

André GERARD

Avril 2000

ifremer



Rapport d'activité 1999

Laboratoire Génétique et Pathologie

Station de La Tremblade



Station IFREMER
Laboratoire Génétique et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade (FRANCE)
Tél. : 05 46 36 98 36
Fax. : 05 46 36 37 51

Rapport d'activité 1999
du laboratoire
GENETIQUE et PATHOLOGIE
DRV / RA / LGP
La Tremblade

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

Tél. : 05 46 36 98 36

Fax. : 05 46 36 37 51

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

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
AVANT-PROPOS	5
Extension des bâtiments de Ronce	5
Ouragan.....	5
OBJECTIFS ET PROGRAMMES	7
Objectifs.....	7
Programmes	7
MOYENS ET EFFECTIFS	9
Personnel administratif et logistique	9
Stagiaires.....	10
Budgets 1999	10
Infrastructures	10
Matériel	11
PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1999	13
THÈME : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER CÔTIÈRE.	13
Programme : <i>Surveillance et évaluation des ressources côtières.</i>	13
Sous-programme : Suivi des maladies des mollusques.	13
REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques).....	13
Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des mollusques	13
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.	13
Programme : <i>Santé des populations d'élevage.</i>	13
Sous-programme : Mécanisme de défense.....	13
Bonamiose.....	13
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.	13
Programme : <i>Santé des populations d'élevage.</i>	13
Sous-programme : Agents pathogènes et épidémiologie.	13
Pathologie à virus de type herpès	13
<u>a) Caractérisation du virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse</u>	13
Bonamiose.....	13
Marteiliose.....	13
Etudes bactériologiques	13
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.	13
Programme : <i>Amélioration génétique des espèces aquacoles.</i>	13
Sous-programme : Ressources génétiques.	13
Marqueurs génétiques	13
Ressources génétiques des huîtres creuses.....	13
THÈME : OPTIMISATION & DÉVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.	13
Programme : <i>Amélioration génétique des espèces aquacoles.</i>	13
Sous-programme : Amélioration & sélection de souches.	13
Polyploïdisation.....	13
Sélection de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i>	13
Sélection de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	13
FONCTIONNEMENT GENERAL DU LABORATOIRE	13
Animation et responsabilités scientifique.....	13
Activités d'avis ou d'expertise	13
Missions à l'étranger et coopération internationale.....	13

Participation à des projets européens	13
Réunions contrats CEE	13
Assistance technique.....	13
Astreintes	13
Manifestations	13
Visites	13
Accueil de chercheurs.....	13
Accueil de chercheurs doctorants	13
Jury de thèse ou de mémoire d'étudiant.....	13
Formations reçues.....	13
Formations dispensées.....	13
Formations internes organisées par le laboratoire.....	13
PUBLICATIONS 1999	13
Bibliothèque	13
Revue à comité de lecture.....	13
<i>Sous presse</i>	13
Colloques et congrès	13
Rapports finaux de contrat.....	13
Rapports intermédiaires de contrat ou de convention.....	13
Rapport de missions à l'étranger	13
Thèses et mémoires	13
Mémoires d'étudiants	13
Documents de travail de laboratoire.....	13
Documents techniques, plaquettes, lettres aux médias.....	13



PLANCHE 1



L'inauguration de l'extension de Ronce, le 8 mars 1999.
De gauche à droite : Mr Jean-Pierre Taillieu (Conseiller Général et Maire de La Tremblade),
Mr Max Camus (Sous-Préfet),
Mr Pierre David (PDG de l'Ifremer),
Mr Didier Quentin (Député de Marennes-Oléron-Royan),
Mr Claude Belot (Président du Conseil Général de Charente-Maritime),
Mr Gérard Fontenay (Conseiller Régional représentant J. P. Raffarin)



Vue aérienne du site de Ronce-les-Bains.

AVANT-PROPOS

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station IFREMER de La Tremblade est composée de trois laboratoires qui développent des recherches dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Deux événements importants ont marqués la station durant l'année 1999 :

- Le regroupement sur un seul site des équipes scientifiques
- L'ouragan du 27/12/99

Extension des bâtiments de Ronce

La station de La Tremblade était jusqu'au début de l'année 1999 implantée sur deux sites différents, Mus du Loup et Ronce-les-Bains, ce qui ne facilitait pas les échanges entre les équipes ni les aspects logistiques.

En 1996, Pierre David, PDG de l'IFREMER, décide de construire une extension aux bâtiments de Ronce-les-Bains afin de regrouper les équipes sur le même site. Débutés au mois de juin 1998, les travaux d'extension se sont achevés au mois de janvier 1999.

D'une durée de 10 mois environ, ces travaux ont généré une dépense de 7,7MF, l'IFREMER n'a pu réaliser ces travaux que grâce au soutien financier des Collectivités Territoriales (Région 1,35 MF, Département 1,2 MF) et de l'Etat (FEDER 3 MF). Les nouveaux locaux ont permis de réunir les équipes scientifiques de Mus du Loup et de Ronce les Bains, et de prévoir de nouveaux laboratoires, notamment le premier laboratoire de bactériologie accrédité de l'IFREMER.

Une bonne centaine de personnes, parmi lesquelles, le PDG, les Directeurs opérationnels et administratifs parisiens et nantais, les représentants des collectivités territoriales, le personnel de la station, se sont retrouvées à La Tremblade le 8 mars 1999 pour inaugurer les 1400m² supplémentaires de locaux.

Le Laboratoire de Génétique et de Pathologie a bénéficié dans cette extension, d'un nouveau conservatoire de souches, d'une salle de bactériologie, de 6 bureaux pour l'équipe de génétique et de divers locaux communs aux trois laboratoires (salles de réunion, bibliothèque...).

Ouragan

Dans la nuit du 27 au 28 décembre 1999, une tempête d'une violence inouïe accompagnée de vents de plus de 200 km/h, a frappé le littoral atlantique occasionnant des dégâts considérables à terre comme en mer. Les entreprises ostréicoles ont payé un lourd tribut à cette tempête, inondation des structures liée à la rupture des digues, destruction des cabanes et du matériel ostréicoles, destruction des lignes électriques et téléphoniques, parcs ostréicoles dévastés,...

Les bâtiments de Ronce-les-Bains, comme toutes les installations aquacoles locales ont été endommagés par l'ouragan, 500 KF de réparations ont été nécessaires et les dégâts ont occasionné de nombreuses perturbations dans les programmes du laboratoire.

PLANCHE 2



Dégâts occasionnés par la tempête aux parcs ostréicoles



Une vue des installations aquacoles de Ronce-les-Bains au matin du 28/12/1999

OBJECTIFS ET PROGRAMMES

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

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** : testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture; 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.

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

Programmes

Le plan stratégique 1996-2000 de l'IFREMER fixe les 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 travaux du laboratoire LGP s'inscrivent dans deux de ces thèmes, avec les programmes et sous-programmes suivants :

- Thème : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER COTIERE.
 - Programme 2 : Surveillance et évaluation des ressources côtières.
 - Sous-programme 2 : Suivi des maladies des mollusques.
 - ⇒ Réseau de Pathologie des Mollusques (REPAMO).
 - ⇒ Organisation et réalisation des tâches qui incombent au Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des mollusques bivalves.

- Thème : OPTIMISATION & DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUACOLES.
 - Programme 3 : Santé des populations d'élevage.
 - Sous-programme 1 : Mécanismes de défense.
 - ⇒ Bonamiose et mécanismes cellulaires de défense.
 - Sous-programme 2 : agents pathogènes et épidémiologie.
 - ⇒ Pathologie à virus de type herpès.
 - ⇒ Etude de la Bonamiose.
 - ⇒ 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.
 - ⇒ Ressources génétiques des huîtres creuses.
 - 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*.
 - ⇒ Etude de l'aneuploidie
 - ⇒ Obtention et testage de polyploïdes.

MOYENS ET EFFECTIFS

Personnel scientifique	Chef du laboratoire	André GERARD	
	Cadres	Edouard BEDIER Franck BERTHE Pierre BOUDRY Natahalie COCHENNEC Claude DELSERT Sylvie LAPEGUE Tristan RENAULT Anne THEBAULT	Equipe génétique Equipe pathologie Equipe génétique Equipe pathologie Virologiste, détaché à Montpellier Equipe génétique Equipe pathologie Equipe pathologie
	Techniciens	Frédéric BLOUIN Bruno CHOLLET Serge HEURTEBISE Christophe LEDU Pascal PHELIPOT	Equipe pathologie et génétique Equipe pathologie Equipe génétique Equipe génétique Equipe génétique
	Doctorants	Isabelle ARZUL Corinne AUDEMARD Arnaud HUVET Magalie WAECHTER	IFREMER IFREMER IFREMER Thèse CIFRE : Grainocéan
	Post-doctorant	Frédérique LE ROUX Mike HINE LORENZO Gemma	Université de Lyon, projet "MARS" Post-doctorant de Nouvelle Zélande dans le cadre du laboratoire communautaire de référence. Post-doctorante espagnole dans le cadre du projet "MARS", stage de 4 mois.
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	Delphine ROUSIC (DRV/RA) assure l'accueil, le standard téléphonique, le secrétariat (réorganisation informatique) et la gestion des congés et missions pour le chef de station et pour tout le personnel du laboratoire LGP. Martine GRASSET (DRV/RA) assure la comptabilité du laboratoire GAP et des comptes logistiques de la station.		
Bibliothèques	Florence ALBERT-RIVET (DRV/RA) assure l'organisation des bibliothèques et l'ensemble de la documentation des deux implantations de La Tremblade. Ce travail se fait en étroite collaboration avec les bibliothèques de Nantes (Michelle l'EXCELLENT et Annick RADENAC) et de Brest (Gilles CHATRY).		
Entretien et logistique	Emile PLANCHE (DGD) assure l'entretien des bâtiments et plus particulièrement celui des circuits hydrauliques. Il participe activement à tous les travaux		

- 8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

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

- 8 salles humides (Quarantaine, Conservatoire de souches étrangères, Micronurserie, Maturation, Stockage de souches, Elevages larvaires, Physiologie, Haute sécurité sans rejet en mer),
- 1 salle expérimentale climatisée
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire de biométrie et une salle informatique,
- 1 laboratoire de bactériologie,
- 8 annexes techniques (Local des pompes, Local de l'ozoneur, 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 m³ de réserve d'eau de mer,
- 23 pompes de 10 à 300 m³/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation à l'ozone des eaux de rejet,
- 4 bassins de 20 m³ pour la production en masse de phytoplancton.

Matériel

Le matériel scientifique principal est constitué par :

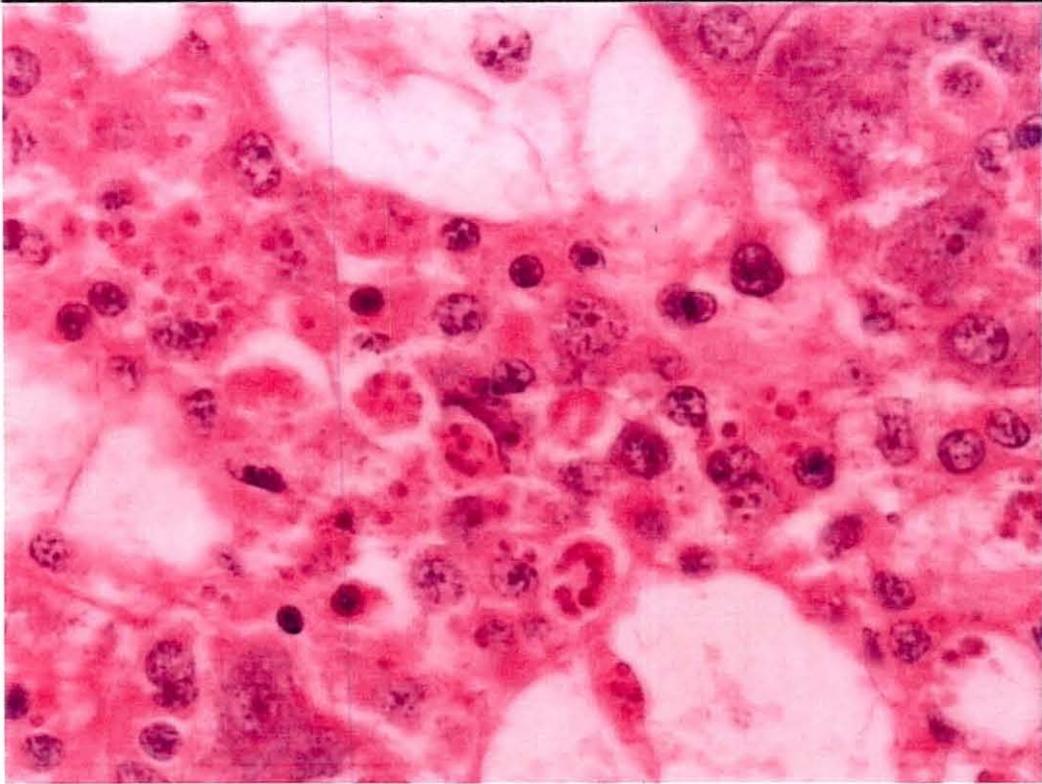
- 1 microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200 EX,
- 11 microscopes dont 2 sont équipés en épifluorescence,
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers un ordinateur pour les mesures de croissance larvaire,
- 1 analyseur d'images SAMBA™ 2005 d' Alcatel 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 d'acquisition d'images ou de 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 et d'un ordinateur. 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...
- Du matériel de biologie moléculaire : 7 appareils PCR, 1 four à hybridation, 1 scintillateur Packard, des microcentrifugeuses de paillasse, Speed Vac, générateurs, séquenceur manuel, sécheurs de gel... pour les études de marqueurs génétiques, la mise au point d'outils de diagnostic en pathologie, le séquençage d'ADN...
- Du matériel d'histologie : 1 cryotome JUNG, 1 automate LKB à déshydratation et imprégnation des pièces histologiques, 1 platine inclusion paraffine pour pièces histologiques LKB, 1 système d'acquisition d'images histologiques (KONTRON Elektronik Imaging System).
- 1 ultracentrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse BECKMAN, 1 centrifugeuse JOUAN CR 4-11, 1 cyto-centrifugeuse HETTICH.
- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton, 2 congélateurs -80°C, 1 étuve CO₂ FORMA SCIENTIFIC, 3 étuves MEMMERT, 2 autoclaves,

- 1 lecteur ELISA, matériel électrophorèse (cuve et générateurs).
- Un réseau informatique éthernet et internet SUN comprenant une trentaine d'ordinateurs dédiés à la gestion de la station et du laboratoire, au travail scientifique et à l'acquisition de données dont un dispositif d'acquisition d'images numériques des gels d'électrophorèse permettant de traiter les images en tout point du laboratoire via le réseau informatique.

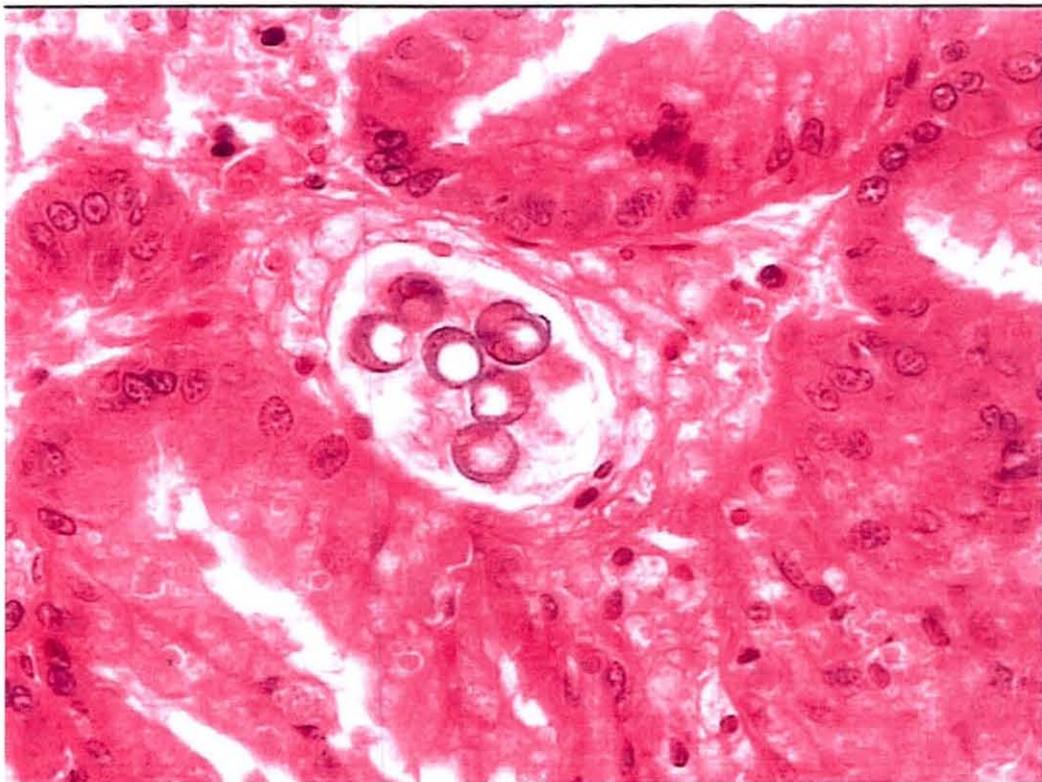
Acquisition 1999 :

- 1 Cytomètre en flux Coulter EPICS XL4C Flow Center (Beckman Coulter). Cet appareil monolaser est capable de mesurer quatre émissions de fluorescence différentes. Il est utilisé au laboratoire pour étudier et caractériser les hémocytes, les cellules immunitaires chez les bivalves marins. Les travaux réalisés devraient également permettre de comprendre par quels mécanismes ces cellules dégradent certains agents infectieux.

PLANCHE 3



Le parasite *Bonamia ostreae* observé au microscope optique après coloration de coupes histologiques d'huître plate, *Ostrea edulis*.



Le parasite *Perkinsus atlanticus* observé au microscope optique après coloration de coupes histologiques de palourde, *Ruditapes decussatus*.

PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN 1999

Thème : observation et surveillance de la mer côtière.

Programme : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

Sous-programme : *Suivi des maladies des mollusques.*

REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques)

Rappel des objectifs

La législation européenne a défini les objectifs du REPAMO à travers deux Directives, la Directive 91/67/CEE du 28 Janvier 1991 et la Directive 95/70/CEE du 22 Décembre 1995.

Les activités du REPAMO qui font partie des missions institutionnelles de l'Institut, visent à assurer le contrôle de l'évolution des épidémies pour les maladies à déclaration obligatoire (bonamiose et marteilliose), la surveillance de base pour l'ensemble du cheptel conchylicole français, (espèces exploitées et bancs naturels), l'étude des cas de mortalité anormale, le contrôle des animaux vivants échangés entre les pays de l'Union Européenne et la France, ainsi qu'entre les pays tiers et la France.

Au sein d'IFREMER, une douzaine de laboratoires côtiers se chargent des prélèvements et du suivi des données environnementales qui sont transmis à la cellule d'analyse la plus proche. Trois cellules de veille zoosanitaire au sein des laboratoires de Palavas, La Tremblade et La Trinité/Mer ont en charge leur zone respective du littoral français. La coordination des activités du réseau est assurée depuis le laboratoire de Génétique et de Pathologie de La Tremblade. La gestion des cas de mortalités anormales se fait en collaboration avec les professionnels et les Affaires Maritimes.

Animateur du réseau : Anne THEBAULT.

Actions réalisées dans le cadre du REPAMO en 1999

- Le nombre d'analyses réalisées (environ 20 000) est comparable à celles de l'année dernière, avec toujours une tendance à la diversification des techniques. Le nombre d'espèces cibles ne semble plus évoluer.
- Différentes collaborations se sont mises en place avec la DEL : participation à un **thésaurus juridique** commun à l'usage des laboratoires côtiers, mise en place d'un suivi de pathologie des larves de *Crassostrea gigas* dans les zones de captage, extension du suivi du naissain sur Arcachon.
- Les déclarations de cas de mortalités anormales de naissain ont peu nombreuses cette année. Le virus de tupe herpès n'a été que très faiblement

défecté.

- Un épisode de mortalités de moules dans l'Aber Benoît, lié à une très forte infestation en *Marteila refringens*, a permis d'écarter l'hypothèse d'une nouvelle souche de *Marteilia*. On peut suspecter une sensibilité particulière de ces moules d'origine irlandaise ou une conduite zootechnique particulièrement agressive pouvant être à l'origine des troubles observés.
- Une collaboration avec le SMEL, le LPI de Brest et le laboratoire de la Trinité a permis d'identifier l'origine bactérienne des mortalités anormales d'ormeaux en éclosérie. Cette piste pourra être explorée dans le cadre des mortalités anormales d'ormeaux dans le milieu naturel.
- La réunion annuelle du REPAMO, regroupant les différents intervenants IFREMER du réseau a été l'occasion de faire le point sur les demandes éventuelles en épidémiologie descriptive pour les principales pathologies étudiées au sein du LGP, et, de comprendre l'apport de nouvelles techniques diagnostiques pour le réseau. Les études de mortalités anormales ont montré l'importance d'une approche pluridisciplinaire et d'une utilisation de sites ateliers. Au cours de cette réunion, il a été décidé de mettre en place un suivi histologique d'huîtres creuses, hors mortalité, dans le cadre de la vigilance vis à vis des maladies exotiques.
- A la demande de la DGAL et de la DPMCM, une stratégie d'échantillonnage a été proposée pour les transferts de coquillages vivants.
- Les informations concernant le REPAMO sont diffusées à une liste de 55 destinataires de l'IFREMER, des administrations et de la profession ostréicole.

Actions spécifiques de la cellule veille de La Tremblade

La cellule de veille de la Tremblade assure le suivi des analyses zoosanitaires sur les principales espèces de mollusques marins de la Baie de Bourgneuf, du bassin de Marennes Oléron et de la baie d'Arcachon. Le départ de l'analyste en histologie de la cellule de veille de la Trinité a entraîné la réorganisation du travail entre ces deux cellules de veille, toutes les lectures histologiques de la côte atlantique française a donc été effectuée par la cellule de veille de la Tremblade. Les principaux résultats sont les suivants :

- Le suivi de base :
 - Un effort particulier d'analyse a porté sur un gisement de palourdes *Ruditapes philippinarum*, du bassin d'Arcachon. Le suivi mensuel montre des variations saisonnières des différents parasites rencontrés : *Perkinsus atlanticus*, *Paravortex*, *Rickettsias* et Trématodes. Des anomalies de calcification du muscle ont régulièrement été relevées. Les premiers examens en microscopie électronique n'ont pas révélé d'agents infectieux associés à ces lésions.
 - Un lot de naissain d'huîtres creuses a été analysé pour défaut de croissance. Les résultats ont révélés la présence d'haplosporidies en histologie. L'utilisation d'une sonde ADN en hybridation in situ a montré que ces haplosporidies étaient de l'espèce *Haplosporidium nelsoni*.
 - Suite aux mortalités anormales de larves de *Crassostrea gigas* décrites l'année précédente dans le bassin d'Arcachon, les cohortes de larves d'Arcachon et de Charente ont fait l'objet d'un suivi en collaboration avec le laboratoire d'Arcachon. Aucune anomalie n'a été décelée cette année.

Laboratoire
Communautaire de
Référence pour les
maladies des
mollusques

Laboratoire OIE de
Référence pour les
maladies des
mollusques

Rappel des objectifs :

Le laboratoire de Génétique et Pathologie est **Laboratoire de Référence pour les maladies des mollusques** pour l'Union Européenne et pour l'Office International des Epizooties. Les fonctions et obligations du laboratoire communautaire de référence sont données par l'annexe B de la Directive 95/70/CE et sont équivalentes aux mandats des laboratoires de référence pour l'Office International des Epizooties.

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

- a) en constituant et entretenant un ensemble de lames histologiques, de souches ou de cultures des agents pathogènes concernés et en les mettant à la disposition des laboratoires agréés par les Etats membres,
- b) en organisant périodiquement des essais comparatifs des procédures de diagnostic utilisées au niveau communautaire,
- c) en collectant et en compilant des données et des informations relatives aux méthodes les plus modernes et les mieux adaptées afin de permettre une meilleure compréhension de l'épizootiologie de la maladie,
- d) en se tenant informé des progrès accomplis dans le monde en matière de surveillance, d'épidémiologie et de prévention des maladies concernées,
- e) en maintenant les compétences relatives aux agents pathogènes des maladies concernées afin de permettre un diagnostic différentiel rapide.

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

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

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

Animateur des mandats confiés au laboratoire de référence : Franck BERTHE.

Actions réalisées en 1999 :

Constitution des collections de matériel de référence : une lamothèque a été constituée en 1997 et est régulièrement complétée. Elle comprend aujourd'hui plus de 60 références cataloguées, couvrant les principaux agents pathogènes et maladies connus chez les mollusques bivalves. Des blocs histologiques sont annexés à la lamothèque, dans la mesure du possible, afin de pouvoir distribuer des lames de référence. Cette collection de lames peut être consultée sur place au laboratoire.

Une collection de 25 souches bactériennes de référence a aussi été constituée dans le but de mettre à disposition des laboratoires de diagnostic, un ensemble de souches réputées pathogènes ou fréquemment isolées à partir de mollusques

bivalves.

Matériel de référence distribué : différents laboratoires ont pu bénéficier, à leur demande, d'envois de coupes histologiques et/ou de souches bactériennes. Pour l'essentiel en 1999, le matériel de référence demandé concernait *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*, le virus de type herpès. Des coupes d'ormeaux ont été également demandées.

Réglementation zoosanitaire : le laboratoire travaille à une mise à jour de la réglementation européenne en matière zoosanitaire. Une analyse critique de la réglementation européenne a été réalisée dans cette perspective de mise à jour (Berthe et Thébault. E.U. Directives for the control of diseases affecting bivalve molluscs : current state and prospects. Verona meeting, 11-12 February 1999).

Le laboratoire assure une représentation lors des réunions de la Commission des Maladies des Animaux Aquatiques de l'Office International des Epizooties. En 1999, le travail réalisé s'est plus particulièrement attaché à la révision du Code et Manuel pour le diagnostic des Maladies des Animaux Aquatiques qui devrait être édité en 2000.

Collecte des informations en épidémiologie : les pays membres fournissent des informations en termes d'épidémiosurveillance et d'épidémiologie pour les mollusques bivalves. En 1999, les éléments dominants sont des mortalités anormales d'huîtres plates, *O. edulis*, en Grèce, mortalités anormales de juvéniles de *C. gigas* en Basse Californie (Mexique), et en Afrique du sud. En éclosion, des mortalités anormales ont été signalées en Australie. Tous ces épisodes font ou ont fait l'objet d'analyses.

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

Maintien des compétences du laboratoire : les principales compétences du laboratoire, en matière de diagnostic, relèvent de l'histologie et de la microscopie électronique, de la biologie moléculaire et de la bactériologie, dans le cadre de la participation au programme national d'épidémiosurveillance (voir Repamo) et diagnostics effectués pour des pays membres.

Développement de méthodes de diagnostic : les principaux résultats concernent la mise au point de méthodes de détection et d'identification moléculaire des parasites (*Marteilia refringens*, et *Bonamia ostreae*). Une réflexion sur l'utilisation de tels outils a été menée tant pour la PCR que l'hybridation *in situ*. Cette réflexion a notamment été nourrie lors de deux ateliers de travail pour la FAO en février 99 à Bangkok et dans le cadre de l'EAFF en septembre 99 à Rhodes.

La méthode de détection du parasite *Haplosporidium nelsoni* en hybridation *in situ* à l'aide d'une oligosonde a été mise en place au laboratoire. L'utilisation de cette sonde a conduit à des résultats positifs sur des échantillons d'huître creuse.

Assistance technique aux pays membres et pays tiers : le laboratoire de référence a été sollicité pour diagnostic et/ou avis sur des mollusques en provenance de Croatie, Italie, Pays Bas, Australie, Mexique, Afrique du sud, Nouvelle Zélande, Corée, et Tunisie.

Formation des experts des laboratoires nationaux : la formation du personnel des laboratoires nationaux pour l'Union Européenne avait été proposée sous forme d'accueil individuel en 1999, suite aux résultats du réseau

d'essai de 1998. Deux collègues norvégiens sont venus à La Tremblade dans ce cadre.

En novembre aux Philippines, une formation de 12 personnes de pays d'Asie (Philippines, Corée, Japon, Vietnam, Malaisie, Indonésie et Thaïlande) a été dispensée par le laboratoire de référence avec le partenariat financier de l'OIE, FAO, NACA, SEAFDEC. Ce cours, prévu en trois phases, devrait déboucher sur la mise en place d'un réseau régional de compétences.

Une formation a été dispensée également pour la Tunisie (Salammbô, octobre 99) et pour l'Ukraine (Sevastopol, juin 99).

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

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

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

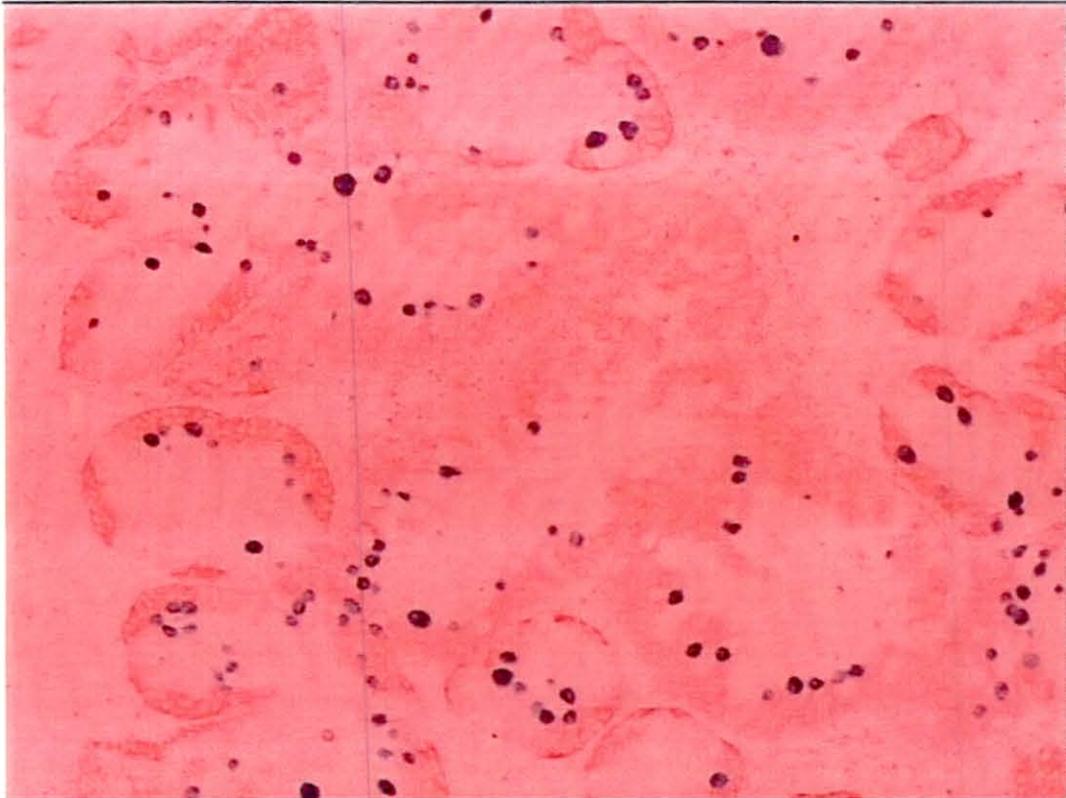
Une liste électronique, Reflabnet, permet de faire circuler les informations à l'ensemble des laboratoires nationaux de référence (reflabnet@IFREMER.fr).

Collaborations développées en ce qui concerne les maladies exotiques : La collaboration relève essentiellement de l'échange d'informations et/ou de matériel biologique pour la constitution des collections.

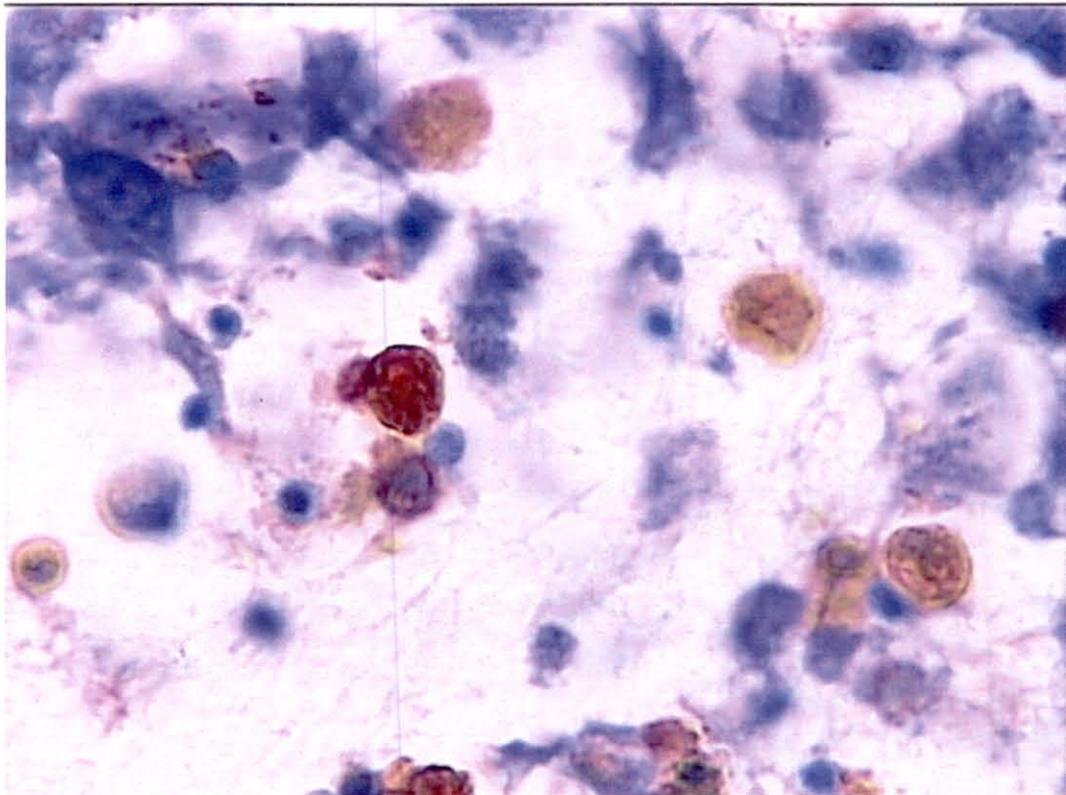
Un groupe d'étude des mikrocells (*Bonamia*, *Mikrocytos*) a été établi avec la participation active de Susan Bower (Canada), Mike Hine (New Zealand), G. Burreson (USA), Judith Handler et Brian Jones (Australie).

Une liste électronique PerKID a été créée qui a pour vocation d'animer un groupe de réflexion sur les parasites du genre *Perkinsus*. (perkid@IFREMER.fr).

PLANCHE 4



-Hybridation in situ à l'aide d'une sonde ADN spécifique du parasite *Marteilia refringens*, sur coupe histologique d'huître plate *Ostrea edulis*



Fragmentation de l'ADN (apoptose) sur coupe histologique de tissu nerveux d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectée par le virus de type herpès. Les cellules apoptotiques apparaissent colorées en brun.

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Mécanisme de défense.

Bonamiose

Rappel des objectifs

Le premier volet des recherches concernant la Bonamiose est l'étude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par l'huître plate dans l'infection par *Bonamia ostreae*. Ce programme fait partie d'un projet européen intitulé «Environmental Factors and Shellfish Diseases ».

Les objectifs généraux sont :

- Identifier des facteurs environnementaux intervenant dans l'immuno-modulation des mécanismes cellulaires de défense en utilisant le modèle biologique : Huître plate/*Bonamia ostreae*.

Les objectifs de cette première année étaient :

- Identifier et développer des marqueurs cellulaires utilisables en cytométrie de flux permettant de quantifier la réponse immunitaire.

Responsable programme : Nathalie COCHENNEC

Résultats 1999

Des lectines hétérologues ont été utilisées, dans un premier temps en cyto-immunofluorescence, et ont permis de marquer spécifiquement des populations hémocytaires de l'huître plate. La distribution de ces lectines a été étudiée dans des populations présentant des statuts différents d'infection (sains, parasités). Le marquage des populations cellulaires infectées est statistiquement plus important que celui des populations saines. Ces résultats préliminaires devront être confirmés en utilisant la technique de cytométrie en flux. D'autre part, d'autre marqueurs, au niveau fonctionnel, test de phagocytose, test de cytotoxicité, recherche d'enzymes lysosomiales et activité de la flambée oxydative seront mis au point et étudiés chez différentes populations d'huîtres.

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Santé des populations d'élevage.

Sous-programme : Agents pathogènes et épidémiologie.

Pathologie à virus
de type herpès

Rappel des objectifs

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

Les objectifs de ce programme pour l'année 1999 étaient les suivants :

- ◆ caractériser le virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en étudiant l'organisation de son génome, en identifiant des gènes et des protéines immunogènes ;
- ◆ rechercher une certaine diversité existante au sein des virus de type herpès infectant les coquillages;
- ◆ tenter d'induire une infection virale exprimée ou latente chez des huîtres adultes en inoculant des broyats de larves infectées par voie intracardiaque et de montrer que ce stade de développement pouvait être un réservoir de virus (transmission verticale ou pseudo-verticale).;
- ◆ comprendre les facteurs qui permettent aux virus de type herpès de s'établir et de se développer chez les huîtres

Responsable programme : Tristan RENAULT

Résultats 1999

a) Caractérisation du virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse

Ce travail a été entrepris dans le cadre du Programme Européen VINO (FAIR-CT98-4334) en collaboration avec A Davison (Medical Research Council, Glasgow, Ecosse) et F. Xhonneux (Eurogentec, Seraing, Belgique). De l'ADN extrait de particules virales purifiées à partir de larves infectées d'huître creuse, *Crassostrea gigas* a été fourni par notre laboratoire à A. Davison pour clonage et séquençage.

Le génome viral est un ADN double brin d'environ 210 kpb présentant un pourcentage de GC de 39%. Ce génome de grande taille est compatible avec celui des herpesvirus (120 à 220 kpb). Il est organisé en deux groupes de séquences terminales, répétitives et inversées à l'intérieur du génome. Cette organisation est proche de celle des herpès simplex humains (groupe E).

La presque totalité du génome viral a été également séquencé (A. Davison, Glasgow). Cependant, la séquence des deux extrémités du génome viral n'est pas encore connue. Un certain nombre de gènes a pu être ainsi identifié : gènes codant pour une ADN polymérase, une déoxyuridine triphosphatase, une ribonucléotide réductase, une hélicase, une terminase, des protéines de membrane et des protéines inhibant l'apoptose. Tous les gènes identifiés ne sont pas spécifiques des herpesvirus ou ne présentent pas d'homologies flagrantes avec ceux identifiés chez des membres de la famille des *Herpesviridae*, à l'exception du gène de la terminase. Cette enzyme est caractéristique des

herpesvirus et assure la condensation de l'ADN viral dans les capsides. D'autres enzymes caractéristiques de ces virus n'ont quant à elles pas été identifiées (protéine kinase et uracyl-DNA glycosylase).

Les résultats obtenus montrent que le virus infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, n'est pas étroitement associé aux herpesvirus décrits chez les vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons). Ce serait un herpesvirus qui aurait évolué chez des hôtes invertébrés. En particulier, il ne semble pas que les bivalves aient été contaminés du fait de leur mode de nutrition (filtration) par un virus de vertébrés présent dans le milieu et ayant trouvé un terrain favorable chez ces hôtes pour se développer.

Les données indiquent que le virus observé chez les larves d'huître creuse pourrait être le premier membre identifié d'un troisième groupe de virus au sein de la famille des *Herpesviridae*, en plus du groupe des virus infectant les mammifères, oiseaux et reptiles et celui des agents détectés chez les amphibiens et les poissons : le groupe des herpesvirus infectant les invertébrés.

A partir d'une banque en phages λ préparée par A. Davison (Medical Research Council, Ecosse), F. Xhonneux (Eurogentec, Belgique) a pu identifier deux gènes codant pour des protéines immunogènes. Des anticorps polyclonaux spécifiques du virus de type herpes, fournis par notre laboratoire, ont été utilisés pour réaliser ce travail. Ainsi, un gène codant pour une protéine de 748 acides aminés possédant une région hydrophobe et des sites de glycosylation potentiels a été identifié. Cette protéine possède toutes les caractéristiques d'une glycoprotéine de membrane et pourrait être un antigène viral de surface (glycoprotéine présente à la surface de l'enveloppe virale). Un autre gène a été également identifié en utilisant les anticorps polyclonaux anti-virus de type herpes. Ce dernier code pour une protéine qui présente des homologies avec des protéines inhibitrices de l'apoptose chez les mammifères (IAP1 chez l'homme et IAP2 chez le rat). L'identification de ce type de gènes va permettre dans une seconde étape de produire des protéines virales recombinantes et ensuite d'obtenir des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques de ces protéines.

b) Diversité des virus de type herpes infectant les bivalves

Le fait d'observer des virus de ce type chez plusieurs espèces de bivalve dans différents pays dans le monde soulève différentes questions :

- ❖ Un même virus est-il capable d'infecter plusieurs espèces de bivalve différentes ?
- ❖ Existe-t-il plusieurs virus infectant spécifiquement une espèce de coquillage ?
- ❖ Les virus observés dans différentes régions géographiques correspondent-ils à des virus différents, à un même virus identique ou présentant des variants ?

Pour tenter de répondre à ces questions, deux types d'approche ont été développés dans le cadre d'un travail de thèse (I. Arzul) :

- ❖ une approche basée sur l'utilisation de techniques et d'outils moléculaires (PCR, PCR-RFLP, Southern blotting et séquençage) dans le but d'étudier le génome de virus observé chez des espèces différentes et dans divers lieux géographiques ;
- ❖ une approche basée sur des essais de transmission de l'infection en

utilisant différentes espèces de coquillage.

La première approche a permis de montrer que lors d'un épisode de mortalité observé dans une éclosérie privée en juin 1997 chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, le virus mis en cause était le même. En effet, ce virus présente un certain polymorphisme par rapport au virus de référence et ce polymorphisme est identique chez les deux espèces de bivalves infectées. Les résultats obtenus indiquent très clairement qu'un même virus est capable d'infecter plusieurs espèces de coquillage différentes appartenant à des genres différents.

Il est également possible d'observer du polymorphisme chez les virus de type herpes infectant les bivalves, tout particulièrement dans des zones non codantes du génome. Les travaux sont donc à poursuivre dans ce sens.

L'approche basée sur les essais de transmission interspécifique a également montré qu'un même virus était capable d'induire une infection associée à des mortalités chez des larves axéniques appartenant à des espèces différentes. Ainsi, il a été possible d'observer que les virus détectés chez l'huître plate, *Ostrea edulis* et la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, étaient capables d'induire des mortalités chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. La démonstration de la non-spécificité d'espèce hôte des virus de type herpes est ainsi réalisée chez les bivalves. Un même virus est capable d'infecter plusieurs espèces de bivalve et d'induire des mortalités chez ces animaux. Dans ces conditions, se pose le problème des transferts d'animaux appartenant à des espèces différentes ainsi que celui des élevages multispécifiques en conditions confinées (écloséries/nurseries).

c) Infections à virus de type herpes chez les huîtres adultes

L'objectif de ce travail était en 1999 de tenter d'induire une infection virale exprimée ou latente chez des huîtres adultes en inoculant des broyats de larves infectées par voie intracardiaque et de montrer que ce stade de développement pouvait être un réservoir de virus (transmission verticale ou pseudo-verticale).

Des essais de ce type ont été déjà réalisés en 1994, mais à ce moment les outils disponibles n'ont pas permis d'aboutir à des conclusions claires. Aujourd'hui, le fait de disposer d'outils moléculaires sensibles (PCR, et hybridation *in situ*) permet de reprendre cette problématique. De plus, un standard interne de PCR mis au point en 1998, est intégré dans tous les tubes d'analyse. Il permet en donnant une bande de masse moléculaire connue, de vérifier l'absence d'effets inhibiteurs dans les échantillons analysés. L'absence de cette bande signe la présence de substances inhibitrices dans les échantillons testés.

Un ensemble d'analyses en PCR a été réalisé en 1999 sur des huîtres adultes non-infectées en utilisant différents protocoles de préparation des échantillons. Grâce à l'utilisation du standard interne, il a pu être démontré que la technique de broyage des échantillons suivi d'un traitement par la chaleur était associée à un phénomène intense d'inhibition de la réaction de PCR. Ce type de phénomène n'était pas observé lorsqu'un protocole d'extraction classique au phénol/chloroforme était utilisé pour préparer les échantillons.

Ces résultats obtenus, des essais d'infection d'huîtres adultes ont alors été entrepris. Les animaux ont fait l'objet d'analyse en hybridation *in situ*, au moyen d'anticorps polyclonaux spécifiques du virus et en PCR. Il a été ainsi possible de détecter de l'ADN viral ainsi que des protéines du virus chez des animaux adultes présentant ou non des mortalités.

Ainsi, en utilisant des techniques moléculaires sensibles, il est possible de détecter des constituants viraux chez des animaux adultes. Les essais seront poursuivis en 2000.

d) Etude de la pathogénèse des infections à virus de type herpès chez les bivalves

Les outils moléculaires développés ces dernières années ont rendu plus facile la compréhension des facteurs qui permettent aux virus de type herpès de s'établir et de se développer chez les huîtres. Dans ce cadre, les travaux réalisés en 1999, ont suivi deux axes :

- ❖ la recherche chez les huîtres de substances solubles anti-virales induites ou non-induites par les virus de type herpès ;
- ❖ la mise en évidence du phénomène d'apoptose chez les huîtres en relation avec les infections à virus de type herpès.

Le premier axe de recherche est développé en collaboration avec N. Bourgougnon du LBEM de l'Université de La Rochelle (accueil d'un stagiaire EPHE, S. Deniau, pour une durée de deux ans au laboratoire de La Tremblade). Dans ce cadre, des travaux préliminaires ont été initiés en 1999. Ils consistaient à rechercher des effets protecteurs dans différents types d'échantillons d'huître sur des cultures de cellules mammaliennes (VERO) infectées par le virus HSV1 (herpès simplex 1). Les premiers résultats obtenus montrent en effet que certains échantillons peuvent présenter un effet protecteur sur les cellules VERO. Cependant, d'autres échantillons présentent des effets inverses. Ces travaux seront poursuivis en 2000.

Le second axe de recherche a consisté à tenter de mettre en évidence le phénomène d'apoptose chez les huîtres en association aux infections à virus de type herpès. Des observations en microscopie électronique à transmission ont permis d'observer des phénomènes de condensation nucléaire intense dans certains types cellulaires chez les animaux infectés. Ces observations laissaient suspecter une mort cellulaire programmée de ces cellules. Ces données ont été confirmées par la mise en évidence d'une fragmentation de l'ADN par la technique de terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick endlabelling (TUNEL) au moyen d'un kit du commerce (Boehringer). Cette technique permet de visualiser les fragments d'ADN formés lors du processus d'apoptose. Des différences ont été également observées quant à la quantité de cellules apoptotiques détectées en fonction de l'organe ou du tissu considéré chez des jeunes huîtres infectées laissant suspecter que l'intensité du phénomène peut varier en fonction du type cellulaire.

Ces travaux seront poursuivis en 2000 par des essais d'induction d'apoptose par les virus de type herpès sur hémocytes maintenus en culture. La recherche des cellules apoptotiques se fera par le biais de la détection de cellules marquées par l'Annexin V au moyen d'un cytomètre en flux.

Bonamiose

Rappel des objectifs

Caractérisation ultrastructurale et moléculaire du parasite *Bonamia ostreae*

- Préciser la taxonomie du parasite *Bonamia ostreae*
- Rechercher les affinités taxonomiques du parasite *B. ostreae* avec les parasites du groupe Mikrocell présents dans l'hémisphère nord (*Mikrocytos mackini*) et dans l'hémisphère sud (*Mikrocytos roughleyi* et *Bonamia sp.*)

Mise au point d'outils moléculaires de détection

- Disposer d'outils de spéciation des parasites du groupe Mikrocell utilisables en diagnostic de routine (PCR, PCR-RFLP, Hybridation *in situ*)

Responsable programme : Nathalie COCHENNEC

Résultats 1999

Caractérisation ultrastructurale et moléculaire du parasite *Bonamia ostreae*

La séquence des gènes de la petite sous unité ribosomale (SSU rDNA) de *Bonamia ostreae* a permis de préciser sa position taxonomique au sein du phylum des Haplosporidies. D'autre part la quasi-totalité de ce même gène a été séquencé pour *Bonamia sp (Tiostrongia chilensis)*. Cette partie présente 97% d'homologie avec la séquence de *Bonamia ostreae* et permet de vérifier qu'il s'agit d'une espèce différente. Le séquençage des ITS devra être poursuivi pour confirmer ces premiers résultats.

Le séquençage des gènes 18S des autres parasites n'a pas été possible en raison de la médiocre qualité des échantillons reçus. Toutefois il a été possible, à partir de tissus fixés, en utilisant des amorces spécifiques de *Bonamia ostreae* d'obtenir par PCR une bande de 300 pb (taille attendue) pour l'ADN du parasite *Mikrocytos roughleyi (Saccostrea commercialis)*. Cette portion d'ADN, une fois séquencée, permettra de confirmer ou non l'appartenance de ce parasite au genre *Bonamia*.

La description en microscopies photonique et électronique de *M. roughleyi* a également permis de compléter cette recherche d'affinités.

Mise au point d'outils moléculaires de détection

L'analyse des séquences obtenus nous a permis de dessiner des amorces spécifiques des parasites du genre *Bonamia*. Le diagnostic spécifique des deux espèces *Bonamia ostreae* et *Bonamia sp.* a été mis au point en utilisant la technique de PCR-RFLP. L'obtention de la séquence des ITS devrait permettre de choisir des zones spécifiques à chacun de ces parasites pour dessiner des sondes qui permettront une détection en Hybridation in situ sur coupes histologiques.

Marteillose

Rappel des objectifs

Les deux principaux axes de recherche sont :

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

Responsable programme : Franck BERTHE

Résultats 1999

Cycle de *Marteilia refringens*

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

La recherche d'hôtes intermédiaires potentiels est réalisée dans le modèle "claire" sur la base d'un suivi annuel. La recherche porte sur la macrofaune, méiofaune, zooplancton, de l'eau et du sédiment. La détection a été positive en PCR pour différents compartiments qui pourrait donc intervenir dans le cycle du parasite. Les résultats de PCR ont été confirmés en hybridation *in situ*. Ces résultats sont intégrés dans une conception dynamique du modèle claire.

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

Le séquençage des gènes rRNA de *Marteilia refringens* a permis de préciser la taxonomie du groupe en validant l'existence du phylum des Paramyxa. La phylogénie du phylum Paramyxa sera précisée par le séquençage d'autres gènes d'intérêt (HSP70 par exemple).

D'autre part, les séquences du parasite isolé de moule, *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* et d'huîtres, *Ostrea edulis*, sont identiques pour les isolats de l'Océan Atlantique, Mer Méditerranée et Adriatique. Ces résultats semblent indiquer l'existence d'une seule espèce dans le genre *Marteilia* en Europe.

Toutefois, une étude de typage, sur la base des séquences des ITS, a montré un dimorphisme qui semble lié à l'hôte. Les conséquences de ces résultats, notamment sur la question des vecteurs/réservoirs, ainsi que les raisons de cette affinité des types de parasite pour un hôte sont en cours d'étude.

Etudes
bactériologiques

Rappel des objectifs

L'objectif principal de l'année 1999 était de mener des études en bactériologie en soutien aux activités des écloséries-nurseries de mollusques.

Responsable programme : Franck BERTHE

Résultats 1999

Dans le cadre d'épisodes de mortalité de juvéniles, une étude des flores bactériennes associées a été menée. Des isolements à partir de naissains de *C. gigas* ont été réalisés sur milieux gélosés (Marine Agar, TCBS). Les colonies macroscopiquement différentes sont caractérisées phénotypiquement, conduisant à l'identification des souches correspondantes. La structure de la flore associée aux épisodes de mortalités est étudiée par biotypage en auxanogramme. Quelques souches ont été utilisées en pathologie expérimentale. Certaines de ces souches ont été caractérisées par séquençage de l'ARN16S, ribotypage en Southern blot, et seront identifiées par hybridation quantitative ADN/ADN. L'étude des facteurs de virulence est envisagée.



Induction de la ponte de moules afin d'étudier la zone hybride entre *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* avec des marqueurs moléculaires. Travaux réalisés dans le cadre de l'URM 16.



Crassostrea gigas



Crassostrea angulata



Crassostrea virginica



Crassostrea rivularis

Quatre huîtres du genre *Crassostrea* du conservatoire de souches de La Tremblade .

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Ressources génétiques.

Marqueurs génétiques

Rappel des objectifs

L'étude du polymorphisme de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire est un atout considérable dans les différents domaines que sont la recherche de parenté, l'étude des flux de gènes intra- et inter-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 a été entrepris 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 Crète).

Responsables URM16 : François BONHOMME et André GERARD

Résultats 1999

- Les recherches entreprises en 1999 sur la structure géographique et la diversité génique des populations naturelles d'huître plate (*Ostrea edulis*) ont fait suite aux travaux effectués sur le polymorphisme microsatellitaire dans le cadre de la thèse de S. Launey. Cette dernière étude indiquait des patrons de structuration géographique très congruents avec les allozymes, soit une légère différenciation significative entre les stocks d'Atlantique et de Méditerranée, et à l'intérieur de chaque ensemble. La question se posait donc de savoir quelle est l'origine de cette différenciation génétique et quelles sont les causes possibles de limitation des flux géniques qui en assurent le maintien. Pour cela, nous avons entrepris une caractérisation de la variabilité de l'ADN mitochondrial de 15 populations en provenance du milieu naturel. Ce marqueur génétique, transmis par la voie maternelle, est en effet plus sensible à la dérive et aux effets de fondation à cause de sa taille efficace réduite. Nous avons amplifié un fragment du gène de l'ARN ribosomique 12S. Le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) de ce fragment s'est révélé important: 15 haplotypes ont été détectés dans l'échantillon total. Les haplotypes « A » et « B » sont majoritaires dans tous les échantillons sauf dans ceux de la Mer Noire et de la Norvège, qui présentent des compositions haplotypiques particulières. La diversité moyenne pour l'ADNr 12S est presque la moitié de celle observée pour l'ensemble des locus microsatellites. L'ARN 12S révèle une structure de population plus marquée que les microsatellites. Le Fst global estimé par le marqueur mitochondrial est dix fois plus fort que celui estimé avec les 5 locus microsatellites. Les deux marqueurs indiquent une structuration significative entre les échantillons atlantiques et méditerranéens, ainsi qu'au sein de l'Atlantique. Ils concordent aussi en montrant une différenciation significative des échantillons de la Norvège et de la Mer Noire par rapport au reste. Il existe une corrélation faible mais significative des distances génétiques et géographiques par paires d'échantillons. Cette étude mitochondriale a montré des niveaux de structuration inattendus chez une espèce à phase larvaire planctonique, ce qui est probablement synonyme d'une relative indépendance des différents stocks à une échelle géographique relativement faible.

- La phylogéographie des huîtres de la région sud-atlantique a été étudiée grâce à différentes méthodes de recherche du polymorphisme réalisées sur le fragment mitochondrial 16S. La PCR-RFLP, la SSCP et le séquençage ont été utilisés pour déterminer les haplotypes de 9 populations d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* provenant du Sénégal, de Guyane, de Martinique et du Brésil. Les résultats obtenus par ces 3 méthodes ont permis de montrer que ces 9 populations se différencient en 2 haplotypes : un africain correspondant à l'espèce *Crassostrea gasar* et un martiniquais correspondant à l'espèce *C. rhizophorae*. De plus, *C. gasar*, huître caractéristique des côtes africaines, est présente dans 2 sites d'Amérique du sud, dont un en sympatrie avec *C. rhizophorae* au Brésil. La construction d'un arbre phylogénétique a permis de préciser les positions de ces espèces les unes par rapport aux autres. Ainsi, *C. gasar* a une position intermédiaire entre les groupes *C. gigas* - *C. angulata* et *C. virginica* - *C. rhizophorae*.
- Les études portant sur la différenciation génétique des populations entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* se sont orientées en 1999 sur la recherche d'un isolement reproductif partiel entre les deux taxons. En effet, les études en populations n'ayant montré jusqu'à présent que très peu de mélange entre les deux taxons, l'existence d'un isolement reproductif partiel pouvait être envisagé. L'objectif était de tester expérimentalement cet isolement par croisements *in vitro* entre les deux taxons. La composante femelle étant plus difficile à restituer, nous avons analysé la compétition spermatique vis-à-vis de chaque type de femelles à partir d'un mélange en proportion égale des gamètes mâles des deux taxons. Des embryons ont été prélevés 6 heures après fécondation et analysés par 3 marqueurs microsatellites afin de quantifier les contributions paternelles pour chaque taxon. Les résultats montrent que les gamètes femelles de *C. gigas* sont fécondés de manière égale par les gamètes mâles *C. gigas* et *C. angulata*. Par contre, les gamètes femelles de *C. angulata* ont été significativement mieux fécondés par les gamètes mâles *C. gigas* que par ceux des mâles *C. angulata*. On peut conclure qu'aucun isolement reproductif, même partiel, n'est mis en évidence entre les deux taxons. Ces expériences seront complétées en 2000 par l'étude de la fertilité des hybrides entre les deux taxons.
- La recherche d'un marqueur nucléaire permettant de distinguer *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* a été initiée. Dans un premier temps, le séquençage des ITS de chaque taxon a révélé un faible niveau de divergence nucléotidique équivalent intra- et inter-taxons. Cela confirme la grande proximité génétique entre ces deux taxons. Les recherches s'orientent désormais vers la recherche de marqueurs diagnostiques par la méthode DALP.
- Les marqueurs microsatellites utilisés « en routine » au laboratoire chez *Crassostrea gigas* ont été testés sur 12 autres taxons des genres *Crassostrea* et *Saccostrea*. Deux taxons phylogénétiquement proches de *C. gigas*, *C. ariakensis* et *C. sikamea*, ont donné des résultats positifs. Il s'agit des premiers marqueurs microsatellites disponibles chez ces 2 espèces d'intérêt aquacole.

Ressources génétiques des huîtres creuses

Rappel des objectifs

Le conservatoire de souches d'huîtres creuses, créé au sein de la station IFREMER de La Tremblade en 1992, a pour principaux objectifs :

- l'étude de la différenciation génétique intra et inter-spécifique dans le genre *Crassostrea*
- l'étude des potentialités d'acclimatation d'huîtres d'origines étrangères dans les eaux françaises, afin de pouvoir identifier celles qui pourraient se

substituer à *Crassostrea gigas* en cas d'épizootie majeure sur cette espèce, ou, offrir des possibilités de diversification des productions.

- l'étude des possibilités d'hybridations inter-spécifiques dans le genre *Crassostrea* et des performances des hybrides.
- l'étude des ressources génétiques de l'huître creuse *Crassostrea gigas* à l'échelle mondiale abordée sous l'angle de la variabilité observée à l'aide de marqueurs génétiques et de la variabilité mise en évidence par l'étude comparative de différentes populations cultivées dans des conditions communes d'élevage.

Responsable programme : Pierre BOUDRY

Résultats 1999

- En 1998, la tentative d'hybridation entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea ariakensis* avait permis d'obtenir un lot d'animaux "hybrides" présentant un taux de survie de 30%. En 1999, l'analyse de ces animaux à l'aide d'un marqueur moléculaire nucléaire (marqueur nucléaire diagnostique : 28S en PCR-RFLP), nous a permis de confirmer l'état hybride de l'ensemble des individus produits.
- Les essais de reproductions par croisements intra- et inter-spécifiques entre *Crassostrea gigas* et la première génération de *Crassostrea sikamea*, obtenue au sein du conservatoire de souches en 1995, ont permis de produire 3 lots bi-parentaux de plusieurs centaines d'animaux : un lot *C. gigas* x *C. gigas* (témoin), un lot issu du croisement femelle *C. sikamea* x mâle *C. gigas*, et un lot issu du croisement femelle *C. gigas* x mâle *C. sikamea*. Le lot issu du croisement *C. sikamea* x *C. sikamea* n'a pas survécu en élevage larvaire. Une analyse par marqueur moléculaire nucléaire ITS a été réalisée récemment sur des individus des différents lots. L'état hybride du lot *C. sikamea* x *C. gigas* a été confirmé, mais l'utilisation de marqueurs microsatellites s'avère nécessaire pour définir le statut du lot *C. gigas* x *C. sikamea*. Des juvéniles issus de ces 3 différents croisements ont été comparés dans le cadre d'une étude de physiologie en micro-respiration menée par Maciej Wolowiz (Institut d'Océanographie de l'université de Gdansk) au sein du LCPC en 1999.
- Différents taxons d'huîtres creuses sont maintenus au sein du conservatoire de souches : *C. angulata* (Portugal), *C. sikamea* (USA), *C. virginica* (Canada), *C. gasar* (Sénégal), *C. rhizophorae* (Guyane), *C. ariakensis* (USA), *C. gigas* (Taïwan, Japon), ainsi que deux populations non encore identifiées originaires du Sénégal et du Brésil.
- Des descendance « G1 » issues de géniteurs *C. gigas* originaires de Taïwan, du Japon (Hiroshima), ainsi que des *C. angulata* et des hybrides *C. gigas/C. angulata* ont été comparées à un témoin *C. gigas* d'origine Marennes-Oléron. Ces expérimentations ont été réalisées par le LCPC (en milieu naturel) et le LCPL (milieu contrôlé). Les données obtenues (croissance, survie, reproduction, respiration et filtration) sont en cours d'analyse mais la tendance générale serait que la souche « Marennes-Oléron » apparaît la plus performante.

PLANCHE 6



Vue d'une des deux salles d'élevage larvaire



Huîtres âgées d'un an, diploïdes (en bas) et triploïdes obtenues par croisement (en haut). Cette photo illustre la croissance supérieure et l'absence de maturation du lot triploïde.

Thème : Optimisation & développement des productions aquacoles.

Programme : Amélioration génétique des espèces aquacoles.

Sous-programme : Amélioration & sélection de souches.

Polyploïdisation

Rappel des objectifs

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

En 1997, les premières huîtres tétraploïdes ont été obtenues au laboratoire, donnant l'opportunité de produire des huîtres triploïdes par simple croisement entre des huîtres diploïdes et des huîtres tétraploïdes. Ce procédé d'obtention des triploïdes, basé sur des techniques de reproduction bien maîtrisées par les écloséries professionnelles, doit permettre à très court terme la suppression des inductions chimiques et garantir 100% d'huîtres triploïdes à chaque génération.

Les objectifs du programme en 1999, étaient de tester les performances biologiques dans le milieu naturel et au laboratoire des premières huîtres triploïdes obtenues par croisement, d'assurer le maintien du stock d'huîtres tétraploïdes, d'offrir la possibilité aux écloséries françaises d'obtenir des triploïdes par croisement à partir de ce stock d'huîtres tétraploïdes, et enfin d'engager des études complémentaires quant à la fertilité des produits polyloïdes afin d'affiner l'étude du COSMAP.

Responsable programme : André GERARD

Résultats 1999

Maintien du stock de tétraploïdes et fourniture de produits génitaux tétraploïdes aux écloséries commerciales.

Conformément au protocole d'accord conclu le 17 mars 1998 entre la Direction des Pêches Maritimes et des Cultures Marines (DPMCM), le Comité National de la Conchyliculture (CNC), les écloséries commerciales et l'IFREMER, le stock d'huîtres tétraploïdes détenu par l'IFREMER est maintenu en milieu confiné avec traitement des eaux de rejet à l'Ozone et ne fait l'objet d'aucune diffusion auprès de la profession afin de limiter le nombre de structures détentrices de ce produit.

D'autre part, afin de répondre aux vœux du CNC et de la DPMCM exprimés dans ce même accord du 17 mars 1998, de voir les écloséries françaises n'utiliser que des produits gamétiques tétraploïdes d'un seul sexe dans des conditions garantissant son innocuité en matière de présence d'agents pathogènes, l'IFREMER a organisé en 1999 un transfert de sperme tétraploïde aux écloséries qui en ont fait la demande afin qu'elles puissent produire des huîtres stériles triploïdes par simple croisement entre des huîtres femelles diploïdes et ce sperme tétraploïde.

Suivi des performances biologiques des lots d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* triploïdes par croisement entre des huîtres diploïdes et des huîtres tétraploïdes

A la fin juillet 1998, un croisement factoriel avait été réalisé à partir d'huîtres diploïdes (2N) et tétraploïdes (4N). Chaque croisement avait été dupliqué afin d'obtenir deux lots diploïdes, deux lots triploïdes à partir du croisement de mâles 2N et de femelles 4N, deux lots triploïdes à partir du croisement de mâles 4N et de femelles 2N et deux lots tétraploïdes. Ces élevages ont été réalisés en milieu

confinés avec traitement des eaux de rejet en raison de la présence de lots tétraploïdes. Les contrôles de la ploïdie par imagerie numérique avaient bien confirmé les statuts diploïdes, triploïdes et tétraploïdes des lots ainsi obtenus.

A la fin de la phase micronurserie (2mm), les lots diploïdes et triploïdes ont été transférés à la nurserie de Bouin afin de les prégrossir en vue de l'étude de terrain qui a débuté en 1999 sur le site de Marennes-Oléron (suivi assuré par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes) et dans l'étang de Thau (suivi assuré par le Laboratoire Conchylicole de Méditerranée). Parallèlement, 1000 individus de chaque lot (tétraploïdes compris) avaient été conservés en structure de quarantaine au laboratoire, dans des conditions environnementales rigoureusement identiques afin que les physiologistes du CREMA puissent comparer différents paramètres physiologiques sur des animaux diploïdes, triploïdes et tétraploïdes.

Les premiers résultats de ces suivis indiquent que dès la première année et quelque soit le site :

- les lots triploïdes présentent une croissance supérieure,
- aucune différence de performance n'a été enregistrée entre les croisements (mâles diploïdes x femelles tétraploïdes) et (mâles tétraploïdes x femelles diploïdes),
- aucune maturation n'a été enregistrée pendant la période estivale, ce qui est en contradiction avec les données américaines sur le sujet, toutefois ces huîtres étant dans leur première année de croissance ce résultat devra être confirmé en 2000.

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

L'objectif de ce programme est l'obtention de souches d'huîtres plates *Ostrea edulis* présentant une tolérance suffisante au parasite *Bonamia ostreae* pour autoriser la relance de la culture de cette espèce en zones indemnes de *Marteilia refringens*. Cet objectif est envisageable du fait de la simplicité du cycle de *Bonamia* et de la possibilité de purifier le parasite à des fins d'infection expérimentale. Cette inoculation directe du parasite doit permettre de pratiquer une pression de sélection en relation directe avec le critère de sélection recherché, ce que n'autorise pas la confrontation des huîtres avec le parasite dans le milieu naturel. Compte tenu du cycle d'infestation du parasite, l'augmentation de la vitesse de croissance est également un critère à prendre en compte pour atteindre l'objectif.

Responsable programme : Edouard BEDIER

Résultats 1999

L'objectif de la saison de reproduction 1999 était d'effectuer une nouvelle production d'animaux sélectionnés, non plus sous la forme de familles de pleins frères, mais sous celle de cohortes regroupant des pontes biparentales les plus synchrones possibles. Cette modification avait été dictée par le besoin de réduire la charge de travail au niveau de l'écloserie et des laboratoires côtiers, tout en permettant la gestion de la diversité génétique, et en autorisant une efficacité de la sélection au moins égale à celle de la période 1985-1995.

En résumé, le protocole prévoyait la constitution de cohortes regroupant entre 3 et 5 pontes biparentales obtenues dans un délai maximum de 36 heures. L'objectif initial était la création de 16 cohortes sélectionnées (SS), ce qui devait permettre, par croisements intercohortes lors des générations successives, de repousser à la génération G+4 l'apparition de toute consanguinité supplémentaire. Du fait de ce nouveau schéma, l'option a été prise de ne pas

introduire en 1999 de sang neuf, afin d'éviter que les performances potentiellement différentes (exprimées intracohorte) des descendants d'animaux sélectionnés et d'animaux sauvages ne viennent interférer avec la sélection. Les couples ont été choisis parmi les reproducteurs "95", et les accouplements ont été réalisés entre lignées, afin d'éviter de générer de la consanguinité supplémentaire. Des cohortes WW provenant de pontes en masse d'animaux sauvages (origine Quiberon) ont été produites en parallèle, afin de servir de témoins.

Les survies larvaires ont été de l'ordre de 41% pour les cohortes SS, sans dégradation notable sur la période. En revanche, le pourcentage de cohortes SS fixées n'a été que de 38,2 % avec un taux de réussite nul à partir du 15/04. Il est intéressant de noter que ce pourcentage est de 100 % pour les pontes WW obtenues en parallèle, quelle que soit la période de ponte, ce qui aurait tendance à invalider l'hypothèse de la dégradation générale des pontes au cours du temps comme explication à ce faible taux de survie.

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 européen de 5 ans a débuté en janvier 1996, sa coordination générale est assurée par l'IFREMER.

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.

Coordination générale : A. Gérard,

Coordination des aspects génétiques : P. Boudry,

Coordination des aspects physiologiques : S. Bougrier du CREMA L'Hourmeau.

Résultats de l'année 1999

Dans la quatrième année du projet « GENEPHYS », les recherches ont porté sur l'étude d'huîtres de seconde génération. Les bases génétiques de l'aneuploidie et des performances physiologiques ont notamment pu être abordées par les différents partenaires du projet. D'autre part, une nouvelle série de familles, produite en 1998, ont permis d'étudier les bases génétiques de la plasticité de la croissance et de la survie (thèse de Bruno Ernande, expérimentations réalisées au CREMA et au LCPL).

Performances de croissance

Les 4 familles « G2 » produites à partir d'huîtres présentant des performances physiologiques contrastées ont montré des performances de croissance différentes, mais sans lien avec les performances de leurs parents. Les premières analyses des performances de croissance, de survie et de fécondité des 15 familles en expérimentation au CREMA et au LCPL montrent des effets parentaux significatifs. Une analyse plus poussée de ces données sera réalisée en 2000.

Analyses physiologiques

Des huîtres des 4 familles « G2 », produites en 1998 à partir d'individus présentant des performances physiologiques contrastées ont été étudiées pour leurs performances physiologiques (expériences coordonnées par le CREMA). Des mesures répétées avec acclimatation ou non à un faible régime alimentaire ont été réalisées. Ces huîtres ont ensuite été sacrifiées pour l'étude de leur enzymes digestives (LPM, Brest) et protéolytiques (PLM, Plymouth). Les analyses sont en cours. Parallèlement, l'étude des gènes codant pour l'amylase et les liens entre leur polymorphisme et les performances de l'équipement digestif est menée (LPM, Brest et Collège de France, Concarneau).

Analyses génétiques

L'analyse à l'aide d'un marqueur microsatellite des contributions parentales dans un croisement entre 5 mâles et 5 femelles, réalisé en 1998, a été complétée. Un total de 1981 individus, échantillonnés 6, 18 et 90 jours après fécondation ont été assignés (détermination des parents). L'analyse des résultats démontre l'importance de la compétition spermatique au moment de la fécondation et permet de quantifier la variance du succès reproducteur individuel. Cette variance augmente avec le temps à cause de mortalités différentielles entre descendants, ce qui tend à diminuer la taille efficace de la population en élevage. D'autre part, les déterminations de parentés par marqueurs microsatellites ont permis d'estimer l'héritabilité de la croissance d'individus élevés en conditions intensives au LCPL en 1997.

L'étude des bases génétiques de l'aneuploïdie a été initiée en collaboration avec le Laboratoire d'Océanographie Biochimique et Ecologique (Villefranche-sur-Mer). La comparaison de l'aneuploïdie au sein de familles de plein-frères a montré des différences significatives. La possible transmission de ce phénomène d'une génération à l'autre a été abordée en analysant les descendances de parents présentant des niveaux d'aneuploïdie contrastés.

Etude de l'aneuploïdie dans les populations naturelles

Rappel des objectifs

Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ($2n = 19, 18$ ou même 17 au lieu de $2n = 20$). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial. Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les « lots de queue », c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre, plus de 30 %. Récemment, une étude réalisée au sein du programme « Genophys » a démontré que plus de 50 % de la variance pour la vitesse de croissance était liée au taux d'aneuploïdie. Le but de l'expérimentation menée en 1999 était de faire un état des lieux des populations du bassin de Marennes-Oléron concernant ce caractère pour savoir si certains sites pouvaient être davantage touchés que d'autres.

Responsable du programme : Sylvie LAPEGUE-DUMOULIN

Résultats de l'année 1999

Du naissain de un an sur collecteur a été échantillonné sur différents sites du Bassin de Marennes-Oléron (Bonne-Anse, Seudre, Charente et Fouras) et un site du bassin d'Arcachon afin d'estimer le taux d'aneuploïdie moyen par population. Les animaux ont été conditionnés à La Tremblade et 30 spécimens par site ont été choisis parmi 200 conditionnés en fonction de leur poids (10 petits, 10 moyens et 10 grands). Après préparation du matériel biologique et

confection des lames microscopiques, les chromosomes ont été comptés pour 30 métaphases mitotiques par animal, soit au total 4500 métaphases pour 150 animaux étudiés. Malgré une forte mortalité survenue pendant le conditionnement, l'expérience a pu être menée à bien correctement et les classes de taille ont pu être respectées. De plus, les analyses biochimiques de la chair (teneurs en protéines, lipides, carbohydrates et glycogène) ont été réalisées sur des animaux des mêmes sites et classes de taille par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes.

Les résultats montrent que l'on observe de l'aneuploïdie dans chaque population et quasiment dans chaque individu. Le taux moyen par population d'huîtres creuses récoltées dans les zones de captage de Marennes-Oléron et du Bassin d'Arcachon varie globalement entre 10 et 13 %, ce qui est un taux relativement faible par rapport à celui des populations étudiées précédemment. Les tests statistiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les cinq populations étudiées. Il n'est pas non plus apparu de différence significative pour les caractères biochimiques. Cependant, il est apparu que les animaux appartenant à la classe des « moyens » sont globalement moins aneuploïdes que ceux classés « petits » ou « grands », et ce, dans toutes les populations. Ce dernier résultat est plutôt étonnant et reflète très certainement les difficultés de comparer des classes de taille de populations naturelles. En effet, les collecteurs peuvent avoir recueillis différentes cohortes de pontes et donc des animaux d'âge différent, biaisant ainsi le classement effectué sur le poids. C'est toute la difficulté d'étudier ce caractère sur des populations naturelles. Des travaux d'ordre méthodologique seront entrepris en 2000 afin d'optimiser l'étude de ce caractère.

PLANCHE 7



Prélèvement d'un morceau de tissu branchial pour l'étude de parenté à l'aide des marqueurs moléculaires.



Vue d'ensemble de la nouvelle salle du conservatoire de souches du genre *Crassostrea*.

FONCTIONNEMENT GENERAL DU LABORATOIRE

Animation et responsabilités scientifiques

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 laboratoire de référence pour les maladies des mollusques pour l'Union Européenne et l'Office International des Epizooties.
- **Boudry P.** : Animation du réseau génétique mollusques (REGEMO).
- **Gérard A.** : Directeur Adjoint du département "Ressources Aquacoles" de la Direction des Ressources Vivantes (depuis septembre 1999).
- **Gérard A.** : Animation des programmes génétiques du département "Ressources Aquacoles".
- **Gérard A.** : Coordination de l'URM 16 "marqueurs génétiques".
- **Gérard A., Boudry P.** : Coordination du projet européen "GENEPHYS".
- **Renault T.** : Coordination du projet européen "VINO".
- **Thébault A.** : Animation du réseau IFREMER pathologie mollusques (REPAMO).

Activités d'avis ou d'expertise

Berthe F. : Expert auprès de la Fish Disease Commission de l'Office International des Epizooties pour les maladies des mollusques.

Berthe F. : Expert auprès de la DG « SANCO » de l'Union Européenne pour les maladies des mollusques.

Berthe F. : Expert pour la FAO dans le cadre du projet Aquatic Animals Pathogens and Quarantine Information System.

Boudry P. : Membre du groupe Working Group of Application of Genetics in Fisheries and Mariculture (WGAGFM) dans le cadre de l'International Council for the Sea (CIEM).

Boudry P. : Expertise de projets présentés à l'Union Européenne dans le cadre du dernier appel d'offre FAIR.

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. : Membre du comité technique du CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole).

Gérard A. : Membres du Comité de programme du département "Ressources Aquacoles".

Renault T. : Membre du groupe Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms (WGPDMO) dans le cadre de l'International Council for the Sea (CIEM).

Missions
à l'étranger et
coopération
internationale

Renault T. : Membres du réseau culture cellulaire mollusques bivalves marins.

Arzul I. : Conférence EAFF à Rhodes du 18 au 24/09/99.

Audemard C. : Coopération Marteilia avec le laboratoire de Brisbane du 4 au 9/11/99.

Bedier E. : Rencontre avec les partenaires européen d'un programme européen CRAFT sur la génétique de l'huître plate et la résistance à la Bonamiose à Londres du 17 au 19/01/99.

Berthe F. : Groupe de travail FAO NACA OIE à Bangkok du 5 au 9/02/99.

Berthe F. : Conférence Aquaculture 2000 à Verone du 10 au 13/02/99.

Berthe F. : Projet base de données FAO pour méditerranée à Rome du 14 au 27/03/99.

Berthe F. : Cooopération Franco/Ukraine en pathologie des mollusques à Sebastopol du 11 au 18/06/99.

Berthe F. : Conférence EAFF puis Workshop EIFAC/FAO/EAFF à Rhodes du 18 au 24/09/99.

Berthe F. : Coopération Franco-Tunisienne dans le cadre du programme Aquaculture 2001 à Tunis puis évaluation du laboratoire de diagnostic de Salammbô du 25 au 31/10/99.

Berthe F. : Cours de formation sur les maladies des mollusques aux Philippines du 28/11 au 4/12/99.

Boudry P. : Rencontre avec les partenaires européen d'un programme européen CRAFT sur la génétique de l'huître plate et la résistance à la Bonamiose à Londres du 17 au 19/01/99.

Boudry P. : Workshop on Farm Animal Biodiversity à Utrecht (Pays-Bas) le 4/06/99.

Boudry P. : Colloque "Biology and evolution of the bivalvia" à Cambridge du 14 au 17/09/99.

Cochennec N. : Coopération Franco-Canadienne avec le Laboratoire Biologie du Pacifique de Nanaimo sur la purification de l'agent pathogène de *C. Gigas* mikrocytos d'ADN et mise au point d'une sonde moléculaire à La Tremblade à Nanaimo (Canada) du 4 au 16/05/99.

Delsert C. : Congrès de biologie cellulaire à Washington du 10 au 16/12/99.

Gérard A. : Expertise de l'écloserie territoriale de Rangiroa (Polynésie Française) et des programmes génétiques du COP du 20 au 27/11/99.

Huvet A. : Echantillonnage huîtres creuses sauvages sur la côte basque puis espagnole du 27/09 au 01/10/99.

Lapegue S. : Formation "Utilisation de marqueurs moléculaires en amélioration génétique animale" à Léon (Espagne) du 14 au 27/03/99.

Lapegue S. : Coopération Franco-Australienne (GIGAMAP) à Sydney du 22 au 24/04/99.

Lapegue S. : Conférence annuelle de la World Aquaculture Society à Hobart du 25 au 27/04/99.

Renault T. : Réunion CIE, groupe de travail pathologie (W6PDMO) à Lisbonne du 1 au 5/03/99

Renault T. : Cours sur la pathologie des mollusques bivalves à l'Université de Teramo (Italie) le 16/04/99.

Renault T. : Conférence annuelle de la World Aquaculture Society à Hobart du 26/04 au 2/05/99.

Thebault A. : Expertise sur la mise en place d'un réseau de veille sanitaire sur l'huître perlière à Tahiti du 8 au 19/10/99.

Renault T. : Réunion projet Européen « ROMEO » à Pesues (Espagne) du 25 au 27/11/99.

Participation à des projets européens

Projet "GENEPHYS"

Sujet : Genetical bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas* / FAIR 95-421

Coordinateur : Dr. André GERARD, Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade.

Participants :

- Plymouth Marine Laboratory,
- CNRS Observatoire Océanologique de Villefranche/Mer,
- University College of Galway,
- Institute of Marine Biology of Creete,
- CNRS Languedoc-Roussillon, Laboratoire Génome et Population, Université de montpellier II.

Projet "VINO"

Sujet : Virus infections in oysters / Diagnosis of oyster herpes-like virus infections : development end validation of mmolecular, immunological and cellular tools / FAIR-CT9864334

Coordinateur : Dr Tristan RENAULT,, Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade.

Participants :

- Medical Research Council Virology Unit, Institute of Virology, Church Street, Glasgow, Royaume Uni
- Eurogentec, Parc scientifique du Sart Tilman, Seraing, Belgique
- Université de Bretagne Occidentale, Unité de Culture Cellulaire, Brest, France
- Aquaculture Development Centre, Department of Zoology, university College, Lee Maltings, Cork, Irlande
- Instituto Investigaciones Marinas, Vigo, Espagne
- Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science Weymouth Laboratory, The Note, Weymouth, Dorset, Royaume Uni

Projet « ROMEO »

Sujet : Research Objective: Mortality in European Oysters) / E. C. n° FA-S2 9052

Coordinateur : Dr Valérie JEFFRIES, University of Kent, Canterbury, Kent, Royaume Uni.

Participants :

- Gaec Les Ferranges, Beauvoir sur Mer, France
- Guernsey Sea Farms, Vale, Guernsey
- Lissadell Shellfish, Sligo, Irlande
- SATMAR, Gatteville-phare, France
- Seasalter Shellfish, Whitestable, Kent, Royaume Uni
- Tinamenor S. A., Pesues, Cantabria, Espagne
- Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France
- Cefas Conwy, Royaume Uni
- IFREMER (Brest, La Trinité et La Tremblade)

Projet « DISENV »

Sujet : Environmental Factors and Shellfish Diseases / FAIR-CT98-4129

Coordinateur : Dr M. AUFFRET, Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire "Flux de Matière et Réponse du Vivant", Plouzané, France.

Participants :

- Université de Glasgow, Division of Infection and Immunity, Glasgow, Royaume Uni
- IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade.

Projet « MARS »

Sujet : *Marteilia refringens* studies : Molecular systematics and search for the intermediate host of the bivalve molluscs parasite / FAIR CT : PL97 – 3640.

Coordinateur : Dr A. FIGUERAS, Instituto de investigaciones marinas, CSIC, Vigo, Spain.

Participants :

- Laboratoire de Biométrie, Génétique et Biologie des populations, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard - Lyon.
- CREMA (CNRS), l'Houmeau.
- IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade.

Réunions
contrats CEE

Berthe F., Audemard C., Le Roux F. : Participation à la réunion du projet "MARS" à Issy-les-Moulineaux.

Boudry P., Gerard A. : Participation à la cinquième réunion plénière du projet "GENEPHYS" à Sète en novembre 1999.

	<p>Renault T. : Participation à la première réunion du projet "VINO" à Issy-les-Moulineaux.</p> <p>Renault T., Cochenec N. : Participation à la réunion du projet "DISENV" à l'Université de Brest.</p>								
Assistance technique	<p>Gérard A. : Aide à la conception et au suivi de la construction du nouveau bâtiment de Ronce-les-Bains.</p> <p>Ledu C. : Maturation de géniteurs de <i>Crassostrea gigas</i> pour le laboratoire DEL d'Arcachon, l'Université de Brest.</p> <p>Ledu C. : Fournitures de souches de phytoplancton à des laboratoires IFREMER ou étranger, à des écloseries locales, à une ferme de crevettes du Médoc et au lycée Aquacole de Bourcefranc.</p> <p>Ledu C. : Production de phytoplancton pour les expériences menées par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) et le CREMA L'Houmeau.</p> <p>Equipe génétique : Prégrossissement de naissain naturel de <i>Crassostrea gigas</i> pour la station zoologique de Villefranche-sur-Mer.</p> <p>Equipe génétique : Aide logistique aux expériences menées par la DEL et par le LCPC.</p>								
Astreintes	<p>Le fonctionnement de l'écloserie génétique nécessite une présence quotidienne. Le personnel scientifique du laboratoire s'est ainsi partagé <u>113 demi-journées de travail effectif durant les week-ends et les jours fériés en 1999</u>. Afin d'être en accord avec les règles de sécurité, un minimum de deux personnes est requis sur l'implantation.</p>								
Manifestations	<p>Participation à l'animation du stand IFREMER au salon ostréicole de La Tremblade, du 27 au 28 avril 1999.</p> <p>Participation aux journées "Portes Ouvertes" de la station de La Tremblade dans le cadre de "Sciences en Fête" (octobre 1999).</p>								
Visites	<p>Le laboratoire a reçu de nombreux visiteurs tout au long de l'année, des professionnels, des étudiants, des chercheurs français et étrangers. Parmi ces visiteurs, on peut citer :</p> <table><tr><td>Janvier</td><td>Visite du Dr Garcia-Meunier de l'Université de La Rochelle. Visite de Gilles Lemoulac d'IFREMER Tahiti.</td></tr><tr><td>Février</td><td>Visite de Hidetoshi Sannohe (Department of Fish protection Japan Fisheries resource Conservation Association à Tokyo au Japon) et de Kazuo Ogawa (Department of Aquatic Bioscience – University of Tokyo).</td></tr><tr><td>Mars</td><td>Visite de 23 étudiants en BTS au lycée Piscicole en Lozère accompagnés de 2 enseignants.</td></tr><tr><td>Avril</td><td>Visite de Scorsa Lebrun dans le cadre du projet d'élevage de crevettes en Corse. Visite de Christophe Singer à la recherche de documentation. Visite de Serge Claude, de Pierre-Gildas Fleury et de Grégoire</td></tr></table>	Janvier	Visite du Dr Garcia-Meunier de l'Université de La Rochelle. Visite de Gilles Lemoulac d'IFREMER Tahiti.	Février	Visite de Hidetoshi Sannohe (Department of Fish protection Japan Fisheries resource Conservation Association à Tokyo au Japon) et de Kazuo Ogawa (Department of Aquatic Bioscience – University of Tokyo).	Mars	Visite de 23 étudiants en BTS au lycée Piscicole en Lozère accompagnés de 2 enseignants.	Avril	Visite de Scorsa Lebrun dans le cadre du projet d'élevage de crevettes en Corse. Visite de Christophe Singer à la recherche de documentation. Visite de Serge Claude, de Pierre-Gildas Fleury et de Grégoire
Janvier	Visite du Dr Garcia-Meunier de l'Université de La Rochelle. Visite de Gilles Lemoulac d'IFREMER Tahiti.								
Février	Visite de Hidetoshi Sannohe (Department of Fish protection Japan Fisheries resource Conservation Association à Tokyo au Japon) et de Kazuo Ogawa (Department of Aquatic Bioscience – University of Tokyo).								
Mars	Visite de 23 étudiants en BTS au lycée Piscicole en Lozère accompagnés de 2 enseignants.								
Avril	Visite de Scorsa Lebrun dans le cadre du projet d'élevage de crevettes en Corse. Visite de Christophe Singer à la recherche de documentation. Visite de Serge Claude, de Pierre-Gildas Fleury et de Grégoire								

- Kuntz du laboratoire IFREMER de La Trinité/mer.
- Visite d'une délégation du Crédit Agricole.
- Visite de René Robert d'IFREMER Brest pour échange de données éclosion.
- Visite du Dr. Nai-Hsien Chao, du Dr. Ta Te Lin et du Dr. Jin-Hua Cheng du Taiwan Fisheries Research Institute et de la National Taiwan University..
- Mai
- Visite de responsables du Crédit Agricole.
- Visite de Mr et Mme Sam Bowman (Président) et Mr et Mme Drew Standfield (Vice-Président) de Pearl Seaproducts au Canada, accompagnés de Mme Parent.
- Visite de Messieurs Sourd et Silberzahn (Inspecteurs Généraux de l'Agriculture) en mission d'audit de la conchyliculture en Charente-Maritime.
- Juin
- Visite de Aynur Hindioglu de Turquie.
- Juillet
- Visite d'un groupe envoyé par l'Office de Tourisme de La Tremblade.
- Visite de Noël Wilkins de l'Université de Galway (Irlande).
- Visite d'un groupe envoyé par l'Office de Tourisme de La Tremblade.
- Août
- Visite de 2 groupes envoyés par l'Office de Tourisme de La Tremblade.
- Septembre
- Visite de Chris Langdon, Hatfield Marine Center, Oregon State University, accompagné de Jean-François Samain de l'IFREMER Brest.
- Visite de 3 Ukrainiens (dont Dr. Valentin Kholodov) dans le cadre d'un échange franco-ukrainien organisé par Pierre Mollo du CEMPAMAO.
- Visite de Sébastien Lafargue d'IFREMER Issy.
- Visite d'Adam Latala et Maciej Wolowicz de Pologne au sujet de la respiration d'algues et des mollusques.
- Visite d'Yvette Le Goguic dans le cadre de la cellule de crise pour les ormeaux.
- Visite d'un groupe de commissaires de la Marine.
- Octobre
- Visite de 5 personnes (Délégation Canadienne) accompagnées par Yannick Dheilily.
- Visite de Maciek Wolowicz, Adam Latala (Université de Djansk en Pologne) dans le cadre de la coopération franco-polonaise.

Visite de Mme Snjezana Zrncilc (Depart of Fish Diseases and Aquaculture Croatian Veterinary Intitute de Zagreb).

Novembre Visite de Gérard Devauchelle (INRA-CNRS à St Christol les Alès), Michel Aigle (Laboratoire de Biologie de Bordeaux), Marcel Le Pennec (URM CNRS de Plouzané), Jean Cohen (INRA de Jouy en Josas), André Jestin (CNEVA de Ploufragan), Alain Maucorps, Yves Harache et Chantal Bailly d'IFREMER à l'occasion de l'évaluation des activités des laboratoires DEL et LCPC de la station de La Tremblade.

Décembre Visite d'Elena Dumitrescu et de Tania Zaharia (Romanian Marine research Institute de Constata).

Visite du Colonel Vechambre de la Gendarmerie de La Rochelle.

Accueil de chercheurs

Lorenzo Gemma : Chercheur post-doctorant de Vigo, "Epidémiologie moléculaire de *Marteilia refringens*".

Hege Hellberg : Chercheur du National Veterinary Institute of Bergen, Norway, "diagnostic des maladies des mollusques".

Inge Hernar : Technicien du National Veterinary Institute of Bergen, Norway, "diagnostic des maladies des mollusques".

Hine Mike : Chercheur de Nouvelle-Zélande (NIWA), séjour de 4 mois dans le cadre des mandats du laboratoire de référence, "Etude des Mikrocell".

Snjezana Zrncic : Chercheur du Croatian Veterinary Intitute de Zagreb, "Etude de de *Marteilia maurini*".

Accueil de chercheurs doctorants

Bierne Nicolas : Etudiant en thèse du Laboratoire Génome et Populations (CNRS), Université de Montpellier II. "Dynamique de la zone hybride *entre Mytilus edulis et Mytilus galloprovincialis*. Plusieurs séjours à La Tremblade au cours de l'année dans le cadre de l'URM 16.

Lango Fabiola : Etudiante mexicaine en thèse à l'UBO Brest, 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 : Etudiante portugaise en thèse à l'Observatoire de Villefranche/Mer sous la responsabilité de C. Thiriot, plusieurs séjours dans le cadre des actions de recherche prévues dans GENEPHYS.

Jury de thèse ou de mémoire d'étudiant.

Boudry P. : Membre du jury de thèse EPHE présentée par Joel Haure, le 18 décembre à Paris.

Formations reçues

Boudry P. : Stage sur l'utilisation des techniques moléculaires en amélioration génétique animale.

Cadres et Techniciens. du laboratoire : Stage Biologie Moléculaire organisé en interne à La Tremblade.

Phelipot P. : Stage Excel

Phelipot P. : Stage de la PAO

Renault T. : Analyse d'Image et Microscopique quantitative en Biologie Médecine.

Renault T. : Diplôme en Méthodologie Statistique (2 modules)

Formations dispensées

Les cadres du laboratoire ont assuré de nombreuses heures d'enseignement dans le cadre de formation en Université, en école vétérinaire ou dans le domaine professionnel. Parmi ces interventions, nous pouvons citer :

Boudry P. : Participation à la semaine d'enseignement "Aquaculture 99" au centre IFREMER de Brest en janvier 1999.

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

Renault T. : Cours et travaux pratiques sur les maladies des mollusques bivalves marins, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, janvier 1998, 8 heures

Formations internes organisées par le laboratoire

Renault T., Berthe F. : organisation d'un stage de formation interne IFREMER sur la pathologie des bivalves marins.

Boudry P., Lapegue S., Bedier E. : organisation d'un stage de formation interne IFREMER sur la génétique des bivalves marins.

Le Roux F., Boudry P. : organisation du deuxième stage de formation interne IFREMER sur la biologie moléculaire.

PUBLICATIONS 1999

Bibliothèque

La station de La Tremblade possède une bibliothèque. Son fond documentaire est essentiellement basé sur les thèmes aquaculture, pathologie et génétique. Le thème environnement est développé que depuis cette année.

Sont actuellement catalogués et référencés :

- 1 800 ouvrages et monographies
- 280 thèses
- 30 000 tirés-à-part

La bibliothèque est abonnée à 27 périodiques et revues.

Un coin lecture et un équipement informatique pour consultation des différentes bases de données (Currents Contents, Medline, Gesbib...) sont à la disposition des chercheurs, techniciens, thésards, stagiaires et public extérieur.

Revue à comité de lecture

Almeida M., Berthe F., Thébault A. & M. T. Dinis (1999). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* **177** : 325-332.

Bergmann S., Fichtner D., Berthe F., Cochennec N., Le Roux F. & V. Kaden, 1999. Die diagnose von Muschelkrankheiten. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* **3** : 240-242.

Berthe F., Bureson E. & M. Hine (1999). Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **19**(6) : 277.

Boudry P. & B. Chatain (1999). Triploidy in mariculture : status and perspectives. Position paper adopted by the « Working Group on the Application of Genetics in Fisheries and Mariculture » (WGAGFM), Reykjavik, Iceland 12-15 April. ICES CM 1999/F1, pp 7-20.

Boudry P. (1999), Molecular markers as a tool to study genetic resources in oysters. In : Proceedings of the Workshop on Farm Animal Biodiversity, eds. L. Smith & AM Neeteson. Farm Animal Industrial Platform / Biotechnology for Biodiversity Industrial Platform, pp 19-20.

Boussaïd B., Gripari J. L., Renault T., Tige G. & G. Dorange (1999). *Trichodina* sp. Infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France. *J. Invertebr. Pathol.* **73** : 339-342.

Collet B., Boudry P., Thébault A., Heurtebise S., Morand B. & A. Gérard (1999). Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **175** : 215-226.

Dumoulin-Lapègue S., Kremer A. & R. J. Petit, 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks ?. *Evolution* **53**(5) : 1406-1413.

Faure S., Vigneron S., Galas S., Brassac T., Delsert C., and N. Morin. 1999. Control of G2/M transition in *Xenopus* by a member of the p21-activated kinase (PAK) family: A link between PKA and PAK signalling pathways ? *J. Biol. Chem.* **274**:3573-3579.

Gérard A., Ledu C., Phelipot P. & Y. Naciri-Graven (1999). The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* **174** : 229-242

Goarant C., Merien F., Berthe F., Mernoud I. & P. Perolat (1999). Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. Pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3) : 1145-1151.

Gouletquer Ph., Wolowicz M, Latala A., Geairon Ph., Huvet A. & P. Boudry (1999). Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquat. Living Resour.* **12**(4) : 271-277

Le Deuff R. M. & T. Renault (1999). Purification and partial genome characterisation of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.* **80** : 1317-1322.

Leitao A., Boudry P., Labat J. P. & C. Thiriôt-Quévèreux (1999). Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* **41**(1) : 175-186.

Leitao A., Thiriôt-Quévèreux C., Boudry P. & I. Malheiro (1999). G-chromosome banding study of three species of cupped oysters. *Genetics, Selection and Evolution*, **31** : 519-527.

Le Roux, F., Audemard., Barnaud A. & F. Berthe (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.* **1**(6) : 588-597.

Thiery R., Arnault G., and C. Delsert. (1999). Two isolates of sea bass nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.* **22**:1-7.

Robert R. & Gérard A. (1999). Bivalve hatchery technology : the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* **12**(2) : 121-130.

Vonau V., Ohresser M., Bierne N., Delsert C., Beuzart I., Bedier E. & F. Bonhomme (1999). Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Ani. Genet.* **30**(3) : 234-235.

Sous presse

Berthe F., Le Roux F., Peyretailade E., Peyret P., Rodriguez D. Gouy M. & C. P. Vivarès (1999). The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Pekins, 1990 is validated by the polygenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. In press Journal of Eukaryotic Microbiology.

Mitta G., Hubert F., Dyrzynda E., Boudry P. & P. Roch (1999). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels : gene structure and expression analysis. Developmental and Comparative Immunology, In press.

Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C. & F. Bonhomme (1999). Variable Microsatellites in the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* and Other Cupped Oyster Species. Animal Genetics, In press

Naciri-Graven Y., Launey S., Lebayon N., Gérard A. & Baud J. P. Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis* : evidence for inbreeding depression. In press in *Genetical Research*

Colloques et
congrès

Arzul I, Renault T. & C. Lipart (1999). Herpes-like virus diversity in marine bivalves. Conférence E. A. F. P., Rhodes 20-25 septembre 1999.

Audemard C., Barnaud A., Le Roux F., Sauriau P.G., Cousteau C. & F. Berthe (1999). Experimental transmission of *Marteilia refringens* in claire ponds. Conference E. A. F. P., Rhodes 20-25 septembre 1999

Berthe F. (1999). Development and Validation of DNA-based diagnostic techniques with particular reference to Bivalve Mollusc Pathogens. FAO/NACA/ACIAR/CSIRO/DFID – Joint Expert Consultation on the Research Needs for Standardization and Validation of DNA-based Molecular Diagnostic Techniques for the Detection of Aquatic Animal Pathogens and Diseases, 07-10 February 1999, Thaïlande

Berthe F., Thébault A. (1999). E. U. Directives for the control of diseases affecting bivalve molluscs : current state and prospects. Verona meeting : « Towards the Year 2000 : what changes in Aquaculture ? », Verona, 11-12 February, 1999.

Berthe F. (1999). The use of molecular tools for mollusc diseases diagnosis. Conférence E. A. F. P. Rhodes, 18-24 septembre 1999.

Boudry P. & A. Huvet (1999). Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of two cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. Communication orale à la conférence Biology and evolution of the Bivalvia, Cambridge, 14-17 septembre 1999.

Boudry P, Collet B., Kotoulas G., Hervouet V., Cornette F., Bonhomme F. & A. Gérard (1999). Utilisation des marqueurs microsatellites pour l'étude des contributions parentales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Journées Conchylicoles Ifremer. Nantes, France, 24-25 mars.

Boudry P. (1999). Molecular markers as a tool to study genetic resources in oysters. Talk at the Biotechnology for Biodiversity Platform/Farm Animal Industrial Platform Workshop « Farm Animal Biodiversity », Utrecht, The Netherlands, June 4 1999.

Boudry P., Collet B., Cornette F., Hervouet V., Kotoulas G. & F.

Bonhomme (1999). Mise en évidence expérimentale de la variance du succès reproducteur individuel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) et conséquences dans les études en populations naturelles. Communication orale au 21^{me} colloque du Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Rennes, France, 6-9 septembre.

Cau J., Faure S., Vigneron S., Labbé J.C., Delsert C., and N. Morin. " Regulation of X-PAK2 by Cdc42 and MPF controls *Xenopus* oocyte maturation ". 39^{ème} Congrès annuel de l'ASCB (American Society for Cell Biology) tenu du 11 au 15 décembre 1999 à Washington DC.

Diaz Almela E., Boudry P., Launey S., Lapegue S., Ledu C. & F. Bonhomme (1999). Structuration spatiale des populations européennes d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.): comparaison entre marqueurs mitochondriaux et nucléaires. Poster au 21^{me} colloque du Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Rennes, France, 6-9 septembre

Gérard A., Gouletquer P. & JP. Baud, 1999. Diaporama Powerpoint « La vie cachée de l'huître ». Conférence du 25 novembre à Ifremer Nantes.

Huvet A., Balabaud K. & P. Boudry (1999). Existe-t-il un isolement reproductif entre la « portugaise » et la « japonaise » ? Poster au 21^{me} colloque du Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Rennes, France, 6-9 septembre 1999.

Lapegue S., Renault T., Grizel H. & al (1999). Compte rendu de mission des représentants de la Direction des Ressources Vivantes / Ressources Aquacoles. Colloque de la World Aquaculture Society et Coopération Franco-Australienne en Science et technologies marines thème Aquaculture. Australie, 22 avril – 5 mai 1999, 40 p + annexes.

Leroux F., Audemard C., Bergman S., Lorenzo G., Figueras A. & F. Berthe (1999). Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Marteilia refringens*, taxonomic implications and development of DNA based detection assays. Conference E. A. F. P., Rhodes 20-25 septembre 1999.

Renault T., Lipart C. & C. Arzul (1999). Development of an internal standard for PCR detection of herpes-like virus infecting bivalves. Conférence E. A. F. P., Rhodes 20-25 septembre 1999.

Rapports finaux de contrat

Boudry P., Heurtebise S., Huvet A., Chollet B., Ledu C., Phelipot P. & A. Gérard (1999). Accimatisation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea*: hybridation et conservatoire de souches. Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 98 RPC-R-8 « Génétique ». Synthèse finale, 47 p.

Boudry P., Collet B., Goyard E., Lapegue S., Heurtebise S., Ledu C., Phelipot P., Cornette F., Bougrier S. & A. Gérard (1999). Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par la sélection de souches performantes. Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 98 RPC-R-8 « Génétique ». Synthèse finale, 34 p.

Renault T., Berthe F., Thébault A., Lipart C., Chollet B., Cochenne N. & P. Haffner (1999). Programme Pathologie. Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 98/RPC-R-7. Rapport final, 63 p.

Rapports
intermédiaires de
contrat ou de
convention

Cochennec N. & T. Renault (1999). Environmental factors and shellfish diseases (DISENV). Progress report for the period 01 december 1998 – 30 november 1999. Contrat FAIR CT98-4129.

Huvet A., Boudry P., Baud J. P., Nourry M., Phelipot P. & A. Gérard (1999). Ressources génétiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : variabilité, différenciation et adaptation aux conditions de production en Charente-Maritime. Rapport du contrat « Conseil Général du 2 mars 1998. 48 p.

Gérard A., Boudry P. & S. Bougrier (Coord. GENEPHYS) (1999). Genetic bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. Third Progress Report 1st january-31st december 1998. Commission of the European Communities. Contrat n°FAIR 95-421, 191 p.

Rapport de
missions à
l'étranger

Berthe F. (Coord.) (1999). Report on the Ad-hoc Expert Consultation for the preparation of a database on Health Management in Mediterranean Aquaculture – FAO, Rome, 14-16 December 1999, 9 p.

Berthe F. (1999). Mission report from the Expert Consultation on the Research Needs for standardization and validation of DNA-based molecular diagnostic techniques for the detection of aquatic pathogens and diseases, 07-09 February 1999, NACA Headquarters, Bangkok, Thailand, 14 p.

Berthe F. (1999). Rapport de mission FAO/Rome 14-26 Mars 1999, FAO Partnership Programme, 6 p.

Berthe F. (1999). Rapport de mission Ukraine 12-18 Juin 1999, 5 p.

Berthe F. (1999). Rapport de mission Rhodes 18-24 septembre 1999. Conférence de l'European Association of Fish Pathologists, 2 p. + annexes.

Berthe F. (1999). Rapport de mission Aqua 2001/MI/99-06, Tunisie, 25-31 octobre 1999. Approche zoosanitaire des filières conchylicoles, 17 p.

Berthe F. (1999). Rapport d'activité du Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des mollusques, année 1998, 33 p.

Berthe F. (1999). Report of the meeting of the O. I. E. Fish Diseases Commission Paris 1-3 march 1999, 12 p.

Boudry P. (1999). Compte rendu de la mission effectuée à Utrecht, Pays-Bas 3-4 juin. Workshop FAIP (Farm Animal Industrial Platform) et le BBP (Biotechnology for Biodiversity Platform) sur la biodiversité des animaux d'élevage, 22 p.

Boudry P. (1999). Rapport de mission effectuée au Portugal du 24/09 au 29/09. Projet Scientifique Franco-Portugais « Cytogénétique de Bivalves d'importance commerciale : les huîtres, 4 p.

Cochennec N. (1999). Rapport de mission effectuée au Canada du 5-16 mai 1999. Coopération Franco-Canadienne sur l'étude du parasite *Mykocytos*

machini, 2 p.

Gérard A. (1999). Rapport de mission effectuée en Polynésie du 20/11 au 27/11/2000.

Lapègue S., Renault T., Grizel H., Pham D., Lemonier H., Le Moullac G., Prou J. & J. L. Martin (1999). Compte rendu de mission des représentants de la Direction des Ressources Vivantes/Ressources Aquacoles. Colloque de la World Aquaculture Society & Coopération Franco-Australienne en Sciences et Technologies Marines – Thème Aquaculture, Sydney, Australie Avril-Mai 1999.

Le Roux F. (1999). Rapport de mission Croatie, 30 août – 6 septembre, Coopération Franco-Croate.

Thèses et mémoires

Arzul I. (1999). Etude de la diversité des virus de type herpes infectant des mollusques bivalves marins. Rapport annuel de Thèse 1998-1999, 23 p.

Audemard C. (1999). Stratégie d'utilisation de différentes espèces animales par le parasite *Marteilia refringens* pour assurer son cycle biologique. Rapport annuel de Thèse 1998-1999, 26 p.

Huvet A. (1999). Ressources génétique et phylogéographie chez *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites. Rapport annuel de thèse 2^{ème} année, 27 p.

Mémoires d'étudiants

Balabaud K. (1999). Etude préalable à la diversification d'huîtres creuses en France : isolement reproductif entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. Rapport de stage Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux. Université de Bordeaux I, 40 p.

Boutet I. (1999). Taxonomie et phylogéographie des huîtres creuses de l'Atlantique Sud. Rapport de stage, Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes, Université de La Rochelle, 41 p.

Diaz Almeda E. (1999). Structuration génétique mitochondriale chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. le long des côtes européennes et comparaison avec la différenciation nucléaire. D. E. A. Biologie de l'Evolution et Ecologie, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 35 p.

Espiau B. (1999). Caractérisation des populations hématocytaires de l'huître plate *Ostrea edulis* à l'aide de lectines. Rapport de stage formation Post-BTS Lycée Technique St Louis, Bordeaux, 37 p.

Grenon K. (1999). Typage d'une population de bactéries du genre *Vibrio* associée à un élevage de crevettes pénaïdes. Rapport de stage Lycée J. Bujault 79 Melle, Technicien Supérieur Agricole d'analyses Biologiques et Biotechnologie session 1997-1999, 24 p.

Raude M. (1999). Etude des mortalités estivales du naissain en poche à Fouras. Rapport de stage Licence de Biologie Université de La Rochelle, 33 p.

Documents de travail de laboratoire

Phelipot P. (1999). Rapport technique : Ecloserie de Génétique et de Pathologie de La Tremblade, 26 p.

Documents techniques, plaquettes, lettres aux médias...

Berthe F. & P. Boudry (1999). Pister les huîtres et leurs pathogènes. Biofutur 195 : 38-42

Boudry P. (1999). Du saumon pour Coleone. Interview par TV De Wereld (Belgique), 3 septembre 1999.

Gérard A. (1999). Sélection génétique des huîtres. Réseau Européen pour la communication de l'information RTD en aquaculture (FAIR-3837). EU ref. FAIR 0421. Réf. Aqua-Flow : TL99-050

Thébault A. (1999). Résumé des présentations de la Réunion REPAMO des 10 et 11 mars 1999 – La Tremblade

Thébault A. (1999). Bilan 1998 du réseau REPAMO, 55 p.