SISA 46235
RAP276

Rapport d'activité 1996

du laboratoire

GENETIQUE, AQUACULTURE, et PATHOLOGIE

DRV / RA / GAP

La Tremblade

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

Tél. : 05 46 36 98 36

Fax. : 05 46 36 37 51

IFREMER

Rapport d'activité 1996

du laboratoire

GENETIQUE, AQUACULTURE et PATHOLOGIE

DRV / RA / GAP

La Tremblade

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

Tél. : 05 46 36 98 36

Fax. : 05 46 36 37 51

http : //www.ifremer.fr/gap/gap.htm

AVANT-PROPOS

Le laboratoire de ***G**énétique, **A**quaculture et **P**athologie (GAP)* de La Tremblade a été remanié au cours de l'année 1996. Appliquer depuis le mois de mai, cette restructuration n'est toujours pas officialisée car elle fait partie d'un vaste plan de réorganisation du Département des Ressources Aquacoles, elle devrait être entériné au début de l'année 1997.

Composé initiallement de 4 Unités de Recherche :

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

le laboratoire est désormais éclaté en trois laboratoires distincts:

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

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

OBJECTIFS ET PROGRAMMES

Objectifs

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

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

et de

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

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

Programmes

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

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

- Thème : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER COTIERE.

  Programme 2 : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

  Sous-programme 2 : Suivi des maladies des mollusques.

  ⇒ Contrôle de l'évolution des épidémies pour les maladies obligatoirement déclarables (Bonamiose et Marteiliose).

  ⇒ Etiologie des mortalités anormales survenant en bassins

ostréicoles, en écloseries ou nurseries.

⇒ Contrôle des produits destinés à l'exportation et à l'importation.

- Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

  Programme 3 : Santé des populations d'élevage.

  Sous-programme 1 : Mécanismes de défense.

  ⇒ Bonamiose et mécanismes cellulaires de défense.

  Sous-programme 2 : agents pathogènes et épidémiologie.

  ⇒ Pathologie à virus de type herpès.

  ⇒ Etude de la Marteiliose.

  ⇒ Etudes bactériologiques

  Programme 4 : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

  Sous-programme 1 : Ressources génétiques.

  ⇒ Acquisition et utilisation des marqueurs génétiques hypervariables chez les espèces marines.

  ⇒ Conservatoire de souches de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

  Sous-programme 2 : Amélioration & sélection de souches.

  ⇒ Sélection pour une résistance de l'huître plate *Ostrea edulis* à la bonamiose.

  ⇒ Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères physiologiques.

  ⇒ Obtention et testage de polyploïdes.

MOYENS ET EFFECTIFS

Personnel scientifique

De nouvelles modifications ont été enregistrées en cours d'année dans l'effectif du laboratoire. Yamama NACIRI-GRAVEN a pris un congé sans solde à partir du mois d'octobre, elle a été remplacée par Marc BARRE, généticien de formation. Le renforcement de l'équipe de pathologie s'est poursuivi avec l'arrivée en septembre 1996 d'Anne THEBAULT (vétérinaire) au poste de cadre de la cellule de veille zoosanitaire. Quant à l'équipe de génétique, elle a accueilli Emmanuel GOYARD (cadre zootechnicien) qui va suivre une formation interne en génétique complétée par une formation CSAGAD.

Responsable	**André GERARD**	IFREMER
Cadres	**Franck BERTHE**	IFREMER
	Pierre BOUDRY	IFREMER
	Claude DELSERT	GIE/RA
	Emmanuel GOYARD	GIE/RA (1/09/96)
	Yamama NACIRI-GRAVEN	GIE/RA
	(remplacée par Marc BARRE)	CDD GIE/RA (1/10/96)
	Tristan RENAULT	GIE/RA
	Anne THEBAULT	IFREMER (1/09/96)
Techniciens	**Nathalie COCHENNEC**	IFREMER
	Bruno CHOLET	IFREMER
	Philippe HAFFNER	IFREMER
	Serge HEURTEBISE	IFREMER
	Christophe LEDU	GIE/RA
	Pascal PHELIPOT	GIE/RA
Doctorants	**Bertrand COLLET**	IFREMER/CNRS
	Sophie LAUNEY	IFREMER/région PC
	Quinggang XUE	IFREMER/UBO/CROUS
Post-doctorants	**Rose-Marie LE DEUFF**	IFREMER/région PC
	Marc OHRESSER	URM 16 Sète

Personnel administratif et logistique

Le laboratoire ne peut fonctionner efficacement sans une aide administrative et logistique. Ce soutien est assuré par du personnel affecté directement au laboratoire pour le secrétariat, la comptabilité et la bibliothèque, ou, par du personnel rattaché au chef de station et mis à disposition des équipes de recherche pour l'entretien et la logistique.

Secrétariat et comptabilité

Yvette SIMIAN assure le secrétariat et la gestion des missions du chef de station et du laboratoire GAP.

Martine GRASSET assure la comptabilité du laboratoire GAP et des comptes logistiques de la station.

Sylvie TAILLADE a assuré la gestion des comptes communs du GAP jusqu'à la fin de l'année, ces comptes seront pris en charge par Martine GRASSET en 1997.

Bibliothèques

Florence ALBERT-RIVET assure l'organisation des bibliothèques et l'ensemble de la documentation des deux implantations de La Tremblade. Ce travail se fait en étroite collaboration avec les bibliothèque de Nantes (Michelle l'EXCELLENT et Annick RADENAC) et de Brest (Gilles CHATRY).

Entretien et logistique

Emile PLANCHE assure l'entretien des bâtiments et plus particulièrement celui des circuits hydrauliques. Il participe activement à tous les travaux d'amélioration des installations aquacoles.

Ginette CAILLETEAU assure pour le GAP l'entretien des bacs d'élevage, la gestion des commandes et du matériel.

Stagiaires

BIRAUD Valérie (Maîtrise de Génie Informatique, Institut Universitaire Professionnalisé, La Rochelle. 5 mois) "Application de reconnaissance et de comptage par imagerie numérique des différents types hémocytaires présents dans l'hémolymphe de l'huître plate, *Ostrea edulis"*.

CARRON Laurence (Licence-Université Paris VI) stage d'un mois sur le "diagnostic des maladies des bivalves marins".

CORNETTE Florence (CEMPAMA Beg Meil Fouesnant, 3 mois), "Identification de marqueurs moléculaires discriminant *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas"*. Certificat de spécialisation en aquaculture.

FLASSCH Aurélie (Licence-Université Orsay) stage d'un mois sur le "suivi d'élevages de bivalves marins".

HÖLL Katia (INTECHMER Cherbourg, 4,5 mois). "Evaluation du polymorphisme de deux populations d'huître plate : *Ostrea edulis* sélectionnées pour une résistance au parasite : *Bonamia ostreae"*.

MORAND Bérénice (DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières", Université de Caen, 5 mois). "Etude de la variabilité de croissance d'une population d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* : bases génétiques".

PARTHUISOT Nathalie (Post DUT Lycée Saint Louis Bordeaux, 4 mois) "Infestation des hémocytes par le parasite *Bonamia ostreae* : cytologie comparative *in vitro*".

RODRIGUEZ David (Universite Blaise Pascal Clermont Ferrand II. 4 mois) "Essais d'outils pour le typage des parasites du genre *Marteilia*". Maîtrise de Biologie Cellulaire

SEVERIN Patricia (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole, 4 mois). "Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpès de l'huître creuse, *Crassotrea gigas* : diagnostic et applications expérimentales".

- 7 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Conservatoire de souches, Elevages larvaires, Physiologie, Manipulation des agents pathogènes des mollusques marins sans rejet en mer),
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire de biométre et une salle informatique,
- 1 laboratoire de physiologie pour le CREMA l'Houmeau et l'URAPC,
- 8 annexes techniques (Local des pompes, Local du chlorodoseur, Local du transformateur électrique et de l'onduleur, Local compresseurs et commandes électriques, Chaufferie, Groupe électrogène, Garage, Atelier).

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

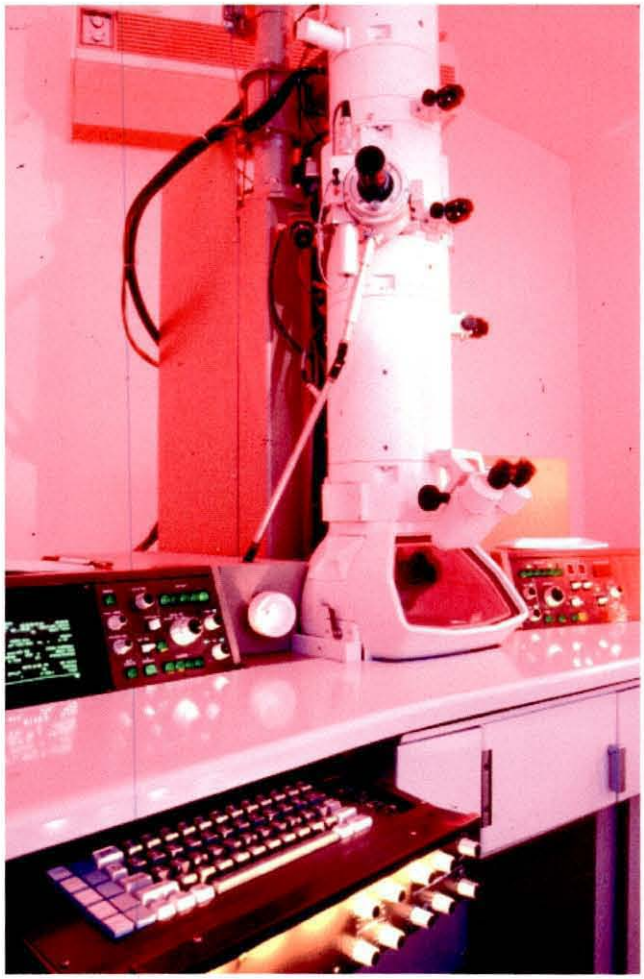
- 4 bassins de 300 m^3 de réserve d'eau de mer,
- 23 pompes de 10 à 300 m^3/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet,
- 4 bassins de 20 m^3 pour la production en masse de phytoplancton.

Matériel

Le matériel scientifique principal est constitué par :

- 1 microscope électronique JEOL JEM 1200 EX,
- 9 microscopes dont deux équipés en épifluorescence,
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers un ordinateur pour les mesures de croissance larvaire,
- 1 analyseur d'images SAMBA ™ 2005 d' Alcatel TITN ANSWARE avec un logiciel dédié à l'analyse de la ploïdie et un logiciel dédié à l'analyse des gels d'électrophorèse,
- 1 dispositif vidéo couleur composé d'une caméra 3-CCD, d'un moniteur haute résolution, d'une imprimante vidéo couleur UP-5000, d'un enregistreur photo MAVICA, et d'un magnétoscope médical SONY SVO-9500MDP. Ce matériel facilite grandement l'étude du développement embryonnaire en microscopie à épifluorescence dans le cadre des programmes de cytogénétique. Il permet également l'archivage d'images de toute sorte : développements embryonnaires, élevages larvaires...
- matériel de biologie moléculaire : appareils PCR, 1 scintillateur Packard, microcentrifugeuse de paillasse, Speed Vac, générateurs, séquenceur manuel, sécheur de gel... pour les études de marqueurs génétiques, la mise au point d'outils de diagnostic en pathologie, le séquençage d'ADN...
- matériel d'histologie : 1 cryotome JUNG, 1 automate LKB à déshydratation et imprégnation des pièces histologiques, 1 platine inclusion paraffine pour pièces histologiques LKB,
- 1 ultracentrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse JOUAN CR 4-11,
- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton, 1 congélateur -80°C, 1 étuve CO_2 FORMA SCIENTIFIC, 3 étuves MEMMERT, 2 autoclaves,
- 1 lecteur ELISA, matériel électrophorèse (cuve et générateurs),
- matériel informatique : 1 station réseau éthernet et internet SUN, 10 ordinateurs de bureau en réseau et 5 ordinateurs d'acquisition de données dont un dispositif d'acquisition d'images numériques des gels d'électrophorèse permettant de traiter les images en tout point du laboratoire via le réseau informatique.

PLANCHE 1



Microscope électronique

Détermination du taux de ploïdie par analyse d'images.

PHOTOS MARC RAPPILLARD

PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1996

Thème : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER COTIERE.

Programme : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

Sous-programme : Suivi des maladies des mollusques.

Suivi zoosanitaire et mortalités

Rappel des objectifs :

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

- contrôler l'évolution des épidémies pour les maladies obligatoirement déclarables,
- connaître l'étiologie des mortalités anormales et apprécier l'importance de l'infection lorsqu'un agent pathogène est en cause,
- déterminer les espèces qualifiées de porteurs sains,
- contrôler les produits destinés à l'exportation et à l'importation, aussi bien entre les pays de l'Union Européenne qu'avec les pays tiers.

Résultats 1996.

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

550 coquillages provenant des zones 4, 5 et 6 ont été examinés sur l'ensemble de l'année 1996 par différentes techniques : 304 analyses sur coupes histologiques et 246 analyses sur appositions d'organes :

- sur huître plate *(Ostrea edulis)* : dans le cadre de la législation Européenne (directive 91/67 CE), 432 analyses ont été réalisées (186 coupes histologiques et 246 frottis d'organe). 48 individus infectés par le parasite *Bonamia ostreae* ont été observés.
- sur moule (*Mytilus edulis)* : 30 individus provenant de Vendée ont fait l'objet d'une analyse en histologie.
- sur palourde japonaise *(Ruditapes philippinarum)* : 58 individus provenant de Vendée ou d'Arcachon ont fait l'objet d'une analyse en histologie. Huit animaux provenant d'Arcachon ont montré la présence de *Perkinsus atlanticus*.
- sur coque (*Cerastoderma edule)* : 30 individus provenant de Charente Maritime ont fait l'objet d'une analyse en histologie.

Analyses sur des cas de mortalité d'huître creuse et d'huître plate.

Des analyses en PCR pour la recherche de virus de type herpès ont été effectuées sur des échantillons des secteurs de Marennes-Oléron et de la Baie de Bourgneuf (57 lots).

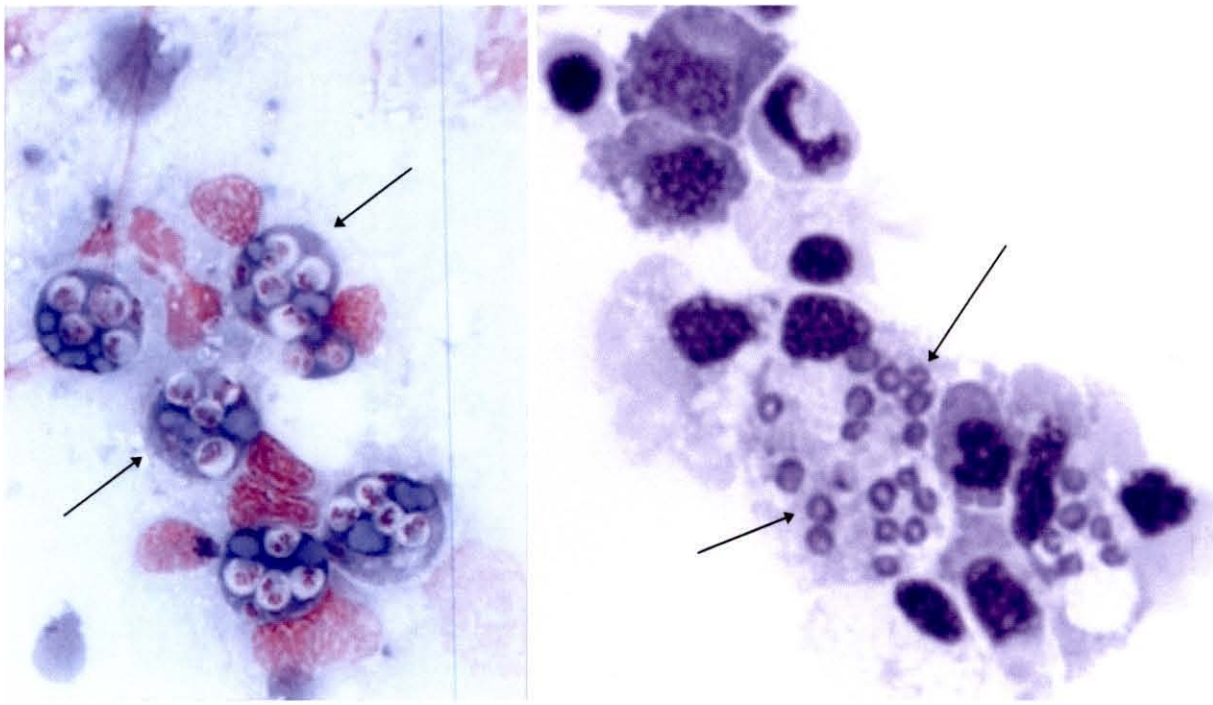
Les résultats obtenus pour les lots de naissain tendent à confirmer la corrélation entre mortalité et détection possible d'ADN viral par PCR, bien que l'on trouve toujours des échantillons à fortes mortalités se révélant négatifs par PCR. Pour les mortalités observées sur animaux adultes (banc de Ronce les Bains), il n'a pas été possible de détecter le virus par PCR.
Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant 40 lots analysés, elle montre de manière significative qu'il existe une forte corrélation entre mortalité et détection d'ADN viral par la technique de PCR. Ces résultats ne permettent en aucun cas de conclure à une relation de cause à effet entre mortalité observée et détection possible d'ADN de virus de type herpès par la technique de PCR. Seuls les essais de reproduction expérimentale de l'infection virale qui sont en cours au laboratoire de La Tremblade permettront de trancher et de savoir si le virus de type herpès peut être ou non un agent causal de mortalité. De plus, il est important de rappeler que nous avons utilisé des valeurs de pourcentages de mortalité pour réaliser des comparaisons, mais que ces valeurs correspondent à une donnée ponctuelle dans le temps et que par ailleurs, leur source n'est pas toujours identique (professionnels, laboratoires préleveurs, comptage à réception des échantillons au laboratoire de La Tremblade).

Analyses sur des cas de mortalité d'huître creuse et d'huître plate.

118 individus originaires de divers pays ont fait l'objet d'une analyse en microscopie photonique. Ces analyses ont concernées cinq espèces différentes : 30 *Crassostrea rizophorea (*Nouvelle Calédonie*)*, 25 *Ostrea edulis* (Danemark*)*, 28 *Crassostrea gasar* (Sénégal), 32 *Saccostrea commercialis* (Australie*)*, 15 *Crassostrea rivularis* (USA). Les analyses effectuées n'ont pas permis de mettre en évidence d'agents pathogènes particuliers.

PLANCHE 2

Préparation des échantillons d'huîtres et lecture des lames histologiques au microscope.



Clichés en microscopie photonique (x1000).
Apposition de glande digestive d'huître infectée par *Marteilia refringens* (à gauche).
Apposition de tissu cardiaque d'huître infectée par *Bonamia ostreae* (à droite).

Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Mécanisme de défense.

Bonamiose

Rappel des objectifs.

Les objectifs de ce programme pour l'année 1996 étaient les suivants :

- soutien au programme de sélection d'huîtres plates résistantes ou tolérantes à la bonamiose,
- étude du mécanisme cellulaire pouvant être impliqué dans la résistance des huîtres vis à vis de la bonamiose,
- développement d'outils de diagnostic spécifiques du parasite *Bonamia ostreae*.

Résultats 1996.

Sélection d'animaux résistants

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

⇒ la mise en place, au laboratoire, d'un stock d'animaux fortement infectés,

⇒ la purification de ce parasite et l'inoculation des huîtres (géniteurs et lignées sélectionnées) pour la reproduction expérimentale de la bonamiose,

⇒ le suivi par analyse sur frottis des différents lots expérimentaux.

L'année1996 a représenté un travail important, dans la mesure où plus de 1500 animaux ont été inoculés et fait l'objet d'un suivi régulier.

Etude des mécanismes de défense.

Dans ce cadre, **des études comparatives des populations hémocytaires** des animaux sensibles et sélectionnés ont été réalisées par comptage des différents types hémocytaires. Cette dernière approche indique que la population des cellules agranuleuses est significativement plus faible chez les huîtres sélectionnées. Cette étude a permis de détecter une corrélation significative entre cette numération et le statut de résistance à la bonamiose. Si ces résultats sont confirmés, Il sera possible d'envisager l'utilisation de cette technique comme marqueur de sélection pour le choix des géniteurs.

Des expériences de **séparation des hémocytes** d'huître plate, *Ostrea edulis*, ont été réalisées, à partir d'hémocytes totaux en suspension dans une solution d'Alsever (anti-agrégante). Les protocoles utilisés correspondent à des séparations effectuées sur gradients de saccharose, de Percoll et de Ficoll. Aucune fraction cellulaire n'est obtenue sur gradients de saccharose. Les gradients de Percoll utilisés permettent de séparer les cellules granuleuses des cellules agranuleuses. Cependant, une étape supplémentaire (gradient de Ficoll) est nécessaire pour séparer les sous populations de cellules agranuleuses : les grandes cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes.

Les **contenus enzymatiques d'hémocytes** provenant d'animaux sains et d'animaux parasités, ainsi que ceux des populations séparées ont été déterminés à l'aide de galeries API ZYM (BioMérieux). Cette technique permet d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques. Au total, 16 activités enzymatiques identiques ont été détectées dans les hémocytes totaux provenant d'animaux sains et parasités. Pour les populations cellulaires séparées, 13

activités enzymatiques indentiques sont observées chez les cellules granuleuses et les grandes cellules agranuleuses. Cependant, globalement, l'intensité de ces activités est plus forte pour les cellules agranuleuses que pour les granulocytes (dégranulation : relargage de molécules dans l'hémolymphe). Par ailleurs, 4 enzymes ont été recherchées en microscopie photonique sur empreintes cardiaques, sur préparations cytocentrifugées d'hémocytes provenant d'animaux sains et parasités par *Bonamia ostreae*. Les 4 activités enzymatiques recherchées ont été observées dans les granulocytes et sont absentes des grandes cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes. Enfin, 3 activités enzymatiques ont été recherchées en microscopie électronique à transmission sur hémocytes provenant d'huîtres infectées. Deux de ces activités ne sont observables que dans les granulocytes, la troisième étant détectée pour les trois types cellulaires. Les résultats ainsi obtenus montrent qu'il est possible de détecter un plus grand nombre d'activités enzymatiques dans les cellules granuleuses. En particulier, ce type de cellule est riche en phosphatases acides.

Une **étude *in vitro* de la viabilité, du comptage cellulaire et une comparaison de la répartition des types cellulaires** au cours du temps entre hémocytes provenant d'huîtres saines et d'huîtres parasitées a été réalisée. Des différences sont observables entre cellules obtenues à partir d'individus infectés et d'individus sains. En effet, il est possible de noter un nombre constant de cellules par puits pour le groupe des hémocytes "sains" sur une période de 15 jours, alors que dès le deuxième jour de culture, une diminution du nombre de cellules est détectée pour les hémocytes "parasités". Parallèlement, pendant la durée de l'expérience, la mortalité analysée quotidiennement n'excède pas 10% pour les hémocytes "sains", alors qu'elle atteint plus de 40% pour le groupe des cellules provenant d'animaux infectés. Cette différence de comportement est associée à une diminution du nombre de cellules agranuleuses pour le groupe des hémocytes obtenus à partir d'huîtres parasitées.

Méthodes de diagnostic

Des anticorps polyclonaux ont été obtenus, par immunisation d'animaux de laboratoire (souris), à partir de différents polypeptides séparés en SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices. Des travaux ont été réalisés afin de préciser leur spécificité. Ainsi, une seule des ascites obtenues montre une réactivité en Western blotting sur certains polypeptides parasitaires. Cette même ascite permet d'observer un marquage membranaire et cytoplasmique par la technique de détection à l'or colloïdal, ainsi qu'un marquage net en immunoperoxydase des parasites sur coupes de tissu parasité fixé au Carnoy.

Identification d'un agent pathogène

Dans le cadre de la constitution d'un conservatoire de populations d'huîtres creuses maintenues dans la salle de quarantaine du laboratoire de La Tremblade, des analyses histologiques ont été réalisées sur une espèce exotique (*Crassostrea rivularis)*. Un parasite de type *Bonamia* a été identifié en microscopie optique sur plusieurs huîtres mortes. Ce parasite a pu être purifié et une description en microscopie électronique a permis de confirmer son appartenance au genre *Bonamia*.

L'obtention de parasites purifiés a permis également de comparer les profils électrophorétiques, de tester l'anticorps polyclonal de *Bonamia ostreae* et de comparer le polymorphisme de fragments de restriction. Les résultats de ces études semblent indiquer que cette espèce *C. rivularis* est sensible au parasite *Bonamia ostreae*.

Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Agents pathogènes et épidémiologie.

Pathologie à virus de type herpès

Rappel des objectifs.

Un virus de type herpès est observé chez les huîtres depuis 1991. Des progrès déterminants ont été réalisés en 1995 grâce à la mise au point d'un protocole de purification du virus. En 1996, les objectifs de ce programme étaient :

- la mise au point d'un protocole de PCR pour rechercher l'ADN viral,
- son utilisation pour analyser des échantillons d'huîtres,

la reproduction expérimentale de l'infection virale au stade naissain.

Résultats 1996.

Les travaux concernant le virus de type herpès observé chez les huîtres, ont abouti au développement d'une technique de diagnostic de l'infection virale par PCR. Le séquençage partiel de fragments clonés entrepris en 1995 a permis de définir des zones propices à la construction de couples d'amorces pour la PCR. Nous disposons à l'heure actuelle d'amorces qui nous permettent d'obtenir une amplification sur ADN viral purifié, sur ADN extraits de larves virosés, sur broyats de larves et de naissains infectés.

Mise au point d'un protocole de PCR et essais d'optimisation.

Différents paramètres ont été testés afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité du diagnostic de l'infection à herpèsvirus par PCR. Les essais ont porté sur la recherche d'un effet inhibiteur des surnageants de broyats de naissain sur la réaction de PCR, d'un effet inhibiteur des produits de PCR1 sur la réaction de PCR2, sur les quantités d'ADN polymérase à utiliser, sur le nombre de cycles d'amplification ainsi que sur la définition d'un témoin positif correspondant au seuil de sensibilité de la méthode.

La technique de PCR a pu ainsi être optimisée, elle permet désormais d'obtenir une sensibilité équivalente à la détection de 2500 copies de génomes viraux par tube de PCR, dans des échantillons de naissain (détection de $5x10^6$ génomes viraux avec le protocole de l'an passé).

Essais de reproduction de l'infection virale

Divers essais ont été menés au cours de l'année 1996, afin de reproduire la maladie au laboratoire. Il a été ainsi possible de reproduire comme les années précédentes, l'infection chez des larves axéniques par inoculation dans les ballons d'élevage de broyats de larves infectées. Ce résultat montre qu'il est possible, grâce à la congélation de matériel virosé, de reproduire la maladie à tout moment.

- Sur naissain d'huître creuse

Des essais d'infection de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été réalisés par balnéation en présence de larves d'huître creuse infectées vivantes, produites expérimentalement. De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites dans les tissus larvaires et sont libérées dans le milieu extérieur, à mesure que l'infection des larves se poursuit.

Ces expériences ont été conduites dans quatre bacs contenant du naissain, deux bacs étant inoculés avec des larves vivantes infectées, les deux autres avec des larves vivantes saines (témoin). Les huîtres mortes ont été analysées

individuellement en PCR, des contrôles en histologie ont été réalisés sur quelques animaux positifs afin de confirmer ou d'infirmer les résultats. L'analyse statistique indique que les différences observées dans les taux de mortalité et les résultats de PCR sont significatives entre bacs expérimentalement infectés et bacs témoins.

Il apparaît, d'après les résultats de ces expériences, que l'utilisation de larves infectées vivantes permet de reproduire expérimentalement l'infection au stade naissain. Cette infection est associée à des mortalités significatives.

- Sur larves de palourde japonaise

Des essais d'infection expérimentale de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, par le virus de type herpès ont été réalisés. Des mortalités concomitantes de larves de palourde japonaise et d'huître creuse avaient été observées en 1991, en écloserie. Le virus de type herpès avait alors été détecté dans les larves d'huître creuse, les larves de palourdes n'ayant pas été analysées lors de cet épisode de mortalité.

Des larves de palourde âgées de huit jours (J8) fournies par une écloserie privée ont été mises en contact à J9 avec des larves vivantes d'huître creuse axéniques et infectées. Les résultats des analyses PCR semblent indiquer une "disparition" progressive de l'ADN viral présent dans les larves et, de façon plus tardive, dans l'eau d'élevage. Ce phénomène est interprété comme le reflet de l'évolution de l'infection dans les larves d'huître infectées (l'inoculum), plutôt que comme celui de l'infection des larves de palourde. L'analyse des échantillons en microscopie électronique à transmission ne révèle aucune anomalie caractéristique de l'infection à virus de type herpès chez les larves de palourde.

En conclusion, l'infection à virus de type herpès n'a pas pu être reproduite chez les larves de *R. philippinarum*, dans les conditions expérimentales choisies. Les mortalités et les lésions nucléaires observées pourraient éventuellement correspondre à une toxicité de l'inoculum (larves d'huîtres infectées).

Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès dans le cadre du protocole SMIDAP / IFREMER (Pays de Loire)

Des analyses pour les prélèvements de Pen Bé le 03/07/96 ont été réalisées alors que la sensibilité de la technique de PCR n'était pas optimale (seuil de sensibilité : détection de $5x10^6$ copies de génome viral pour les échantillons de naissain).

Globalement, au vu des résultats de ces analyses et des pourcentages de mortalité, trois grandes tendances se dessinent.

- Certaines familles ont dès le début du mois d'août 96 montré de forts pourcentages de mortalité (globalement supérieurs à 40%) quels que soient les sites de mise en élevage. Le comptage final du taux de survie, réalisé fin septembre 1996 montre que toutes ces familles ont subit de fortes mortalités Un nombre important d'analyses positives en PCR (36%, 31% et 34%), quels que soient les sites ont été enregistrées.

- Une autre famille présente un comportement un peu différent. En effet, quel que soit le site, le pourcentage de mortalité cumulée pour ces animaux, n'a pas dépassé 44% fin septembre 1996. Toutefois une détection précoce d'ADN viral a été possible dès le début du mois d'août 1996 avec des mortalités observées à cette date, ces mortalités restant cependant limitées.

- Les trois dernières familles quant à elles n'ont pas subit de phénomène de mortalité début août (moins de 5% quels que soient les familles et les sites), puis ont évolué différemment en fonction des sites sur lesquels elles étaient en élevage. En effet, on constate sur un site, une faible évolution des mortalités jusqu'à la fin du mois de septembre 1996 (moins de 15%), ainsi que des

analyses PCR dont seul un petit nombre est positif. Par contre, pour un autre site, une évolution notable des mortalités a été observée. En fin d'expérience, les mortalités cumulées sont supérieures à 41% pour trois familles. Or, il est survenu sur premier site, où sont implantées ces familles, une dégradation de la qualité du milieu naturel (présence à forte concentration de *Gymnodinium*). A partir de ce phénomène, les taux de mortalité ont fortement augmenté (jusqu'à 75%). Cependant, les analyses sur ces animaux n'ont révélé que très peu d'échantillons positifs en PCR pour la recherche d'ADN viral (0+ / 30, 1+ / 54 et 0+ / 28). Pour ces familles, l'apparition de fortes mortalités est plus tardive. Elle est observée uniquement sur certains sites d'élevage et non associée de façon systématique à la détection d'ADN viral par PCR.

Il est possible d'émettre l'hypothèse que selon l'origine des animaux, le comportement vis à vis de l'infection à virus de type herpès n'est pas identique. En effet, les trois types de comportements observés (cf. paragraphes précédents) tendent à montrer que certaines familles semblent être plus atteintes par l'herpèsvirus, ce qui provoquerait des phénomènes de mortalité différentiels. Dans un second temps, il semble que le site d'élevage ainsi que les conditions environnementales peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de phénomènes de mortalité. Il est possible, par exemple, d'observer de fortes mortalités pour les animaux issus d'une famille sur un site donné et de faibles mortalités pour la même famille sur un autre site.

Marteiliose

Rappel des objectifs.

Les deux principaux axes de recherche étaient :

1- l'étude du cycle de *Marteilia refringens* parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*,

2- les affinités taxonomiques des parasites du genre *Marteilia* observés chez les mollusques bivalves.

Résultats 1996.

Cycle de Marteilia refringens

Dans le cadre de l'étude CEE 94/C 85/13 (study contract on the transmission of the pathogenic agents *Bonamia ostreae* and *Marteilia refringens*), divers essais de contamination d'animaux sains ont été effectués en conditions expérimentales ou naturelles. Les résultats de ces essais montrent la nécessité d'un compartiment naturel pour qu'une contamination soit possible. Ces résultats, ainsi que les travaux précédents sur le sujet, ont conduit le groupe européen d'étude à poser l'hypothèse de l'existance d'un hôte intermédiaire dans le cycle du parasite *Marteilia refringens*, ou d'une phase de maturation en milieu extérieur.

La confirmation de cette hypothèse nécessite de disposer d'une part d'un outil de diagnostic du parasite, sensible et indépendant de son stade de développement, et d'autre part, de pouvoir étudier la maladie en milieu naturel circonscrit.

L'amplification en PCR d'un fragment de 900 paires de bases a été réalisée à partir des travaux antérieurs de V. Lubat. Les spécifités de l'amplification et du fragment amplifié ont été vérifiées par PCR et dot-blot. Le clonage puis le séquençage partiel de ce fragment ont permis de dessiner deux couples d'amorces en vue de l'amplification en deux temps de ce fragment (nested PCR). Ces amorces permettent une amplification spécifique du génome du parasite *Marteilia refringens* avec une grande sensibilité et constituent donc un outil potentiel d'étude du cycle du parasite.

Deux bassins à fond naturel de type "claire" (installations de la station de La Tremblade, et CREAA) ont été étudiés du point de vue d'une contamination possible par le parasite. Ces deux claires constituent des sites intéressants pour la recherche d'hôtes intermédiaires potentiels.

Taxonomie des parasites du genre Marteilia observés chez les mollusques

bivalves.

Différentes méthodes de typage ont été essayées, notamment, en polymorphisme de restriction d'un fragment amplifié en PCR (gène codant pour l'ARN 18S), et southern blotting avec une sonde spécifique du parasite (Mab2). Ces essais n'ont pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants dans la mesure où :

* le séquençage du produit d'amplification des gènes rRNA à l'aide d'amorces universelles a démontré la possible contamination par l'ADN de l'hôte,

* les données bibliographiques relatives à la sonde Mab2 n'ont pas pu être confirmées à ce jour.

Les contaminations de l'ADN extrait des fractions purifiées de *Marteilia,* par l'ADN de son hôte (*O. edulis*) pourraient être expliquées par la difficulté de purifier sur gradients un parasite d'une telle variabilité de taille et de densité. Un protocole de purification du parasite basé sur son affinité avec l'anticorps monoclonal 4/1-1 est en cours d'établissement. Cet anticorps a été caractérisé en immunohistochimie, western-blotting, et apparait comme membranaire. Les premiers essais en milieu liquide en font un bon candidat pour une technique d'immunopurification.

Etudes bactériologiques

Rappel des objectifs.

L'objectif principal de l'année 1996 était de redémarrer la pathologie bactérienne à La Tremblade en soutien aux activités des écloseries-nurseries de mollusques et ponctuellement aux programmes crevettes développés à Tahiti ou en Nouvelle-Calédonie.

Résultats 1996.

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

Dans le cadre d'épisodes de mortalité massive en écloserie/nurserie, une étude préliminaire des flores bactériennes associées a été menée. Des isolements à partir de naissains, de larves de *C. gigas* et d'eau d'élevage ont été réalisés sur milieux gélosés (Marine Agar, TCBS). Les colonies macroscopiquement différentes ont été caractérisées phénotypiquement, conduisant à l'identification des souches correspondantes. Un groupe de souches du genre *Vibrio* a été associé à des épisodes de mortalité. Les essais de reproduction expérimentale de mortalité à l'aide de ces souches pures inoculées à des larves, axéniques et conventionnelles ont permis de rapprocher leur virulence de celle de la souche S322 isolée par J.L Nicolas et inclue dans cette étude. Les résultats de cette étude préliminaire ne sauraient être cités sans faire référence à la détection positive en PCR d'ADN d'herpès virus sur les mêmes échantillons biologiques.

Identification de souches bactériennes du genre Vibrio par hybridation quantitative ADN/ADN.

Cette étude avait pour objectif de :

1- préciser les relations génomiques du groupe de souches *Vibrio*-Nouméa1 avec l'espèce *V. penaeicida*,

2- confirmer l'appartenance des souches du groupe Nouméa2 à l'espèce *V. nigripulchritudo*.

Cette étude était motivée par l'impossibilité d'une identification phénotypique satisfaisante des germes impliqués dans le Syndrome 93, le caractère particulièrement virulent du groupe Nouméa 1, et enfin, la proximité phénotypique des groupes Nouméa 1 et 2.

En ce qui concerne le premier point : compte tenu des résultats des précedentes expériences (pourcentages d'hybridation compris entre 60 et 80%), il a été choisi

d'utiliser pour cette nouvelle série d'hybridations la méthode S1/TCA, au lieu de la méthode sur filtre DE81, précédemment utilisée. Les hybridations ont été réalisées avec les ADN des souches AM23 et SV1 (Noumea1) contre l'ADN de la souche type de *V. penaeicida* marqué (sonde radioactive). Les résulats sont respectivement de 83 et 88% d'hybridation (Delta Tm de 2 et 1.8 soit <5) pour AM23 et SV1. Ces souches peuvent donc être identifiées comme *Vibrio penaeicida*. Les ribotypes des souches Nouméa1 les diffèrent des souches japonaises inclues dans la précédente étude (KH1T et KA13), d'autre part, les premiers résultats d'hybridation pouvaient laisser croire à l'existance d'une sous espèce. Cependant, les hybridations ADN/ADN avec la méthode S1/TCA confirment l'appartenance des souches Nouméa1 à l'espèce génomique *penaeicida*.

En ce qui concerne les souches du groupe Nouméa2 : les hybridations ont été réalisées avec les ADN des souches AM100, SO27 et SO65 (Noumea2), ainsi que *V. nigripulchritudo*T et *V. penaeicida*T, contre l'ADN de la souche type de *V. nigripulchritudo*T marqué (sonde radioactive), méthode S1/TCA. Les résulats sont respectivement de 90, 93, 98% pour AM100, SO27 et SO65 ; et 19% et 100% d'hybridation contre *V. penaeicida*T et *V. nigripulchritudo*T. Ces résultats confirment l'appartenance du groupe Noumea2 à l'espèce génomique *V. nigripulchritudo*.

Gènes et vecteurs d'expression

Rappel des objectifs.

Seconde année du programme européen intitulé: "Development of mussel-specific expression vectors suitable for transgenic organisms: Implication in the establishment of mollusc continuous cell lines. (contrat AIR3.94.CT-2487), qui consiste à développer la biologie moléculaire de la moule afin de faciliter l'obtention de lignées cellulaires.

Résultats 1996.

Obtention de vecteurs d'expression chez la moule.

- Isolement, clonage et caractérisation de cinq gènes d'actine de moule, *mac 1* à *mac 5*.

- Identification et clonage des régions promotrices des cinq gènes *mac-1* à *-5* .

- Construction de différents types de vecteurs d'expression spécifiques de la moule portant un gène rapporteur et contenant :

  - les régions promotrices et leur activateur naturel.
  - les régions promotrices délétées de leur activateur naturel.
  - une substitution par un activateur du virus SV40

- Construction d'un vecteur d'expression d'un oncogène (l'antigène T de SV40) en vue de la transformation de cellules de mollusque.

Analyse de la spécificité des promoteurs des gènes mac-1 à -5 selon les tissus et le stade développement.

Ce travail utilise l'hybridation *in situ* sur des coupes de tissus d'adulte (M. Comps, station de Palavas) et l'analyse d' ARN isolés d'animaux en cours de développement à différents stades larvaires (A. Flasch, stage de licence) par la technique de PCR quantitative.

Les résultats de ce travail montrent une régulation différentielle de l'expression des promoteurs des gènes *mac-1* à *-5* au cours du développement larvaire.

Test diagnostic dans le complexe d'espèces de la moule (M. edulis ; M. galloprovincialis).

L'analyse du gène *mac-1* a révélé l'existence de trois formes alléliques différant par un polymorphisme de taille de l'intron 1.

L'allèle *mac-1b* est présent uniquement chez *M. galloprovincialis* tandis que *mac-1a* et *mac-1c* sont deux allèles présents à des fréquences différentes chez *M. galloprovincialis* et *M. edulis*. Ce travail, réalisé en collaboration avec P. Borsa (ORSTOM), est soumis pour publication.

Ce travail a été réalisé en partie par M. Ohresser, dans le cadre d'un post-doctorat sur un CDD (9 mois) financé par le contrat AIR3.CT.94-2487. Ce programme a pu se dérouler de façon satisfaisante, en dépit de conditions matérielles peu propices, en particulier grace à l'aide importante du Centre de Recherche en Biochimie des Macromolécules (CRBM) du CNRS à Montpellier.

Encéphalite du loup

Rappel des objectifs.

Ce programme avait pour but de définir les caractéristiques fondamentales du virus de l'encéphalite du loup. Débuté en 1994, il s'achève de façon très satisfaisante puisque les résultats obtenus ont permis des applications en matière de diagnostic et de vaccin.

Résultats 1996.

Analyse de la séquence de l'ARN2.

La séquence de l'ARN génomique du virus l'encéphalite du Loup a révélé des similitudes avec d'autres nodavirus de poisson et des divergences fondamentales avec les nodavirus d'insecte :

- Deux protéines de capside plus courtes que chez les nodavirus d'insecte.
- Ce doublet de protéines est synthétisé non par protéolyse autocatalytique mais par modification co-traductionnelle.
- Implication sur le mode d'assemblage de la capside qui est fondamentalement différent de celui des nodavirus d'insecte.

Etude du cycle viral et de la permissivité dans les cellules de mammifères et de poissons.

Puisqu'il n'existait pas de culture cellulaire permissive aux nodavirus de poissons, différentes lignées cellulaires ont été testées quant à leur degré de permissivité. L'identification d'une lignée cellulaire autorisant une semi-permissivité du cycle viral a permis de mettre en évidence de nouvelles caractéristiques de ce virus.

Les principales conclusions de ce travail sont :

- l'expression des protéines de capside dans les cellules de mammifère mais sans que l'ARN génomique ne s'y réplique ou que des particules virales ne s'y assemblent.
- Nous avons mis en évidence pour la première fois, la réplication du virus dans une lignée cellulaire de poisson. Ceci a été montré par la détection de la forme négative de l'ARN génomique et d'un produit de réplication sous-génomique. De plus, nous avons mis au point un test de titration qui permet de mesurer l'amplification de l'inoculum viral dans ces mêmes cellules.

Il ressort de notre étude que bien que le nodavirus du loup possède les caractéristiques fondamentales de la famille des Nodaviridae, son mode d'assemblage et ses étroites spécificités de tissus et d'hôtes, le distinguent clairement des nodavirus d'insectes. Ces résultats devraient contribuer à la naissance d'un nouveau groupe systématique au sein de la famille des Nodaviridae.

Ce travail a été poursuivi grace à un important soutien du CRBM (CNRS).

Applications

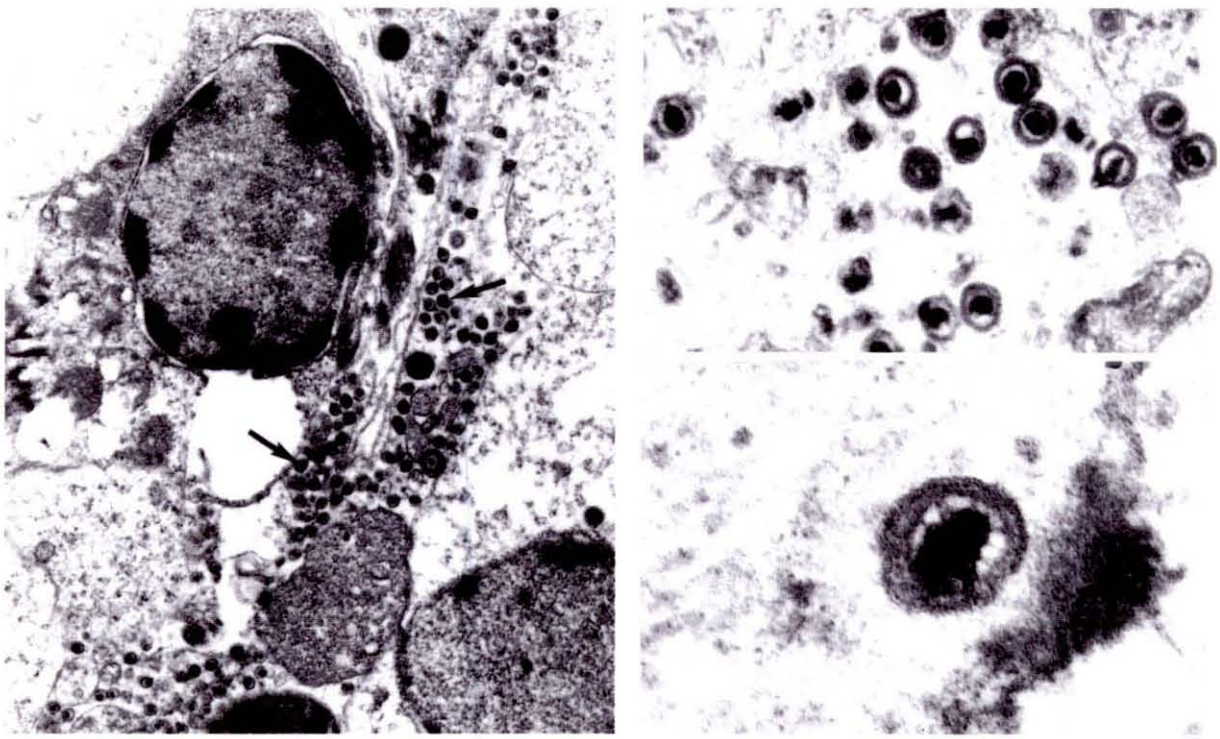
- Diagnostics : les diagnostics que nous avons mis au point au cours de cette étude sont en cours de transfert vers une société qui les mettra à disposition de la profession. Le laboratoire de pathologie de la station de Palavas-les-Flôts, en collaboration avec le CNEVA, après formation à ces techniques, utilisera ces diagnostics en vue d'une étude épidémiologique.
- Vaccin : l'expression de la protéine de capside du nodavirus dans des bactéries, a permis d'envisager la réalisation d'un vaccin contre l'encéphalite. A ce titre, une étude de faisabilité est prévue en 1997 à la station de Palavas-les-Flôts, qui sera menée en collaboration avec le CNEVA.

Conclusion

L'étude de l'encéphalite du loup a permis d'illustrer l'apport de la biologie moléculaire à la pathologie. Les rencontres avec les représentants de la profession ont montré que ceux ci étaient sensibles à ces nouvelles techniques. Ce fut particulièrement net dans le cas de l'encéphalite du loup, où la profession s'est montrée très réceptive aussi bien en Italie qu'en Grèce.

PLANCHE 3

Analyse d'échantillons d'huîtres en PCR (Thermocycleur)



Clichés en microscopie électronique à transmission du virus de type herpès observé chez les huîtres.

Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Ressources génétiques.

Marqueurs génétiques

Rappel des objectifs.

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

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

Résultats 1996.

La recherche de marqueurs moléculaires des génomes mitochondriaux et nucléaires, en collaboration avec le laboratoire Génome et Population dirigé par François Bonhomme (Université de Montpellier II) et dans le cadre des programmes européens "TRIPOS" et "GENEPHYS", s'est concrétisée en 1996 par :

1. L'obtention de nouveaux marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Une trentaine de clones "positifs" (c.a.d. contenant une séquence répétée en tandem) a été isolée à partir d'une banque génomique partielle. Le séquençage de ces clones a permis de définir les amorces permettant l'amplification par PCR de ces nouveaux loci microsatellites. Leur mise au point est en cours au laboratoire et servira de base à l'élaboration d'une carte de liaison.
2. Les marqueurs microsatellites obtenus pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* chez E. Zouros (Crète) dans le cadre du programme européen « Tripos » (1994-1996) ont été transférés au laboratoire. Leur mise au point est effectuée dans le cadre du programme européen "Genephys", notamment pour des études liées à la variabilité de la croissance en phase larvaire et post-larvaire. Les premiers résultats de polymorphisme sont encourageants avec 19 allèles pour le premier locus mis au point.
3. L'étude de la différenciation entre populations d'huîtres creuses japonaises (*C. gigas*) et d'huîtres creuses portuguaises (*C. angulata*) a été entreprise. Les résultats obtenus sur un ensemble de populations d'origine variée (France, Espagne, Portugal, Australie, Nouvelle Zélande ,Corée du Sud, Taïwan...) montrent une nette différenciation entre les populations identifiées comme *C. angulata* et celles identifiées comme *C. gigas*.

Ressources génétiques huîtres creuses

Rappel des objectifs.

Les objectifs de ce programme sont :

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

Le "conservatoire de souches" rassemble au sein d'une salle de quarantaine différentes espèces d'huîtres creuses. Aux cinq espèces déjà présentes (*C. gigas*, *C. angulata*, *C. rivularis*, *C. virginica* et *C. sikamea*) se sont jointes cette année des huîtres creuses *Saccostrea commercialis* en provenance d'Australie.

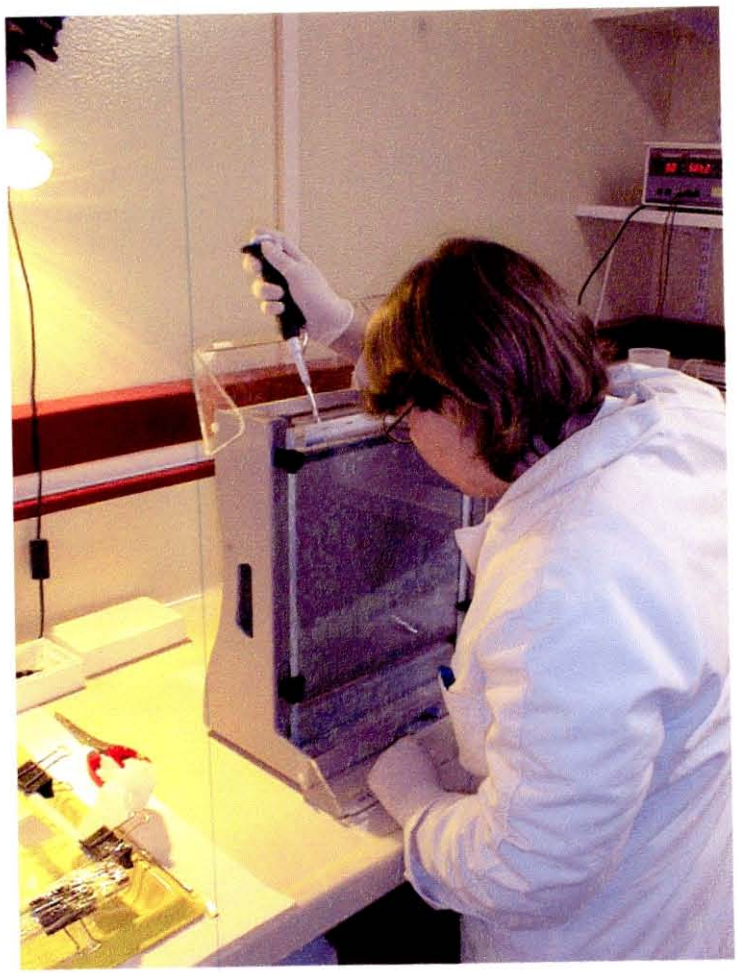
Les principaux résultats pour l'année 1996 sont les suivants:

1- Les essais de reproduction réalisés au cours de l'année ont permis d'obtenir 10000 juveniles de *C. virginica* à partir de géniteurs canadiens. Une partie de ces huîtres est en élevage en salle de quarantaine, conjointement à un témoin *C. gigas*. Conformément aux premières observations réalisées en 1993 à partir de géniteurs en provenance du Pays de Galles, l'espèce semble présenter un potentiel de croissance inférieur à *C. gigas*. Par contre, elles n'ont pas présenté d'épisode de mortalité estivale, au contraire du témoin *C. gigas* qui a subit des mortalités de l'ordre de 80% (les deux espèces étant dans la même structure d'élevage). Les raisons de ces mortalités n'ont pas été déterminées (diagnostic herpès négatif).

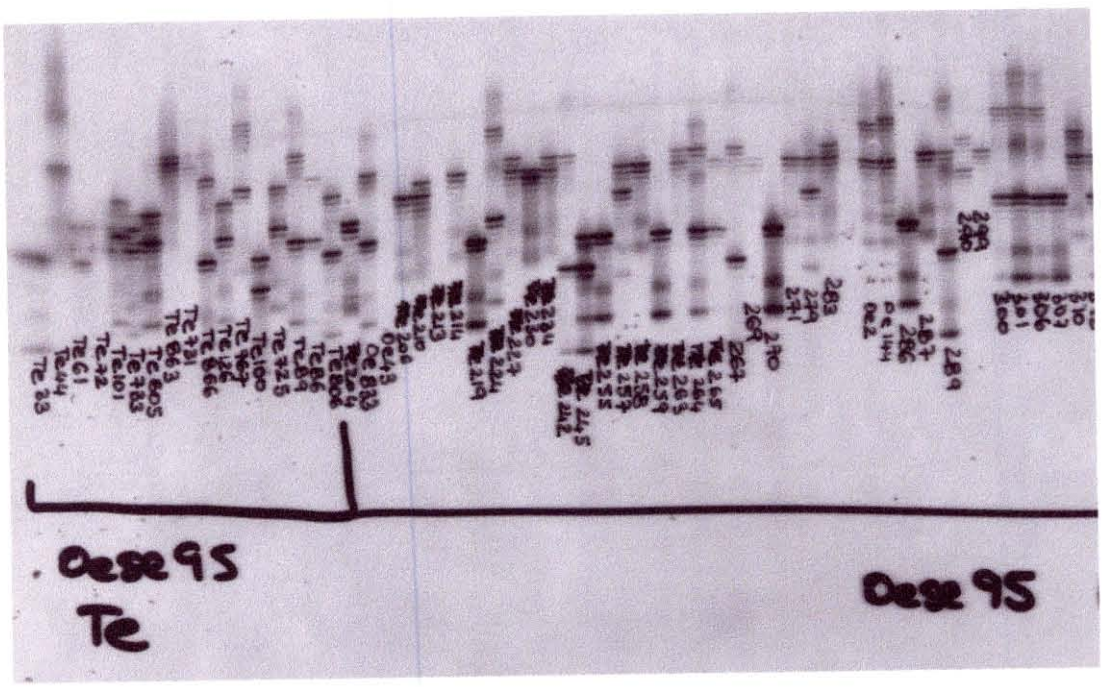
2- Les tentatives d'hybridations inter-spécifiques ont permis de produire des hybrides *C. angulata*/*C. gigas*. Ceux-ci sont en cours d'élevage et seront comparés à des témoins *C. angulata* (le lot témoin *C. gigas* ayant malheureusement subi une mortalité totale en phase larvaire). Les hybrides *C. sikamea* x *C. angulata* et leur témoin *C. sikamea* x *C. sikamea,* produits en 1995, présentent une croissance satisfaisante.

3- La possibilité d'hybridation a été confirmée par l'étude d'individus issus d'un croisement "femelles *C. rivularis* x males *C.gigas*" réalisé en 1995 à l'aide de marqueurs génétiques. Le lot "supposé hybride" s'est avéré constitué d'animaux à croissance forte, comparable à celle des témoins de type *C.gigas*, et d'animaux à faible developpement , de type hybride. Une étude du polymorphisme de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 28S ayant permis de distinguer les deux espèces, nous avons pu confirmer le statut hybride des individus à faible croissance par l'observation de leur profil de restriction pour ce gène.

4- Des mortalités ayant été observées sur les *C. rivularis* (importées des U.S.A. en 1994), des observations histologiques ont permis de mettre en évidence une forte infestation par un parasite, identifié à *Bonamia ostreae*. Les représentants de ce genre n'étant connus que comme parasite d'huîtres plates du genre *Ostrea*, il s'agit donc de la première mise en évidence de la pathogénicité de ce parasite sur une huître creuse du genre *Crassostrea*.



Dépot des amplifications PCR pour migration sur gel d'acrylamide.



Autoradiographie d'un gel de microsatellites d' *Ostrea edulis* .

Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Amélioration & sélection de souches.

Polyploïdisation

Rappel des objectifs.

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

La phase de test terrain des populations triploïdes est en voie d'achèvement, désormais les efforts de recherche sont surtout consacrés à l'obtention de tétraploïdes afin d'obtenir des triploïdes par simple croisement et éviter ainsi le traitement chimique des oeufs à chaque génération.

Achèvement du programme communautaire "TRIPOS"

Le programme CEE-AIR1 "TRIPOS" basé sur l'obtention de triploïdes chez *Crassostrea gigas* par rétention du premier (GP1) ou du second globule polaire (GP2), s'est achevé en cours d'année. Un séminaire regroupant l'ensemble des partenaires de ce programme s'est déroulé en Novembre 1995 en Crète afin d'établir un bilan complet et de préparer le rapport final du projet qui a été fourni à la CEE en août 1996.

Dans le cadre de ce programme, il a été montré que la croissance plus forte des triploïdes au laboratoire et dans le milieu naturel ne résultait pas seulement d'un effort reproductif réduit mais également d'une plus forte potentialité de croissance qui provient d'une demande plus faible en énergie pour le turn over des protéines et d'un polymorphisme génétique plus important mesuré en terme d'hétérozygotie. Les traitements standards utilisant soit la Cytochalasine-B ou le 6-DMAP confèrent aux huîtres des caractéristiques physiologiques reproductibles sur le long terme, qui sont indépendantes de l'effet ploïdie et qui se traduisent par des bilans énergétiques plus forts que ceux des individus non traités. La raison de l'influence du produit n'est pas connue et nécessiterait des recherches complémentaires.

Contrôle des performances de populations triploïdes.

Dans le cadre du REGEMO, les opérations de contrôle des performances biologiques des populations diploïdes et triploïdes se sont poursuivies sur *Ruditapes philippinarum* en milieu intensif à la station de Bouin (URAPL) et en claire ostréicole au CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole).

En milieu intensif à Bouin, l'expérience n'a duré que 7 mois. La croissance a été continue pour les triploïdes, avec un gain de 15,5 g alors que pour les diploïdes elle s'est arrêtée au mois de septembre avec un gain de 14,0 g. Cette croissance très élevée s'est traduite par une différence significative en gain de coquille pour les triploïdes, alors que le gain de chair ne peut être discriminé. Il est à noter la présence d'une ponte massive des diploïdes au mois d'août alors qu'aucune déplétion de poids sec n'est visible pour les triploïdes. L'analyse comparée de la gonade du point de vue macroscopique et microscopique révèle une présence de gamètes pendant presque toute la saison chez les diploïdes avec un maximum de pourcentage d'août à novembre. Chez les triploïdes, les gamètes ne sont présentes qu'à partir du mois d'août et en proportion moindre dans la population. Les indices de condition (Lawrence et Scott, Walne) sont similaires dans leurs

évolutions, ils sont toujours supérieurs à 100 et culminent à 200 ce qui reflète les bonnes conditions nutritionnelles du milieu. Enfin, une analyse sensorielle réalisée avec la collaboration du département Valorisation des Produits de Nantes, a permis au mois de septembre de différencier statistiquement les deux lots à cette période. Les triploïdes présentent un aspect moins laiteux et un taux de remplissage plus élevé. La texture de la chair est apparue plus ferme, plus élastique et moins laiteuse. L'expérience menée au CREAA ne s'achèvera qu'en 1997.

Des contrôles des performances de popultions triploïdes de *Crassostrea gigas* à échelle ostréicole sont en cours au CREAA et au SMIDAP. Le laboratoire ne fourni dans ces expériences qu'une aide logistique au niveau de la fabrication des populations diploïdes et triploïdes (CREAA) et dans le contrôle des taux de triploïdie par imagerie numérique (CREAA et SMIDAP). Bien que très perturbés par les mortalités estivales, ces tests devraient fournir leurs premiers résultats en fin d'année. Une reconduction de ces opérations de transfert sera envisagée en fonction de l'impact qu'aura eu l'herpès-virus sur le déroulement de ces expérimentations.

Essai de production de tétraploïdes de Crassostrea gigas .

L'énorme cahier des charges du programme GENEPHYS en 1996 et la production de familles dans le cadre du programme sélection huître plate, ont monopolisé les forces vives du laboratoire pendant de longs mois. Les essais d'obtention de tétraploïdes de *Crassostrea gigas* n'ont pu faire l'objet d'un effort continu, indispensable à toute réussite dans ce domaine. Contrairement aux résultats encourageants de l'année dernière, des larves viables tétraploïdes n'ont pas été obtenu en 1996. Ces essais seront à renouveler en 1997.

Sélection de l'huître plate *Ostrea edulis*

Rappel des objectifs.

L'objectif principal de ce programme est l'obtention de souches d'huître plate *Ostrea edulis* résistantes ou tolérantes à la bonamiose. La pression de sélection est exercée par confrontation des huîtres avec le parasite dans le milieu naturel ou par inoculation selon les techniques mises au point par les pathologistes.

Résultats 1996.

Création de nouvelles lignées.

La perspective de produire un hybride à 4 voies à partir de souches distinctes d' *Ostrea edulis*, avait été jugée interessante afin d'exploiter les effets d'additivité et de dominance entre gènes mais aussi de protéger les souches améliorées en ne commercialisant à terme que les hybrides. Cette option, qui avait été retenue en 1995, supposait la création de deux nouvelles lignées de sélection. A cet effet, des géniteurs de populations sauvages d'origine rochellaise et normande avaient été stockés pendant 1 an en baie de Quiberon dans une zone fortement infestée par le *Bonamia*. Entre les mois de février et mai 1996, ces huîtres ont été placées dans les dispositifs de reproduction bi-parental (HLM) afin d'obtenir un minimum de 30 familles par population. Ces élevages n'ont pas fourni de résultats escomptés, des problèmes zootechniques ont été rencontrés après la phase de métamorphose. Les familles produites, 20 familles d'origine rochellaise et 11 familles d'origine normande, ont été nursées à Bouin avant d'être éliminées devant l'insuffisance de certains effectifs par famille ou de nombre de familles par origine.

Etude des performances des lignées sélectionnées.

Sur les 112 familles de pleins frères produites en 1995, il restait 92 familles au début de l'année 1996 (11 familles ont été écartées pour suspicion d'herpès-virus, les autres ont été abandonnées en raison de leurs effectifs insuffisants).

Pour estimer les performances de résistance des lignées sélectionnées **au laboratoire**, 40 huîtres de chaque famille, préalablement marquées, ont été inoculées par du *Bonamia*. Les purifications et inoculations du parasite ont été réalisées en collaboration avec les pathologistes du laboratoire. Les animaux ont été répartis dans 4 bacs expérimentaux alimentés en eau de mer enrichie en phytoplancton. Le protocole initial prévoyait un suivi quotidien des mortalités pendant 6 mois, un suivi individuel de la croissance, la réalisation de frottis cardiaques sur les huîtres mortes afin de rechercher la présence de *Bonamia*. Plusieurs éléments sont venus perturber ce protocole, la petite taille des huîtres a posé des problèmes au moment de l'inoculation, des mortalités massives ont été enregistrées le 2ème mois dans deux bacs pour des raisons zootechniques, la décomposition rapide des huîtres mortes a rendu difficile la détection du *Bonamia*. Les résultats montrent malgré tout, dans les deux bacs non touchés par les mortalités massives, que la survie des lignées sélectionnées est supérieure au témoin et que la génération de mixage des deux lignées donne les meilleurs résultats. Cette expérience montre d'autre part que si l'inoculation d'individus âgés de moins d'un an est une opération possible, elle reste toutefois délicate et difficilement envisageable à grande échelle, remettant ainsi en cause la sélection des géniteurs sur un cycle de deux ans.

Les tests de croissance et de survie dans **le milieu naturel** en zone infestée par le *Bonamia* sont réalisés en baie de Quiberon, leur suivi est assuré par le laboratoire RA de La Trinité-sur-mer. Le test initié entre juin et septembre 95 avait été biaisé par des mortalités ayant frappé essentiellement les lots transférés de Bouin au début de l'été 1995. Le dédoublement des lots suivis à Bouin a permis de relancer l'expérimentation fin juin 96. Chaque population (Lignée85, Lignée89, Mixage et Témoin) est représentée par 6 poches de 150 huîtres issues de familles mélangés de manière homogène. Un suivi trimestriel de différents paramètres biométriques, des taux d'infestation par *Bonamia* et de la survie sera réalisé jusqu'à une taille commercialisable qui devrait être atteinte vers la fin 1997.

Afin d'estimer l'héritabilité de la croissance **en milieu contrôlé**, un dispositif expérimental a été mis en place au mois d'avril 1996 à la station de Bouin. Il s'agit d'un plan expérimental en bloc complet, 40 individus marqués de chaque famille répartis en 4 raceways béton sont pesés et mesurés à intervalles de temps variables afin de modéliser leur croissance suivant le modèle sigmoïde de Chapman-Richard. Cette expérimentation réalisée en collaboration avec l'équipe de Bouin suppose de leur part une zootechnie sans faille: contrôle quotidien des débits d'eau, d'air et de phytoplancton. Cette expérience qui est déjà riche d'enseignements, doit se poursuivre jusqu'au mois de janvier 1997.

Evaluation du polymorphisme génétique.

Tous les géniteurs potentiels ayant participé ou non la création de la 3ème génération de la Lignée-85, de la 2ème génération de la Lignée-89 et de la population témoin, ont été biopsés. Une analyse du polymorphisme de chaque lignée est en cours à l'aide des marqueurs microsatellites.

Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Rappel des objectifs.

Ce programme, co-financé par la région Poitou-Charentes dans le cadre du XIème plan pour sa partie investissement et par l'Union Européenne dans le cadre du projet GENEPHYS pour sa partie fonctionnement, associe des partenaires anglais, irlandais, grecs et français. Ce vaste projet, dont la coordination générale est assurée par La Tremblade, a débuté en janvier 1996. Il vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance (respiration, assimilation, digestion, excrétion, rendement métabolique, etc...) et leurs bases génétiques (déterminisme, variabilité intra et inter-

populations, hétérozygotie, accidents chromosomiques, etc...). L'objectif final étant d'évaluer les possibilités de sélectionner des huîtres creuses *Crassostrea gigas* possédant de meilleurs rendements métaboliques pour des caractères physiologiques comme la nutrition ou la respiration par exemple.

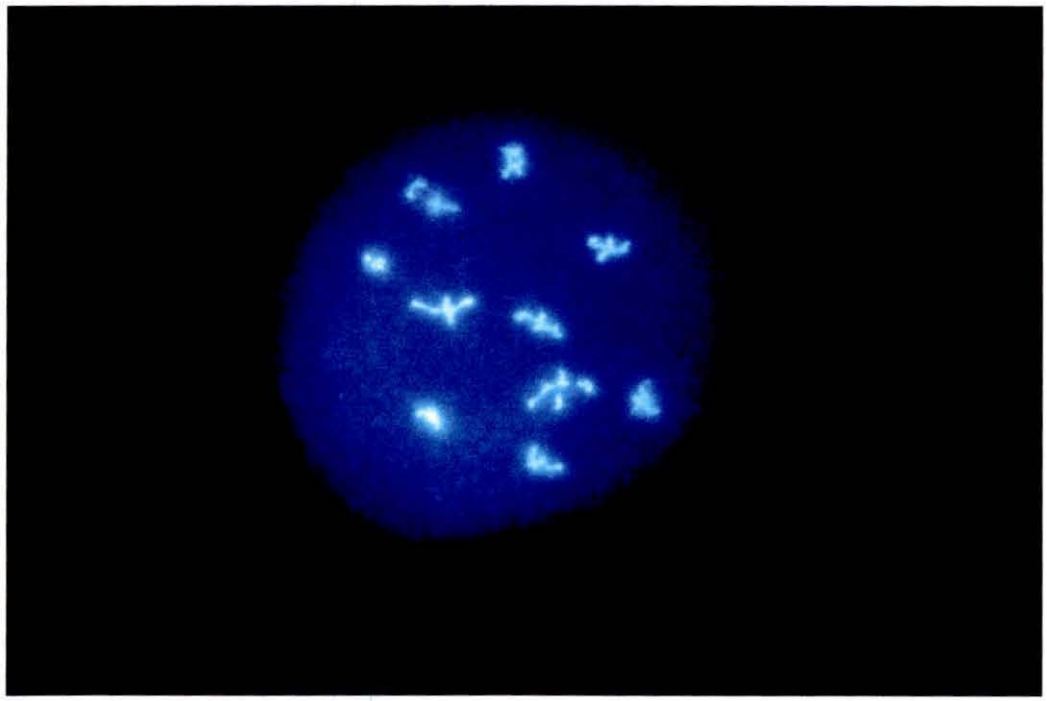
Résultats de l'année 1996.

Ce projet repose sur l'étude de deux générations successives d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Afin de créer une population à base génétique large, condition préalable à toute évaluation du potentiel de sélection dans l'espèce, des géniteurs (populations G0) de quatre populations naturelles (estuaire de la Charente, estuaire de la Seudre, baie de Bonne Anse et bassin d'Arcachon) ont été collectés. Ces sites constituent la source principale de naissain de captage pour l'Europe. La première génération G1 a été obtenue le 15 avril 1996 à la suite d'un croisement de type factoriel entre 20 mâles et 20 femelles de ces 4 populations de géniteurs. Des croisements intra-populations ont également été réalisés en utilisant les mêmes géniteurs, soit un total de 500 croisements obtenus simultanément. Les élevages larvaires ont été effectués de manière à conserver le maximum de variabilité génétique en évitant tout compétition entre les individus. Afin d'obtenir et suivre la croissance individuelle d'individus ayant en commun leur date de fixation (pseudo-cohortes), des collecteurs en PVC ont été immergés régulièrement dans les bacs de fixation pendant 13 jours. Des fixations classiques sur microbrisure ont également été réalisées afin de disposer d'un matériel biologique suffisant pour les différentes analyses génétiques et physiologiques. Les élevages et les différentes actions programmées dans GENEPHYS se sont déroulés sans problème jusqu'au 70ème jour. Des mortalités massives ont ensuite été enregistrées, les tests de diagnostic réalisés par les pathologistes du laboratoire, ont montré que l'élevage était infecté par l'herpès-virus et que les géniteurs de la Seudre étaient certainement à l'origine du développement de la maladie. Ces mortalités qui ont principalement touché les pseudo-cohortes inter-populations ainsi que la population inter-Seudre, ne remettent toutefois pas en cause la poursuite du programme. En effet, les résultats des suivis de croissance individuelle montrent qu'il n'y a pas de différence de potentiel de croissance entre les pseudo-cohortes. Cette observation va nous permettre de proposer à la CEE de poursuivre le programme en se basant sur la variabilité intra-population des populations Arcachon, Charente et Bonne Anse, qui n'ont pas ou peu été touchées par les mortalités.

Parallèlement et en collaboration avec le CREMA L'Houmeau, les géniteurs G0 utilisés dans les croisements ont subit une série de mesures physiologiques non destructives, à savoir, la mesure de la consommation d'oxygène, l'excrétion azotée, la quantité de nourriture consommée, la quantité de nourriture ingérée puis absorbée, le potentiel de croissance (scope for growth). La stabilité temporelle de ces caractères physiologiques impliqués dans la croissance est également en cours d'étude par des mesures individuelles répétées quatre fois dans l'année sur un échantillon de chacune des population G0.

PLANCHE 4

Réalisation des 525 croisements du projet CEE "GENEPHYS"



Etude du développement embryonnaire en épifluorescence.
Ovule non fécondé en métaphase de première division méïotique.

FONCTIONNEMENT GENERAL DU LABORATOIRE

Animation scientifique

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

- **Berthe F.** : Animation du réseau IFREMER pathologie mollusques (REPAMO).
- **Gérard A.** : Animation des programmes génétiques du département "Ressources Aquacoles".
- **Gérard A.** : Animation du réseau génétique mollusques (REGEMO).
- **Gérard A.** : Coordination de l'URM 16 "marqueurs génétiques".
- **Gérard A., Boudry P., Naciri-Graven Y.** : Coordination du programme européen GENEPHYS.
- **Goyard E.** : Animation du réseau mollusques ressources aquacoles (REMORA) (depuis sept.1996).

Fonctionnement de REGEMO

Deux réunions plénières ont été organisées à La Tremblade au cours de l'année 1996, les 6 avril et 18 septembre 1996.

Le premier meeting du mois d'avril avait plusieurs objectifs : le maintien de la cohésion du groupe REGEMO, la présentation des bilans provisoires ou définitifs des opérations en cours en présence de nos partenaires du SMIDAP (région Pays de Loire) et du CREAA (région Poitou-Charentes), une discussion sur l'évolution des programmes génétiques et l'élaboration du calendrier des actions à mener en 1996.

La réunion du mois de septembre, en présence du directeur du département Ressources Aquacoles, a été plus particulièrement consacrée à un bilan du programme de sélection d'huîtres plates résistantes ou tolérantes à la bonamiose, à sa réorganisation suite au départ d'un responsable scientifique, aux grandes orientations à lui donner dans un proche avenir et aux perspectives de valorisation et de transfert de ces souches auprès des producteurs.

D'autres réunions REGEMO, avec notamment l'URAPL de Bouin, l'URPIG de La Tremblade et le laboratoire RA de La Trinité sur mer, se sont tenues en cours d'année pour discuter d'aspects plus techniques ou organisationnels.

Fonctionnement de REPAMO

Une réunion plénière a été organisée à La Tremblade au cours de l'année, le 18 décembre 1996. Cette réunion a été l'occasion de repréciser le champs d'activité de ce réseau compte tenu d'un certain nombre de nouveautés survenues au cours de l'année : nouveaux acteurs du réseau, avec l'intégration de T. Hirata à La Trinité et A. Thébault à La Tremblade, et la prise en charge de l'animation par F. Berthe, nouvelles techniques aussi, avec l'équipement des trois cellules de diagnostic de thermocycleurs pour la PCR. Cette journée de travail s'est attachée à préciser l'organisation et le fonctionnement du réseau, et à dresser les perspectives de travail pour 1997 avec un effort marqué sur les stratégies d'échantillonnage notamment dans le cadre des épisodes de mortalité anormale, la mise en place de la base de données REPAMO. Enfin, une proposition d'un

réseau d'essai a été faite.

Fonctionnement de REMORA

Depuis le 1er septembre 96 le Réseau Mollusques Ressources Aquacole (REMORA) est animé à partir de la station de La Tremblade alors que le laboratoire de La Trinité-sur-mer assurait jusqu'alors cette tâche. Cette situation transitoire s'explique par le délai de remplacement de son animateur, muté de La Trinité-sur-mer à La Tremblade pour y être formé en génétique.

La réunion de coordination de fin d'année a eu lieu en novembre, avant le point final du suivi 1996. Cette réunion avait comme objectif de préciser certains points du protocole et de déterminer les améliorations possibles en matière de choix du matériel biologique utilisé dans le cadre du réseau. Le calendrier 97 (suivi 97 et publication des rapports sur le suivi 96) a aussi été défini.

Compte tenu de la similarité des problèmes d'homogénéité des actions REMORA et de l'opération "Grille de Qualité huître creuse" (programme Qualité), les échantillonnages et les saisies de données liés à cette opération ont également été coordonnés à partir du laboratoire de La Tremblade par l'animateur de REMORA.

Activités d'avis ou d'expertise

- **Berthe F.** : Expert pour les maladies des mollusques auprès de la Fish Disease Commission de l'Office International des Epizooties.
- **Boudry P.** : Membre du CIEM groupe WGAGFM (génétique)
- **Gérard A.** : Membre du comité technique du CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole).
- **Gérard A.** : Membre de la commission scientifique CB2 de l'IFREMER "Chimie, Biologie, Biotechnologie des organismes marins exploités". Cette commission a pour mandat l'évaluation des activités des laboratoires et la rédaction de rapports prospectifs sur les domaines d'intervention.
- **Gérard A., Renault T., Naciri-Graven Y.** : Membres du comité de programme de la DRV.
- **Gérard A.** : Membre du comité de direction élargi du département "Ressources Aquacoles".
- **Renault T.** : Membre du CIEM groupe WGPDMO (pathologie)

Participation à des groupes de réflexion

Berthe F. : Participation au groupe français de l'"European Association of Fish Pathologist" sur le thème de l'épidémiosurveillance des espèces aquacoles.

Gérard A. : Participation à de nombreux groupes de réflexion dans le cadre du plan stratégique 1996-2000 et dans la définition des programmes de l'IFREMER et des mandats de laboratoire.

Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Barré M., Goyard E. : Organisation et participation aux différents groupes de réflexion menés au sein de l'Institut dans le domaine de la génétique des poissons, crustacés et mollusques.

Gérard A., Delsert C., Boudry P. : Organisation et participation à la journée de réflexion DRV sur la biologie moléculaire et les marqueurs génétiques (11 septembre 1996, Nantes).

Renault T., Berthe F. : Participation à de nombreux groupes de travail, en présence ou non de professionnels, concernant les problèmes de mortalités d'huîtres dans les bassins conchylicoles et dans les écloseries.

Assistance scientifique

Berthe F. : Assistance en bactériologie aux programmes de pathologie des pénéides menés en Nouvelle-Calédonie : - identification moléculaire par hybridation quantitative ADN/ADN des espèces de *Vibrio* impliquées dans le

Syndrome 93. - conseil et discussion des approches stratégiques d'une étude de typage moléculaire.

Boudry P., Gérard A. : aide à la conception de protocoles de génétique poissons (appel d'offre biotechnologie).

Delsert C. : Assistance en biologie moléculaire au sein du laboratoire "Génome et Populations" de la station Ifremer Sète dans le cadre de l'URM 16 et dans de nombreux autres programmes de l'Institut :

- formation des étudiants du laboratoire "Génome et Populations" de la station de Sète.
- formation de l'équipe de pathologie du GAP à la technique de nested-PCR puis suivi en vue de l'amélioration de la sensibilité et de la répétabilité des analyses (dont 2 missions de 4 jours).
- conseil en biologie moléculaire. Discussion des approches stratégiques et techniques au sein du GAP.
- direction d'une technicienne (A. Doye) pendant 6 mois dans le cadre du programme Genephys.
- encadrement de Vincent Vonau (COP, Tahiti) dans le cadre d'un programme de génétique visant à l'obtention d'ADN microsatellite chez *P. Stylirostris* (septembre à décembre 1996).

Le Deuff R.M., Lipart C. : Mise en place des laboratoires de biologie moléculaire (analyses PCR) des stations de La Trinité/Mer et de Palavas.

Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C. : Session de formation interne IFREMER au diagnostic de l'infection à virus de type herpès par PCR. La Tremblade, 23 et 24 avril 1996.

Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C. : Complément de formation à la technique PCR pour G. Le Mouroux et R. Le Chanjaur (IFREMER La Trinité), La Tremblade du 28 au 30 mai.

Renault T. : Formation de Peva Levy (IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, Tahiti, Polynésie Française) aux techniques de diagnostic des maladies infectieuses chez les invertébrés, du 3 au 25 novembre 1996.

Assistance technique

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

Astreintes

Le fonctionnement de l'écloserie génétique nécessite une présence quotidienne. Le personnel scientifique du laboratoire s'est ainsi partagé 116 demi-journées de travail effectif durant les week-ends et les jours fériés en 1996. Afin d'être en accord avec les règles de sécurité, un minimum de deux personnes est requis sur l'implantation, ce travail est assuré par un agent de l'équipe génétique avec un

collègue appartenant soit à l'équipe de pathologie, soit à l'URAPC ou au laboratoire DEL.

L'équipe pathologie a assuré 36 demi-journées d'astreinte pour suivre les expérimentations menées en salle de haute sécurité dans le cadre du programme herpès.

Coopération internationale

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

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

Manifestations

Journées Portes Ouvertes de la station de La Tremblade, le 10 Mai 1996 pour les scolaires, et le dimanche 12 Mai pour le grand public.

Parallèlement, participation à l'animation du stand IFREMER au salon ostréicole de La Tremblade, du 10 au 13 Mai 1996.

Visites

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

Janvier	Visite de 6 personnes de Institut National Agronomique Paris Grignon - Visite et exposé des activités
	Visite de Monsieur Slim Trittar, Chercheur Tunisien
Février	Visite du Président de la Commission 7, Enseignement Supérieur et Recherche de la Région Poitou-Charentes ((Pdt Moreau, M. Savidan, M. Courset, M. Tallieu, Henri DURAND Directeur du Centre de Nantes)
Mars	FR3 Interview Huîtres triploïdes
Avril	Visite d'une délégation de 15 étudiants espagnols - Lycée Maritime Aquacole de La Rochelle.
	Visite de chercheurs et étudiants CNRS Lille
	Visite d'un groupe de 30 personnes (Stage de communication RILA organisé par le Rotary Club) Exposé (2h) sur les activités d'IFREMER.
Mai	Visite de Monsieur Tsoufik Boutouchent Spécialiste en Aquaculture El-Biar (Algérie) accompagné de Philippe Favolière Animateur Groupe Terre et Terre Marine Bourcefranc..
	Visite de Messieurs Yves Saudrey Pdt SMIDAP, Régis Pajot, Philippe Glize (SMIDAP), Max Nourry (Bouin)- Points sur analyses et programme herpès virus.
Juin	Visite d'une classe du Lycée Cordouan Royan -1ère S. Sciences Expérimentales -
	Visite de Monsieur Berger Victor Jakovlevich - Académie des Sciences de la Russie, Institut Zoologique, Station Biologique de

	la Mer Blanche.
	Visite d'un groupe de 40 personnes DDE Marennes
	Visite de la Commission de l'Ordre National du Mérite
Août	Visite de Monsieur Amiard, Professeur à l'Université de Nantes
	Visite de Monsieur Guy Kunz-Jacques Photographe
Septembre	Visite de Monsieur Peter Cook Afrique du Sud
	Visite de trois chercheurs norvégiens dont le Docteur Mortensen
	Visite du Docteur Monnier Jacques Vétérinaire à Saint-Savien (16)
	Visite de Madame Martagua Walflor de l'Université du Parana au Brésil (Coopération France/Brésil - Développement de la culture des huîtres à Guaraqueçaba (Parana) accompagnée par Mme Rougeulle et Monsieur Lefrevière - Groupe Terre et Mer.
	Visite de Monsieur Young-Gil Kim Professoral Eng. Aquaculture (Corée) - Prof. J. Yongchul Lee Dr. Sc. (Corée) - Directeur National EDF-GDF pour Investissements - Bruno Descotes-Genon EDF-GDF Charente-Maritime
Octobre	Visite du Docteur Catherine Thiriot et Alexandra Leitao dans le cadre GENEPHYS (1-9/10)
	Visite d'une classe étudiants BTS 1ère année Lycée de Bourcefranc
	Visite de 40 personnes - Journées AGLIA
	Délégation chinoise Zhang Dengyi Administrateur du SOA, Wang Jianwen, Chen Yingyi, Wang Shuguang, Que Tanzhou, Chen Linahao, Li Wenhai, Délégation accompagnée par M. Houdart Ifremer/Paris
Novembre	Visite de Monsieur Chazan, Représentant Ministère pour le Plan Etat Région - DRRT (Direction Régionale Recherche Technologie)(Poitiers)
Décembre	Visite de Mlle Alexandra Leitao dans le cadre GENEPHYS.

Accueil de chercheurs

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

Birtles Richard : Unité des Rickettsies, université Aix Marseille II. 12 au 15 novembre 1996 - Identification des microorganismes de type rickettsiens observés chez les huîtres au moyen d'outils moléculaires.

Collins Catherine (Université de CORK-Département de Zoologie) séjour de 3 mois pour développer des recherches en imagerie numérique dans le cadre de sa

thèse.

Culloty Sarah : Aquaculture Development Centre, Dept. of Zoology, University College, Lee maltings, Cork, Ireland. 16 au 22 novembre 1996 - Diagnostic de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres par la technique de PCR

Fernandez-Nunez Maria : (Institut Espagnol d'Océanographie du Centre Océanographique des Canaris, étudiante à l'ENSAR dans le cadre d'un doctorat en biologie aquacole) divers séjours dans le cadre de sa thèse sur la "différenciation des stocks de poulpe *Octopus vulgaris* en Afrique du Nord occidentale". Appui matériel de l'IFREMER en matière de marqueurs génétiques et de génétique des populations.

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

Leitao Alexandra : (étudiante portugaise en thèse de C. Thiriot à l'Observatoire de Villefranche/Mer), deux séjour d'une semaine (octobre et décembre) dans le cadre des actions de recherche prévues dans GENEPHYS.

Lemaire Christophe : (stagiaire en maîtrise à Palavas), séjour de 3 mois dans le cadre de l'URM 16.

Thiriot Catherine : (partenaire du CNRS Villefranche/Mer dans le projet GENEPHYS) séjour d'une semaine en octobre dans le cadre des actions de recherche prévues dans le projet.

Valdez Gema : (étudiante mexicaine en thèse à l'UBO Brest), thèse sur "la détermination des indicateurs de la qualité des gamètes (ovocytes) de *Crassostrea gigas*" sous la co-responsabilité scientifique d'André Gérard. Plusieurs séjours à La Tremblade au cours de l'année.

Vierne Nicolas : (DEA du laboratoire Génome et Populations de Montpellier II) deux séjours de courte durée à La Tremblade dans le cadre de l'URM 16 pour étudier la génétique en phase larvaire

Missions à l'étranger et groupes de travail

Berthe F. : Mission Vigo, Espagne, 2-5 Décembre - Préparation d'un programme européen sur *Marteilia* pour l'appel d'offre FAIR.

Berthe F. : Mission Brussel, Belgique - Préparation du dossier de financement du laboratoire communautaire de référence. 14-15 octobre.

Boudry P. : Expertise pour l'évaluation des projets soumis à l'appel d'offre européen BIOTECH (DGXII) dans le domaine "Pre-normative research: Plants". Bruxelles, 5-7 Février 1996.

Boudry P. : Orateur invité au 5th international Conference for Productivity Enhancement of the Coastal Waters. Pusan, Korea, 21-25 Mai 1996.

Boudry P. : Visite de différents laboratoire du Taiwan Fisheries Research Institute et de la National Taiwan University. 26-31 Mai 1996.

Boudry P. : 30th annual meeting of the Population Genetics Group. Edinburg, United-Kingdom, 17-20 Décembre 1996.

Renault T. : Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms - Conseil International pour l'Exploration de la Mer, Mariculture Committee, ICES

CM1996/F:4. ICES Headquarters, Copenhague, Danemark. 21-26 mars 1996

Renault T. : Societa' Italiana Patologia Ittica, IV Convegno Nazionale, Facolta' di Medicina Veterinaria, Ozzano Emilia - 10 mai 1996

Renault T. : Congrès : Mollushi eduli lamellibranchi : Pesca, allevamento e controllo. Faculta Medicina Veterinaria, Universita degli Studi, Teramo - 25 mai 1996

Berthe F. Weymouth, UK - rapport final de l'étude CEE 94/C-85/13 sur *Marteilia.*

Réunions contrats CEE

7-14 juillet.

Delsert C. : Réunion de coordination du programme CEE-AIR3 à Faro (Portugal). 4-5 janvier.

Gérard A., Boudry P., Naciri-Graven Y., Collet B., Heurtebise S., Phelipot P. : organisation de la première réunion plénière du projet GENEPHYS au siège de l'IFREMER à Issy les 29 et 30 janvier en présence de tous nos partenaires français et étrangers.

Gérard A., Boudry P., Collet B., organisation de la deuxième réunion plénière du projet GENEPHYS à l'Observatoire Océanologique de Villefranche/mer le 10 décembre 1996, afin d'établir le bilan de la première année du programme.

Formation diplômante

Cochennec N. 1995-1996 : Inscription en seconde année de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes - Etude de la bonamiose.

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

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

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

Formations reçues

Albert-Rivet F. : Stage de 2 semaines - anglais Carel Royan - décembre 1996.

Chollet B. : Techniques Immunocytochimiques sur coupes de tissus et cultures cellulaires - 3 au 7 juin 1996 - Université Louis Pasteur Strasbourg.

Boudry P. : Stage biologie moléculaire : clonage et séquençage - CNRS - 11-18 octobre 1996

Boudry P. : Formation statistiques (S.A.S.) du 24 au 28 novembre 1996 - Grégny

Gérard A. : Stage d'une semaine d'Anglais au CAREL à Royan - décembre 1996

Goyard E. : Formation CSAGAD "*Cours supérieur d'amélioration génétique des animaux domestiques-Session Amélioration génétique en milieu aquatique"* Beg-Meil,. octobre 1996.

Goyard E. Formation statistiques (S.A.S.) du 24 au 28 novembre 1996 - Grégny

Phélipot P. : Stage de nettoyage et désinfection niveau 1 - L'ENITIA - Nantes décembre 1996.

Renault T. : Février 1996 : Hybridation *in situ* en microscopie photonique, Institut Pasteur Lyon.

Renault T. : Juin 1996 : Formation "compétence à la radioprotection", APAVE de l'Ouest, Nantes.

Formations dispensées

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

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

Boudry P. : Cours de génétique des populations (10 heures de cours + examen juin) à la Maîtrise de Biologie de l'Université de La Rochelle.

Boudry P., Barré M. : Cours de "Génétique et sélection des huîtres", formation des enseignants de biologie des Lycées Maritimes. Session d'une journée organisée par l'AGEMA;

Gérard A. : Formation sur "la conduite sanitaire des écloseries de mollusques bivalves" pour l'Ecole Vétérinaire de Nantes (3 heures de cours).

Gérard A. : Conférence sur la cytogénétique (3 heures) à la Maîtrise de Biologie de l'Université de La Rochelle.

Naciri Y. : Cours de génétique (10 heures de cours + examens juin et septembre) à la Maîtrise de Biologie de l'Université de La Rochelle.

Naciri Y. : Cours de génétique sur les mollusques dans le cadre de la formation dispensée par le SAGAD et l'INA-PG à Beig-Meil (4 heures de cours).

Naciri-Graven Y. : Cours de génétique quantitative et de sélection sur les mollusques dans le cadre de l'option "génétique en milieu marin" du DEA Ecologie et Evolution de l'Université de Montpellier II.

Renault T. : Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, "Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement", module "Pathologie des élevages conchylicoles et pénéicoles" : cours et travaux dirigés "les maladies des élevages conchylicoles" - 23 janvier et 18 décembre

Renault T. : Université de Rennes I, DEA d'Agronomie, Option Biologie Aquacole. Cours "Pathologie des mollusques bivalves" - 18 novembre.

Renault T. : Affaires Maritimes, Bordeaux, Formation des Techniciens du contrôle des établissements de pêche maritime. Cours "Pathologie des mollusques bivalves" - 26 novembre.

Revue d'articles et de projet.

Boudry P. : Revue d'un article pour Theoretical and Applied Genetics.

Renault T. : Revue d'un article pour Fish and Shellfish Immunology.

Renault T. : Revue d'un article pour Aquating Living Resources.

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

Naciri-Graven Y. : Revue d'un projet anglais sur l'huître plate.

Jury de thèse ou de mémoire d'étudiant.

Boudry P. : Membre du jury du DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières" de Bérénice Morand, Université de Caen, "Etude de la variabilité de croissance d'une population d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* - bases génétiques". Soutenu le 19 novembre 1996.

Gérard A. : Membre du jury de thèse d'Emmanuel Danton sur "la triploïdie chez les mollusques bivalves : application à la production commerciale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Etude de ses conséquences sur trois modèles *Mullinia lateralis, Mytilus galloprovincialis* et *Crassostrea gigas*" soutenue le 3 décembre 1996 à Caen.

Gérard A. : Membre du jury de thèse Vétérinaire de Frédéric Pronnier sur "le développement et l'alimentation de larves de bivalves d'écloserie" soutenue le 28 juin 1996 à Nantes.

PUBLICATIONS 1996

Revues à comité de lecture

Bernardet J. F., Segers P., Vancanneyt M., Berthe F., Kersters K., Vandamme P. (1996). Cutting a gordian knot : emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal *of Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978*). International Journal of Systematic Bacteriology*, **46,** 1, 128-148.

Choi D-L, S-G Sohn, M-A Park, M-S Heo and T. Renault (1996). Detection of a mollicute-like organism in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus. Journal of Fish Pathology*, **9,** 1, 33-40

Comps, M., Trindade, M., and C. Delsert, (1996). Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture,* **143**, 2, 113-121:

Emiliani, S., Coudronnière, N., Delsert, C., and C. Devaux, (1996). Structural and functional properties of HIV-1 GER TAR sequences. *J. Biomed. Sci.* **3**, 31-40.

Le Deuff R. M., T. Renault, A. Gerard (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas. Diseases of aquatic Organisms*, **24**, 149-157.

Renault T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue scientifique et technique de l'Office Internationale des Epizooties*, **15,** 2, 551-561.

Sous presse

Baud J. P., Gérard A. & Naciri-Graven Y. (1996). Comparative growth and mortality of *Bonamia* resistant and wild flat oysters *Ostrea edulis* in an intensive system. I. First year of experiment. *Marine Biology*.

Cochennec N., Renault T., Boudry P., Cholet B., Gerard A. (1996) .. Bonamia-like in the suminoe oyster, *Crassostrea rivularis* (Gould) reared in France. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Ohresser, M., Borsa, P., and C. Delsert, (1996) . Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis. Mol. Mar. Biol. Biotech.*

Van Dijk H., Boudry P., McCombie H., Vernet P.. (1996). Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Oecologia*.

Colloques et congrès

Berthe, F. (1996). Report on the meeting of the OIE Fish Diseases Commission. 25-27 novembre 1996. Paris.

Bierne N., Naciri-Graven G. & Bonhomme F. (1996). Microsatellites en phase larvaire chez *Ostrea edulis*. 18ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations 27 août-30 août 1996. Grenoble.

Bierne N., Naciri-Graven Y., Launey S. & Bonhomme F. (1996). Microsatellites during the larvae phase in *Ostrea edulis*. Workshop on Heterosis in Oysters. September 1996. Davis University.

Boudry P., Chatain B., Naciri Y., Lemaire C., Gérard A. (1996). Genetical improvement of marine fish and shellfish: a french perspective. Exposé au 5th international Conference for productivity Enhancement of the Coastal Waters. Pusan, Korea, Mai 23-24 1996.

Boudry P., Heutebise S., Cornette F., Collet B., Gérard A. (1996). . Where does the portuguese oyster really come from ?. Poster présenté au 30th annual meeting of the Population Genetics Group. Edinburg, United-Kingdom, 17-20 Décembre 1996.

Boudry P., 1996. Les huîtres creuses dans le monde : acclimatation et hybridation. Exposé au XX Salon Ostréicole de La Tremblade, 10-13 Mai 1996.

Cochennec N., Renault T., Chilmonczyk S. (1996). Etude comparative en cytologie et cytofluorimétrie des hémocytes de populations d'huîtres plates *Ostrea edulis*, sensibles et résistantes au parasite *B. ostreae*. Groupe d'Immunologie des Invertébrés - Montpellier, 27-28 Mars 1996.

Costa R., Mermoud I., Morlet B., Haffner P., Koblavi S., Grimont P. (1996). Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia. II. Isolation and identification of bacteria collected from the hemolymph of moribund prawns during peaks of mortality. World Aquaculture '96. 29 janvier - 2 février 1996. Bangkok. Thaïland.

Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Haffner P., Le Groumellec M., Berthe F. (1996). Isolation and characterization of bacteria associated with a Penaeus disease ("Sydrome 93") Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. SEAFDEC Aquaculture Department. 14 - 25 mai 1996. Iloilo. Philippines.

Desplanque B., Boudry P., Broomerg K., Van Dijk H. (1996). Flux géniques entre betteraves sauvages et cultuvées: des populations de betteraves mauvaises herbes peuvent-elles s'installer rapidement ? Exposé au Xth International Symposium on the Biology of Weeds, Dijon, 5-7 Septembre 1996.

Desplanque B., Boudry P., Broomerg K., Van Dijk H., (1996). Flux géniques entre betteraves sauvages et cultuvées: des populations de betteraves mauvaises herbes peuvent-elles s'installer rapidement ? In: Gasquez J (ed.), Annals of the Xth International Symposium on the Biology of Weeds, ANPP, Paris, pp. 239-246.

Gérard A. (1996). Triploïde : avantages et inconvénients. Exposé au XX Salon Ostréicole de La Tremblade, 10-13 Mai 1996.

Goarant C., Mermoud I., Costa R., Haffner P., Boglio E. (1996). Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia. I. Biotechnical impact and gross signs in diseased prawns. World

Aquaculture '96. 29 janvier - 2 février 1996. Bangkok. Thaïland.

Launey S., Naciri-Graven Y., Delsert C., Bonhomme F. & Gérard A. (1996). Variabilité génétique de deux populations d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) sélectionnées pour une résistance à *Bonamia ostreae*. 18ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations - 27 août-30 août 1996. Grenoble.

Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Mermoud I., Costa R. (1996). Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia. IV. Investigation of the bacterial hypothesis by bacterial infections, with reference to stress-induced mortality. World Aquaculture '96. 29 janvier - 2 février 1996. Bangkok. Thaïland.

Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P. (1996). Aquacop. "Syndroma 93" in New Caledonia : investigating the bacterial hypothesis. World Aquaculture '96. 29 janvier - 2 février 1996. Bangkok. Thaïland.

Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Berthe F., Costa R., Mermoud I. (1996). "Syndroma 93" in New Caledonia : investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress induced mortalities. Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. SEAFDEC Aquaculture Department. 14 - 25 mai 1996. Iloilo. Philippines.

Martin J. L. Y., Renault T., Costa R., Galinié C., Mermoud I, Le Groumellec, M. Berthe F. (1996). Global research program organization to face *Penaeus stylirostris* shrimp mortality episodes in New Caledonia : a methodological approach. Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. SEAFDEC Aquaculture Department. 14 - 25 mai 1996. Iloilo. Philippines.

Mermoud I., Costa R., Lightner D. V., Haffner P. (1996). Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia. III. Histological abnormalities observed in moribund prawns collected during episodes of mortality. World Aquaculture '96. 29 janvier - 2 février 1996. Bangkok. Thaïland.

Mermoud I., Costa R., Goarant C., Haffner P. (1996). Study of mortalities observed in reared *Penaeus stylirostris* in New Caledonia : first description. Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. SEAFDEC Aquaculture Department. 14 - 25 mai 1996. Iloilo. Philippines.

Naciri-Graven Y. (1996). La sélection pour obtenir des souches mieux adaptées. Exposé au XX Salon Ostréicole de La Tremblade, 10-13 mai 1996.

Naciri-Graven Y. (1996). L'huître plate Ostrea edulis : génétique des populations et génétique quantitative. Séminaire de l'Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale (IZEA). Université de Lausanne.

Renault T. (1996). Bonamiosis : a model for studying the defence mechanisms in bivalve molluscs. Societa' Italiana Patologia Ittica, IV Convegno Nazionale, Facolta' di Medicina Veterinaria, Ozzano Emilia - 10 mai 1996.

Renault T. (1996). Malattie infettive dei molluschi soggette a controlle : la Bonamiosi. Congrès : Mollushi eduli lamellibranchi : Pesca, allevamento e controllo. Faculta Medicina Veterinaria, Universita degli Studi, Teramo - 25 mai 1996.

Sous presse

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

Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Launey S., Heurtebise S., Ledu C. & Phelipot P. (1995). Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates : relation entre reproduction et génétique. Séminaire "Physiologie de la reproduction des mollusques". Nantes 14-15 novembre 1995.

Rapports finaux de contrat

F. Berthe Study to be carried out in the aquaculture sector on the transmission of the pathogenic agents *Bonamia ostraea* and *Marteilia refringens*. Contrat CEE 1530 PCF - Rapport final, juillet 1996.

Naciri-Graven Y., Gérard A., Ledu C., Heurtebise S., Peignon J.M. & Phelipot P.. *In* "Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in commercially important marine shellfish. *Final EEC Report Project N° AIR1 3003 92 0168.*

Autres types de rapports

Cochennec N. (1996). La Bonamiose : étude du parasite *Bonamia ostreae* et des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par l'huître plate vis à vis de ce parasite. Rapport de deuxième année pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, 1995-1996

Cochennec N. (1996). La Bonamiose : étude du parasite *Bonamia ostreae* et des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par l'huître plate vis à vis de ce parasite. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

Collet B., (1996). Etudes de bases génétiques de la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez Crassostrea gigas. Rapport annuel de thèse 1ère année.

Launey S. (1996). Recherche de marqueurs génétiques et évaluation de la variabilité génétique dans le cadre d'un programme de sélection de l'huître plate Ostrea edulis au parasite Bonamia ostreae. Rapport annuel de thèse 2ème année.

Mémoires d'étudiants

Biraud V. (1996) - Application de reconnaissance et de comptage par imagerie numérique des différents types hémocytaires présents dans l'hémolymphe de l'huître plate, *Ostrea edulis*. Maîtrise de Génie Informatique, Institut Universitaire Professionnalisé, La Rochelle. Février-juin 1996

Cornette F. (1996). A la recherche de l'huître portuguaise : identification de marqueurs moléculaires discriminant *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*. Certificat de spécialisation en aquaculture, CEMPAMA-Beg Meil Fouesnant, 43 p.

Höll K. (1996) - Evaluation du polymorphisme de deux populations d'huîtres plate : *Ostrea edulis* sélectionnées pour une résistance au parasite : *Bonamia ostreae*. Mémoire de DTSM Intechmer-Cherbourg, 23 p.

Morand B. (1996) - Etude de la variabilité de croissance d'une population d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* - bases génétiques. DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières", Université de Caen, 75 p.

Parthuisot N. (1996) - Infestation des hémocytes par le parasite *Bonamia ostreae* : cytologie comparative in vitro. Post-DUT - Lycée Saint Louis -

Bordeaux. Mars-juin 1996

Rodriguez D. (1996) - Essais d'outils pour le typage des parasites du genre Marteilia. Maîtrise de Biologie Cellulaire - Universite Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. Juin-septembre 1996

Severin P. (1996) - Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpès de l'huître creuse, *Crassotrea gigas* : diagnostic et applications expérimentales. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes - Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole. Mars-juin 1996.

Vano L. (1996) - Recherche de marqueurs de l'ADN nucléaire chez les huitres creuses du genre *Crassostrea*. Rapport de stage de 2eme année de BTS Biochimie. Lycée Jean Perrin, Reze (44).

Waechter M. (1996) - Recherche de bactéries pathogènes du genre *Vibrio* sur larves et naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, au sein d'une écloserie-nurserie de l'Ile de Ré. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes - Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole. Mars-septembre 1996.

Zerabib M. (1996) - Contribution à l'étude du cycle de *Marteilia refringens*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes - Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole. Avril-septembre 1996.

Documents techniques, plaquettes, lettres aux médias...

Utilisation de la technique PCR pour le diagnostic de l'infection à herpèsvirus chez les huîtres - De la grande théorie aux petites recettes - IFREMER La Tremblade. 23 et 24 avril 1996

Infection à herpèsvirus chez les huîtres - Résultats, applications et perspectives. Journée d'information pour la Région Pays de La Loire, IFREMER La Tremblade, 22 mai 1996

Une référence pour les maladies des mollusques. Lettre aux Médias, IFREMER n°37-septembre 1996.

Les huîtres au conservatoire. Supplément à la Lettre aux Médias N°20 - Juin 1996

Papports intermédiaires de contrat ou de convention

Boudry P., Naciri Y., Heurtebise S., Delsert C., Ledu C. Phélipot P., Chollet B., Cochennec N. & Gérard A. . Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : Hybridations et conservatoire de souches. 2ème Partie : année 95. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 95/RPC-R-57 "Génétique", 20 p.

Boudry P., Naciri Y., Héral M., Collet B., Bougrier S., Geffard O., Ledu C., Phélipot P., Heurtebise S., & Gérard A. Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes. 2ème partie : année 1995. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes1994-1998. Convention 95/RPC-R-57 "Génétique", 30 p.

Delsert C. Rapport de la première année du contrat AIR3 CT-2487 intitulé: Development of mussel-specific expression vectors suitable for transgenic organisms : Implication in the establishment of mollusc continuous cell lines.

Naciri-Graven Y., Boudry P., Launey S., Delsert C., Heurtebise S. & Gérard A. .: Rapport URM 16 année 1995 - Unité de Recherche Marine n°16 - IFREMER n°95/1212315/N - Developpement et utllisation des marqueurs génétiques hypervariables chez les espèces marines.

Renault T., Berthe F., Chollet B. , Cochennec N ., Haffner P., Le Deuff R. M. et Thuillier B. Rapport scientifique 1995 - Programme Pathologie - Contrat de Plan Etat Région Poitou Charentes 1994/1998 - Convention 95 RPC R 62.

Renault T.. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95/07/01 - Février 1996.

Renault T.. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95/07/01 - Août 1996.

PERSPECTIVES POUR 1997

Perspectives

- PROGRAMME : SURVEILLANCE ET EVALUATION DES RESSOURCES COTIERES

* **Suivi zoosanitaire et mortalités (cellule de veille zoosanitaire).**

En accord avec la Directive CEE 91/67 du 27 Janvier 1991, le rôle de la cellule de veille zoosanitaire est de contrôler l'état zoosanitaire des mollusques d'intérêt commercial. Dans ce cadre, il s'agit d'abord de reconnaître les facteurs jouant un rôle dans la santé et de mieux comprendre leurs interactions éventuelles, ce qu'on peut résumer par "recherche de l'étiologie dans le cas de mortalités anormales". Dans un second temps la répartition dans l'espace et le temps des facteurs retenus, ainsi que l'estimation de leur impact permettront de justifier les mesures les plus appropriées à la situation, ce qui peut aussi s'exprimer par l'intitulé suivant : "définition et maintien du statut des zones littorales". Enfin il s'agit de connaître les risques d'introduction et de voisinage pour la zone dépendant de la cellule de veille zoosanitaire, c'est ce qu'on entend limiter par le "contrôle zoosanitaire des produits provenant des pays tiers et des pays communautaires."

Les activités de la cellule de veille zoosanitaire vont s'articuler autour de ces trois axes :

1- *Recherche de l'étiologie dans le cas de mortalités anormales*

- La cellule entend assister périodiquement aux réunions professionnelles de son secteur afin d'améliorer la circulation de l'information et de faire participer la profession à nos recherches,

- En cas de mortalité anormale, les analyses permettant de mettre en évidence son étiologie seront effectuées. Les résultats seront communiqués aux ostreiculteurs ayant fourni les échantillons et saisis sur la base de données de REPAMO,

- Progressivement seront constituées une banque de photos et une lamothèque d'histopathologie des mollusques d'intérêt commercial,

- La cellule participera à la création de deux bases de données pouvant servir de pistes à d'éventuelles études ultérieures : l'une sur les principaux et récents aspects des maladies des mollusques, l'autre sur l'écotoxicologie.

2- *Définition et maintien du statut dans les zones littorales*

- Conformément au protocole défini par la CEE les analyses sur *Bonamia et Marteilia*, ainsi que le suivi minimum sur d'autres espèces de mollusques d'intérêt commercial seront l'objet d'un bilan annuel pour les zones dépendants de notre secteur,

- Les nouvelles méthodes diagnostiques, dès lors que leur validité intrinsèque sera obtenue, pourront en fonction des besoins, être utilisées. La cellule participera à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage,

- La cellule participera à des tests de répétabilité intercellules, notamment en histologie,

- Un certain nombre de facteurs (nature des fonds, localisation des gisements naturels, densité des élevages, type d'élevage, bathymètrie, courantologie) sont déjà connus pour avoir un rôle direct ou indirect avec la transmission d'agents pathogènes. La cellule centralisera ces données, si possible sur ordinateur,

- La cellule participera à la mise au point d'une enquête descriptive pour l'estimation de la mortalité estivale sur le naissain de *Crassostrea gigas* sur une partie du bassin de Marennes Oléron.

3- Contrôle zoosanitaire des produits provenants des pays tiers et des pays communautaires

- La cellule fera les analyses nécessaires et obligatoires avant importation de mollusques,

- La cellule participera à l'élaboration d'une base de données sur la répartition au niveau mondial des maladies des mollusques.

* **Laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques bivalves.**

Le Conseil de l'Union Européenne a désigné le laboratoire GAP de La Tremblade comme **laboratoire communautaire de référence** pour les maladies des mollusques bivalves. Les fonctions de ce laboratoire de référence consistent essentiellement à coordonner, en consultation avec la Commission, les méthodes utilisées par les états membres pour le diagnostic des maladies des mollusques. L'entretien de collections, la mise à jour régulière des connaissances, la mise au point et l'amélioration de techniques de diagnostic, l'organisation de réseaux d'essais sont donc les premières obligations de ce laboratoire. En outre, la participation active au diagnostic des maladies qui se déclarent dans les états membres, la collaboration en matière de caractérisation d'agents pathogènes et d'études épizootiques font partie de ses attribution. Enfin, ce laboratoire aura à faciliter la formation et l'information d'experts en vue d'harmoniser les techniques de diagnostic dans l'ensemble de la Communauté. Le fonctionnement de ce laboratoire de référence ne sera effectif qu'au 01/01/97. Le laboratoire GAP s'est récemment doté d'un site internet (http://www.ifremer.fr/gap/gap.htm) afin de répondre à ses nouvelles obligations. Un groupe de travail des laboratoires nationaux de référence sera réuni en octobre 1997.

- SANTE DES POPULATIONS D'ELEVAGE

* **Pathologie à virus de type herpès.**

❖ Des essais de reproduction expérimentale de l'infection seront à nouveau réalisés au laboratoire sur le stade naissain, afin de confirmer ou d'infirmer l'implication du virus dans les phénomènes de mortalité observés depuis plusieurs années au cours de la période estivale. La confirmation de la démonstration du pouvoir pathogène de ce virus est primordiale aujourd'hui.

Des expériences seront également effectuées, en collaboration avec le laboratoire IFREMER de Bouin, dans le but de vérifier si la transmission horizontale est possible au stade naissain, dans des structures d'élevage intensif. Si il est possible de transmettre le virus, des expérimentations seront réalisées afin de déterminer les conditions d'expression de l'infection chez les coquillages.

❖ Le développement d'une méthodologie basée sur la technique de PCR sera poursuivie afin de tenter d'améliorer le seuil de sensibilité de la détection de l'ADN viral. La technique de PCR, couplée à d'autres méthodes, sera également utilisée dans le but de démontrer l'existence de stades latents de l'infection chez les coquillages et de les détecter. Les techniques d'hybridation *in situ* et de PCR *in situ* seront également abordées afin de tenter de définir les tissus et organes dans lesquels le virus pourrait se trouver en phase de latence.

Le programme déjà proposé en 1996 à l'Union Européenne sera de nouveau soumis. Ce projet prévoit le développement de différents outils diagnostiques (sondes moléculaires, amorces pour la PCR, anticorps spécifiques et développement de primocultures cellulaires) afin de disposer de différentes techniques pour rechercher le virus de type herpès chez les huîtres infectées.

❖ Un travail de séquençage de l'ADN viral sera poursuivi, en collaboration avec le Dr. A. Davison (Medical Research Council Virology Unit, Glasgow). Cette approche permettra une étude comparative avec d'autres herpèsvirus (taxonomie) et de répondre au problème de salubrité posé par les coquillages infectés par le virus.

❖ Un travail de transfert de techniques sera réalisé afin que les outils de diagnostic mis au point soient utilisés au niveau national (REPAMO) et international (laboratoire de réference communautaire).

* **Bonamiose et mécanisme de défense.**

❖ La contribution au programme de génétique d'obtention de populations d'huître plate, *Ostrea edulis*, résistantes à la bonamiose sera poursuivie en assurant le maintien au laboratoire d'un stock d'animaux expérimentalement infectés par le parasite, la purification et l'inoculation des individus selectionnés et la lecture des frottis cardiaques des différents lots expérimentaux.

❖ L'étude comparative des populations hémocytaires entre animaux sélectionnés et animaux témoins sera complétée, afin de définir d'éventuels marqueurs de résistance et de tenter d'appréhender les mécanismes qui peuvent régir la résistance à la bonamiose. Dans ce but, des techniques permettant de multiplier les analyses seront rechercher et développer (analyse d'image, cytofluorimétrie, etc ...).

❖ Des travaux seront menés afin de préciser la structrure, la localisation et les fonctions des populations hémocytaires observées chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Dans ce cadre, des anticorps monoclonaux spécifiques des populations agranuleuses et de la population granuleuse seront produits. Leur spécificité sera contrôlée au moyen de diverses techniques. Par ailleurs, une approche fonctionnelle sera également réalisée par le biais d'un système de primoculture d'hémocytes mis au point au laboratoire en 1995-96.

❖ Des outils de diagnostic spécifiques du parasite *Bonamia ostreae* seront développés sur la base des travaux déjà entrepris en biologie moléculaire.

* **Etude de la Marteiliose.**

❖ Les perspectives du sujet *Marteilia* sont d'une part de préciser la sensibilité et la spécificité de la technique de détection en PCR du parasite et d'autre part d'étudier la cinétique d'infection par *Marteilia* dans les claires.

❖ La taxonomie du genre devrait être précisée après mise au point du protocole d'immunopurification de *Marteilia*, par le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 18S de diverses origines parasitaires (*Ostrea*

edulis, *Mytilus edulis* et *Cardium edule*).

❖ En outre, la séquence répétée de type satellite de la sonde Mab2 sera recherchée sur le génome de *Marteilia refringens*.

* **Etude de *Perkinsus atlanticus*.**

❖ Une étude ponctuelle du parasite *Perkinsus atlanticus* a été démarrée au cours des dernières semaines dans le cadre d'une collaboration avec l'Université d'Algarve du Portugal. Elle vise à mettre au point une méthode quantitative de diagnostic du parasite sur la palourde *Ruditapes decussatus*, en vue d'établir un modèle expérimental *Perkinsus*-Palourde.

* **Etudes bactériologiques.**

❖ Une étude similaire à celle réalisée en 1996 pourrait être reconduite, compte tenu des premiers résultats obtenus et des améliorations possibles des divers protocoles expérimentaux utilisés (pathologie expérimentale, système d'identification, etc...).

- **AMELIORATION GENETIQUE DES ESPECES AQUACOLES**

* **Fonctionnement du réseau génétique mollusques (REGEMO).**

Les partenaires du réseau seront sollicités pour participer, comme chaque année, aux expérimentations en cours:

- Sélection huître plate : le laboratoire GAP de La Tremblade, le laboratoire RCPL de Bouin, les laboratoires RA de La Trinité sur Mer et de Port-en-Bessin, et, le laboratoire Méditerranéen de Recherche en Aquaculture de Palavas.
- Sélection huître creuse : le laboratoire GAP de La Tremblade, le CREMA L'Houmeau, le laboratoire RCPL de Bouin, le laboratoire de Physiologie des Invertébrés de Brest, le laboratoire Méditerranéen de Recherche en Aquaculture de Palavas.
- Cytogénétique : le laboratoire GAP de La Tremblade, le laboratoire RCPL de Bouin, le laboratoire RCPC de La Tremblade, le laboratoire Méditerranéen de Recherche en Aquaculture de Palavas, le CREAA et le SMIDAP.

* **Sélection pour une résistance de l'huître plate *Ostrea edulis* à la bonamiose.**

Les recherches dans ce domaine seront poursuivies sur deux fronts:

au laboratoire :

- des représentants des différentes familles produites en 1995 seront inoculés avec du parasite purifié afin de vérifier leur tolérance à la bonamiose et fournir des géniteurs pour la production de nouvelles familles en 1998.
- afin d'évaluer la quantité et la structuration de la diversité génétique disponible, des marqueurs microsatellites sur les familles testées et sur des populations naturelles françaises et européennes seront obtenus au printemps. Une première cartographie du génome sera également obtenue grâce à l'analyse des microsatellites dans une famille consanguine.

sur le terrain:

- des représentants des différentes familles produites en 1995 seront

testés en Normandie et dans l'étang de Thau, pour leurs performances de croissance et de tolérance à la bonamiose en milieu naturel, avec des souches locales atlantiques et méditerranéennes comme témoins.

- un essai en condition de production est envisagé avec la collaboration du secteur professionnel. A cet effet, plusieurs millions de naissains témoins et issus de familles sélectionnées seront produits à l'écloserie de La Tremblade et nursés dans des structures professionnelles. Ces huîtres seront semées en Bretagne Nord et Bretagne Sud. Cette opération pourrait être considérée comme le point de départ d'une réflexion pour un transfert des souches tolérantes au secteur productif.

* **Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères physiologiques.**

Les géniteurs seront caractérisés génétiquement par l'utilisation de marqueurs microsatellites et allozymiques. Le double point de vue génétique et physiologique permettra de préciser les relations entre la variabilité génétique, l'hétérozygotie, le métabolisme et la croissance. La génération G1, après une période d'élevage sur corde dans l'étang de Thau (mars-octobre), sera utilisée pour sélectionner les animaux à efficacité métabolique contrastée nécessaires à l'obtention de la seconde génération (population G2). Sur cette dernière population, les relations entre individus de familles de plein frères et de demi frères constitueront les bases de l'héritabilité, de l'additivité et de la dominance des caractères physiologiques étudiés.

* **Cytogénétique.**

Dans ce domaine, nos efforts seront focalisés :

au niveau du laboratoire,

- sur l'obtention d'huîtres *Crassostrea gigas* tétraploïdes,
- la production de différents lots de diploïdes et triploïdes pour lancer des opérations de suivi des performances en associant le secteur professionnel,

au niveau du terrain,

- sur un contrôle des performances de populations diploïdes et triploïdes de *Crasssostrea gigas* dans l'étang de Thau en condition de production. Cette opération sera menée dans le cadre de REGEMO, par le laboratoire Méditerranéen de Recherche en Aquaculture de Palavas en collaboration avec le secteur professionnel local,
- en fonction des résultats des actions menées par le CREAA (région Poitou-Charentes) et le SMIDAP (région Pays de Loire) en concertation ou en collaboration avec le laboratoire, d'autres opérations de valorisation et de transfert au secteur ostréicole pourront être envisagées.

* **Recherche de marqueurs génétiques.**

La poursuite des travaux sur les marqueurs génétiques en 1997 s'orientera vers les thèmes suivants :

- Etude de la différenciation de populations d'huîtres creuses japonaises (*C. gigas*) à l'aide de marqueurs microsatellites. Nous disposons désormais de 3 loci, auxquels devraient s'ajouter les marqueurs en phase de développement chez F. Bonhomme dans le cadre du programme européen "Genephys". Cette étude entre dans le cadre du réseau "Qualité", avec notamment pour objectif de rechercher des marqueurs d'origine permettant le contrôle d'huîtres d'importation.

- Construction d'une carte de liaison chez l'huître plate *O. edulis* à partir des marqueurs génétiques disponibles : microsatellites et allozymes.

- Etude de la différenciation de populations européennes d'huîtres plates (*O. edulis*) à l'aide de marqueurs microsatellites. Cette étude permettra d'avoir une meilleure connaissance des ressources génétiques chez cette espèce, particulièrement importante dans le cadre du programme de sélection pour la résistance à la Bonamiose.

- Etude phylogénétique de différentes espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea*. Ces travaux seront basés sur le séquençage de l'ADN mitochondrial (16S, Cytochrome Oxydase) afin de pouvoir quantifier le niveau de divergence entre espèces.

* **Acclimatation d'espèces non-indigènes et production d'hybrides.**

Les principales actions envisagées dans le cadre du conservatoire de souches pour 1997 sont les suivantes:

- Poursuite des essais de reproduction intra- et inter-spécifiques des quatre espèces du genre *Crassostrea* actuellement présentes dans la salle de quarantaine : *C. angulata*, *C. rivularis*, *C. sikamea* et *C. virginica*. L'amélioration des conditions de synchronisation de la maturation des animaux servant de géniteurs, devrait permettre de mieux maitriser les nouvelles productions issues de ces différents croisements. Cependant, les infrastructures et les équipements dont dispose aujourd'hui l'écloserie de Ronce-les-bains notamment en matière de capacité d'élevage et de traitement des eaux de rejet de la salle de quarantaine, limitent le développement du conservatoire de souches en ce qui concerne les futures productions et remettent parfois en cause certains aspects du programme. L'agrandissement du laboratoire en 1997-1998 devrait à terme améliorer cette situation.

- L'importation d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* d'origines nouvelles, notamment du Japon et de Taïwan est envisagée.

- Une collaboration initiée en 1996 sera développée en 1997 avec l'équipe de C. Thiriot (CNRS, Villefranche-sur-Mer) en ce qui concerne l'étude caryologique des espèces présentes au sein du conservatoire.