le CREAA est intervenu dans Morest en 2003 dans les tâches 4.1.1 (accueil des lots G3 avec test sur parcs et filière), 4.1.2 (amélioration de la survie par passage sur la filière) et 4.5; (qualité du captage naturel en Charente-Maritime). Les principaux acquis de 2003 sont :

- la mise en évidence de l'expression d'un caractère de résistance des lots sélectionnées G3R mais aussi des très fortes mortalités qui ont touchés tous les lots ($53,8\% \pm 6\%$) sur parcs et sur la filière. L'argument d'une mise à l'eau trop tardive a été avancé pour expliquer les mortalités très conséquentes et supérieures à d'autres lots di- et triploïdes issus d'écloserie suivis par le CREAA dans le cadre de son réseau estran,
- la survenue des principales mortalités sur les G3 comme sur les naissains naturels appartenant au CREAA coïncide avec le passage à une température de 19°C dans l'eau,
- il est confirmé en 2003 que le recours à du naissain triploïde issu de croisement apparaît comme un recours aux mortalités importantes de la 1^{ère} année. De même, il a été montré en 2003 que l'utilisation de la filière a permis de réduire de moitié les mortalités du naissain naturel relevées sur parcs. Cela confirme l'intérêt déjà prouvé, d'une délocalisation au large de tout ou partie de l'élevage à Marennes-Oléron,
- d'autre part, il avait été convenu de placer en 2003 des collecteurs lors de différentes périodes de captage afin de recueillir des lots dits précoces, intermédiaires et tardifs. L'effet recherché est l'acquisition d'un caractère de résistance ou de sensibilité à la mortalité selon la période du captage. Or, seuls les tubes placés le 17/07/03 et ceux placés le 31/07 ont collecté des huîtres et pas ceux posés les 27/08 et 12/09. Dans ces conditions, il semble difficile d'espérer mettre en évidence une différence de comportement entre des lots d'huîtres qui auraient acquis un hypothétique caractère de résistance/sensibilité à la mortalité. Cette action est donc abandonnée.

WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

Tâche 2.2 - Etude-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplois

Sous-tâche 2.2.1 - NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités

Dans le cadre d'une caractérisation des mortalités *in situ*, il a été proposé par les stations Ifremer qui entretiennent des réseaux d'acquisitions de données de croissance et de mortalité sur parcs (Ronce, La Trinité et Port-en-Bessin), l'intégration des données issues du Réseau Estran du CREEA et des essais sur filière. Le CREEA prévoit pour 2004/2005 une synthèse complète des données acquises depuis la naissance du réseau en 1991 à Marennes-Oléron. Elles pourraient faire l'objet d'une participation du CREEA à une publication scientifique.

Matériel et méthode

Traitement des données acquises depuis 1991 et en cours d'acquisition en 2004

Résultats attendus

Mise en évidence des conditions de mortalités à Marennes-Oléron. Mise en pratique possible de stratégies simples d'élevage sur parcs par le biais de délocalisation spatiales et temporelles entre les zones d'élevage. Modification des pratiques et des stratégies professionnelles.

Sous-tâche 2.2.12 - CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA

Le CREEA pourrait participer en 2005 à l'accueil de lots de captages différenciés à Arcachon.

WP 4 - Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

Tâche 4.2 - Réduction des mortalités de juvéniles

Sous-tâche 4.2.2 - Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre))

Pas d'action sur la filière en 2004 car les suivis s'arrêtent en juin 2004. La participation du CREEA dans cette tâche se résume en une utilisation des données acquises depuis 1995 sur la filière expérimentale située au large de Boyardville au Nord du bassin de Marennes-Oléron. Les acquisitions de références se terminent en mai car les différentes stratégies zootechniques privilégiant la croissance et une amélioration de la survie des huîtres de première, deuxième et dernière année ont été mises en oeuvre. Une synthèse générale sera publiée au cours du premier semestre de cette année.

En revanche, toujours dans le cadre de la prévention des pertes en 1^{ère} année, il est prévu de réaliser un bilan d'huîtres captées en 2002 sur tubes et placées dès mars 2003 sur différents parcs caractérisés par des niveaux trophiques et des niveaux de mortalité différents. L'objectif est de voir l'éventuelle influence de l'historique du parcours cultural en prégrossissement sur le degré de réussite du demi-élevage en 2^{ème} année.

Matériel et méthode

Le nombre d'animaux sur les tubes portant le naissain collecté en 2002 va être déterminé. Un bilan des survies sera fait pour chaque provenance de demi-élevage. Les tubes seront ensuite détrouqués et les animaux mis en poches pour passage sur parcs en demi-élevage. Leur croissance et leur survie seront comparées à la fin de l'année 2004.

Résultats attendus

Pour ce qui concerne l'étude du naissain capté en 2002, proposition à la profession d'une **stratégie de prégrossissement des collecteurs ou du grattis** en 1^{ère} année en cas de mise en évidence d'un caractère de résistance ou de sensibilité des huîtres selon leurs conditions de prégrossissement.

Dans le cadre d'un **recours à la filière** pour tout ou partie de l'élevage, il a été décidé une deuxième phase qui verra à partir de 2005, la mise en démonstration en conditions d'exploitation réelle d'une ou plusieurs filières en collaboration avec des professionnels volontaires.

Tableau récapitulatif des actions 2004

| | | |
|--|--------|--|
| WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i> | | |
| Effet génétique | 2.1 | |
| <i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i> | 2.1.1 | |
| <i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i> | 2.1.2 | |
| <i>Triploïde RR et SS</i> | 2.1.3 | |
| <i>Comparaison R et S au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i> | 2.1.4 | |
| <i>Fin BERAY : maintien des performances des familles R et S au cours du second été en BDV</i> | 2.1.5 | |
| Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités R et S versus triplos | 2.2 | |
| Suite et Bilans | | |
| <i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i> | 2.2.1 | |
| <i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i> | 2.2.2 | |
| <i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i> | 2.2.3 | |
| <i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i> | 2.2.4 | |
| Comparaison <i>intra site</i> | | |
| <i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i> | 2.2.5 | |
| <i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i> | 2.2.6 | |
| Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment | | |
| <i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i> | 2.2.7 | |
| <i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i> | 2.2.8 | |
| <i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i> | 2.2.9 | |
| Sites de captage | | |
| <i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte R & S</i> | 2.2.10 | |
| <i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i> | 2.2.11 | |
| <i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREEA</i> | 2.2.12 | |
| WP4. Tests expérimentaux et/ou <i>in situ</i> pour s'affranchir du problème des mortalités estivales | | |
| "Amélioration" génétique | 4.1 | |
| <i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i> | 4.1.1 | |
| <i>Tetraploïdes R et S.....;voir 2.1.3</i> | | |
| Réduction des mortalités de juvéniles | 4.2 | |
| Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique) | | |
| <i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Ecloserie/Captage naturel ?)</i> | 4.2.1 | |
| <i>Prévenir les pertes en 1^{ère} année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i> | 4.2.2 | |
| <i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i> | 4.2.3 | |
| <i>Ecloserie-nurserie :</i> | 4.2.4 | |
| - <i>Nurserie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i> | | |
| - <i>Date de naissance et date de reproduction</i> | | |
| - <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i> | | |
| Réduction des mortalités d'adultes | 4.3 | |
| <i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2^{ème} année</i> | 4.3.1 | |
| <i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2^{ème} année</i> | | |
| <i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en Baie des Veys</i> | 4.3.2 | |
| <i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i> | 4.3.3 | |
| - <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i> | | |
| - <i>BDV Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i> | | |
| <i>Réduire les intrants des rivières (couvert végétal)</i> | 4.4 | |
| <i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i> | 4.5 | |

Calendrier d'exécution 2004

| WP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| WP 2 | | | | | | | | | | | | |
| WP 4 | | | | | | | | | | | | |

3 - Budget 2004

Autofinancement : contribution du CREAA au programme Morest en dépenses de fonctionnement. Les frais d'amortissement du matériel de navigation ne sont pas pris en compte. Pour la tâche 2.2.12, on considère que 50% environ des résultats du réseau (croissance et mortalité) vont concerner directement les problématiques de l'atelier Morest.

| CREAA | Temps personnel | |
|--------------|-----------------|-----------|
| | Cat. | H/mois/an |
| Tâche 2.2.12 | Cadre | 2.3 |
| | Technicien | 3.1 |
| Tâche 4.2.2 | Cadre | 0.3 |
| | Technicien | 0.7 |
| Total tâches | Cadre | 2.6 |
| | technicien | 3.8 |