

SUDEVAB

Sustainable Development of European
SMEs Engaged in Abalone Aquaculture
www.sudevab.eu

Sustainable abalone aquaculture

Symposium on project final results

20th of October 2010

9h00-18h00

Aber Wrac'h

France

Free - For further information and registration:

Sylvain HUCHETTE,

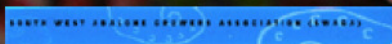
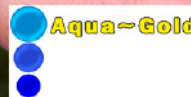
Technical Coordinator SUDEVAB

France Haliotis

Ph/Fax: +33 298 371 739

Email: sylvain.huchette@francehaliotis.com

Event hosted by:



SUDEVAB is funded by the financial support of the Commission of the European Communities under the EC's Seventh Framework Programme (FP7, 2007-2013) in the grant-funded Capacities Programme — Research for the Benefit of Specific Groups (in particular SMEs).

SUDEVAB

Sustainable Development of European
SMEs Engaged in Abalone Aquaculture
www.sudevab.eu

Aquaculture durable de l'ormeau Présentation des résultats du projet et perspectives

Mercredi 20 Octobre 2010
9h00-18h00
Aber Wrac'h
France

Entrée libre - Inscription et information:

Sylvain HUCHETTE,

Responsable technique SUDEVAB

France Haliotis

Tel/Fax: +33 298 371 739

Email: sylvain.huchette@francehaliotis.com

Une rencontre organisée par:



SUDEVAB is funded by the financial support of the Commission of the European Communities under the EC's Seventh Framework Programme (FP7, 2007-2013) in the grant-funded Capacities Programme — Research for the Benefit of Specific Groups (in particular SMEs).

20th October 2010
Conference schedule

8 :00	Xavier Lesage and Iain MacKenzie Sproat (France Haliotis) Visit of France Haliotis concessions: Group of 20 peoples/45 minutes per trip. Departure from Aber Wrac'h port		
9:40	John Dallimore / Martin Syvret (SME partners) SUDEVAB: overview of project and key research elements		WP1 et 2
10:00	Tony Legg (SME partner) Assessment of uptake of food contamination organisms by abalone (<i>Haliotis tuberculata</i>) in actual production areas and in comparative laboratory tests	p 1	WP3
10:20	Questions		
10:30	Coffee break and poster session		
11:00	Christine Paillard (Researcher CNRS/IUEM) Genetic variability and selection of abalone (<i>Haliotis tuberculata</i>) strains for a better resistance to their specific pathogen	p 3	WP4
11:20	David Schikorski (Researcher IFREMER) Identifying pathogens in farmed stocks	p 5	WP4
11:40	Erika Burioli (PhD Student University of Bologna) Polychaete infestation in farmed and wild abalone	p 6	WP4
12:00	Benoît Cudennec (Researcher CNRS/IFREMER) Abalone cell cultures as tools for <i>in vitro</i> pathogenicity assays	p 8	WP4
12:20	Questions		
12:30	Lunch		
14:00	Valérie Roussel (Researcher CNRS) Genetic resources of European abalone	p 9	WP5
14:20	Valérie Roussel (Researcher CNRS) The European Abalone: first steps of a MAS (Marker Assisted Selection) program	p 10	WP5
14:40	Sylvain Labarre (France Haliotis – SME partner) First step of genetic selection in France	p 11	WP5
15 :00	Anna Soler and Mapi Viera (Researchers Irish seaweed center NUIG, GIA (ICCM)) Seaweeds, food for thought!	p 12	WP6 et 7
15:20	Gercende Courtois (Researcher GIA) Development of various seaweed-based diets and their suitability for European abalone	p 13	WP6
15:40	Sylvain Huchette (Technical coordinator France Haliotis) Commercial farming trials of abalone (<i>Haliotis tuberculata</i>) in offshore and intertidal sea cages	p 14	WP7
16:00	Questions		
16:10	Coffee break and poster session		
16:40	John Dallimore (Aquagold – Project coordinator) Marketing of European abalone	p 16	WP9
17:00	Sylvain Huchette (Technical coordinator France Haliotis) Economics of abalone farming	p 15	WP7
17:20	Round Table: The future of abalone farming in Europe – how can we make it more sustainable?		
17:45	Conclusion		

Programme de la conférence du 20 octobre 2010

8 :00	Xavier Lesage and Iain MacKenzie Sproat (France Haliotis) Visite des concessions de France Haliotis: Groupes de 20 personnes/ durée 45 minutes. Depart du port de l'Aber Wrach		
9:40	John Dallimore / Martin Syvret (Partenaires PME) SUDEVAB: présentation du projet et de ses objectifs.		WP1 et 2
10:00	Tony Legg (Partenaire PME) Évaluation de l'absorption des contaminants alimentaires par les ormeaux (<i>Haliotis tuberculata</i>) dans les zones de production et avec des tests comparatifs en laboratoire.	p 1	WP3
10:20	Questions		
10:30	Pause et séance "poster"		
11:00	Christine Paillard (Chercheur CNRS/IUEM) Variabilité génétique et sélection de souches d'ormeaux (<i>Haliotis tuberculata</i>) résistants à des agents pathogènes spécifiques: diagnostic du polymorphisme dans les études environnementales sur les espèces marines	p 3	WP4
11:20	David Schikorski (Chercheur IFREMER) Identification de pathogènes dans les élevages	p 5	WP4
11:40	Erika Burioli (Doctorante, Université de Bologne) Influence de la typologie d'élevage sur les infestations de polychaetes	p 6	WP4
12:00	Benoît Cudennee (Researcher CNRS/IFREMER) Les cultures de cellules d'ormeau: un outil pour les tests de pathogénicité <i>in vitro</i>	p 8	WP4
12:20	Questions		
12:30	Repas au centre de la mer UCPA		
14:00	Valérie Roussel (Chercheur CNRS) Ressources génétiques de l'ormeau européen.	p 9	WP5
14:20	Valérie Roussel (Chercheur CNRS) L'ormeau européen: données préliminaires concernant la Sélection Assistée par Marqueurs	p 10	WP5
14:40	Sylvain Labarre (France Haliotis – Partenaire PME) Les premiers pas d'un programme de sélection génétique en France.	p 11	WP5
15 :00	Anna Soler et Mapi Viera (Chercheurs Irish seaweed center NUIG, GIA (ICCM)) Algues, nourriture à réfléchir !	p 12	WP6 et 7
15:20	Gercende Courtois (Chercheur GIA) Développement de divers aliments à base d'algues et leur adéquation aux besoins de l'ormeau Européen <i>Haliotis tuberculata</i> spp.	p 13	WP6
15:40	Sylvain Huchette (Coordinateur technique, partenaire PME) Essais d'élevage de l'ormeau européen (<i>Haliotis tuberculata</i>) en cage en pleine mer et en zone intertidale	p 14	WP7
16:00	Questions		
16:10	Pause et scéance "posters"		
16:40	Sylvain Huchette (Coordinateur technique, partenaire PME) Evaluation technico-économique de l'élevage des ormeaux	p 15	WP7
17:00	John Dallimore (Aquagold – Coordinateur du projet) Marketing de l'ormeau européen	p 16	WP9
17:20	Table ronde : Les futurs enjeux de l'aquaculture des ormeaux. Comment rendre le développement de filière plus durable?		
17:40	Conclusions		

Assessment of uptake of food contamination organisms by abalone (*Haliotis tuberculata*) in actual production areas and in comparative laboratory tests.

Tony Legg¹

1: Jersey Sea Farms, Le catillon, St. Martins, Jersey JE36BG, tony@legg.co.je

Regulation EC 854/2004 requires competent authorities to classify bivalve mollusc production areas. The Regulation by Annex identifies the application 'by analogy' to live echinoderms, live tunicates and live marine gastropods'. Additionally, ISO 6887-3 provides methods for the preparation of gastropod samples for microbiological examination. In practice European countries have regarded gastropods and by inclusion abalone as low risk although little evidence existed to back that view. As a consequence classified areas for abalone do not currently exist in the direct sense and the onus is on producers to maintain 'end quality standards'. The experimentation undertaken was in two forms. Firstly back to back sampling of product from two physically different farms (Jersey, Channel Islands, open seawater, and the Fal Estuary, Cornwall) and using the standard sampling procedures for designated waters with the species reared on those farms. The abalone consistently recorded less than 8% of the contamination recorded in 125 samples of co-cultured, *C.gigas*, *O.edulis* and *M.edulis*. The highest single sample was 42 *E.coli*/100g. The 'in field' sample assessment is that abalone have not been shown to exceed Category A designation even if placed in an environment that would put bivalves for consumption at the upper boundary of Category B (<4200 *E.coli* /100g). The second was a comparative challenge test between *C.gigas/H.tuberculata/M.edulis* using known initial concentrations of *E.coli* and Norovirus. The *E.coli* uptake and discharge of a 72hr period mirrored the 'in field' sampling data, with abalone consistently an order of magnitude lower than the bivalves. Virus was accumulated very quickly by oysters, reaching a plateau within 5 hours and possibly as quickly as 30mins. Mussels also accumulated very quickly but peaked much later at around 9 hours and concentrations were much lower than in oysters. Abalone appeared to accumulate much more slowly and no significant amounts of virus could be detected until 9-hour exposure. These results indicate that the competent authority general approach to gastropods and abalone specifically is justifiably based on lower health risks than with bivalves.

Évaluation de l'absorption des contaminants alimentaires par les d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) dans les zones de production et avec des tests comparatifs en laboratoire.

Le règlement CE 854/2004 exige des autorités compétentes de classer les zones de production des mollusques bivalves. Le règlement en annexe identifie l'application «par analogie» aux échinodermes, aux tuniciers et gastéropodes marins vivants. En outre, la norme ISO 6887-3 fournit des méthodes pour la préparation des échantillons de gastéropodes en vue de l'examen microbiologique.

Dans la pratique, les pays européens ont considéré que les gastéropodes et en l'occurrence les ormeaux présentent un risque faible, bien que peu d'études existent pour soutenir ce point de vue. En conséquence, il n'existe pas de classement pour les ormeaux actuellement dans le sens strict, et il incombe aux producteurs de maintenir «les niveaux de qualité».

L'expérimentation a été menée sous deux formes. Tout d'abord, un échantillonnage des produits provenant de deux exploitations physiquement différentes (Jersey, îles Anglo-Normandes, l'eau de mer ouverte, l'estuaire Fal, en Cornouailles anglaise) et en utilisant les procédures standard d'échantillonnage pour les eaux désignées avec des espèces aquacoles a été réalisé. L'ormeau présentait moins de 8% de la contamination enregistrée dans 125 échantillons de co-culture, *C.gigas*, *O.edulis* et *M.edulis*. L'échantillon présentant le niveau de contamination le plus élevé était de 42 *E.coli*/100g. L'évaluation sur le terrain a montré que les ormeaux n'ont pas jamais dépassé les niveaux de la catégorie A même en étant placé dans un environnement qui classait d'emblée les bivalves à la limite supérieure de la catégorie B (<4200 *E.coli* / 100g).

Un second test comparatif entre *C.gigas* / *H.tuberculata* / *M.edulis* a été conduit en utilisant des concentrations connues de *E. coli* et Norovirus.

L'absorption de *E. coli* et la dépuracion pour une période de 72heures sont équivalentes à ce qu'on peut observer sur le terrain. Les données d'échantillonnage montrent que l'ormeau présente toujours une contamination 10 fois inférieure aux bivalves.

Le virus a été accumulé très rapidement par les huîtres, pour atteindre un plateau dans les 5 heures et sans doute en moins de 30 mins. Les moules ont également accumulé très rapidement le virus pour atteindre un pic beaucoup plus tard à environ neuf heures et les concentrations sont restées beaucoup plus faibles que dans les huîtres. En 9 heures d'exposition, les ormeaux ont accumulé le virus beaucoup plus lentement et en plus faible quantité.

Ces résultats indiquent que l'approche générale des autorités compétentes en ce qui concerne les gastéropodes et l'ormeau en particulier est correcte par rapport aux risques de santé que cette famille présente en comparaison aux autres bivalves.

Genetic variability and selection of abalone (*Haliotis tuberculata*) strains for a better resistance to their specific pathogens: Polymorphism diagnostics in environmental studies on marine species

Anne-Leila Meistertzheim^{2,Y,e2}, Marie-Agnès Travers^{1,2,Y,e1}, Marion Cardinaud², David Schikorski^{2,5}, Carolyn S. Friedman³, Alain Van Wormhoudt⁴, Tristan Renault⁵, Sylvain Huchette¹, Dario Moraga² and Christine Paillard^{2*}.

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

3 School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Box 355020, Seattle, 98195 Washington, United States

⁴UMR CNRS-7208, Station de Biologie Marine MNHN, Concarneau, France

5 LGP, Ifremer La Tremblade, France

Since 1998, episodic mass mortality of the abalone *Haliotis tuberculata* has been observed along the northern Brittany coast of France caused by a complex interaction among the host, pathogen and environmental factors. In the present study, abalone were submitted to two successive infections with the pathogen *Vibrio harveyi* under controlled conditions. During the first challenge, infection by *V. harveyi* resulted in 64% mortality of mature abalone. After a second infection of those surviving the first challenge, only 44% mortality was observed. Physiological variability in the host response appears to be a major determinant in susceptibility to *V. harveyi*. In order to isolate differentially expressed genes in *H. tuberculata* challenged with this bacterium, suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA libraries were constructed from muscle of moribund abalone (susceptibles), surviving individuals (apparently resistant to the bacterium) and control (unexposed) animals. Of the 1,152 clones sequenced, 218 different partial cDNA sequences were obtained and represented 69 known genes. Of these, 65 were identified for the first time in *H. tuberculata*. Using real-time PCR, a time-course study was conducted on 19 of the genes identified by SSH. A majority of differentially expressed transcripts were down-regulated in susceptible individuals as compared to their resistant counterparts. Bacterial challenge of abalone resulted in the up-regulation of three transcripts (encoding ferritin, Heat Shock Protein HSP84 and Fatty Acid Binding Protein FABP) in those that survived exposure to *V. harveyi*.

Genetic markers have been developed for *H. tuberculata* genotyping by using a recent technique, High Resolution DNA Melting Analysis (HRMA), that moreover has never been used before this study for marine organisms. This method consists simply in a high flow screening and genotyping method based on melting curves analysis of amplicons, mutations modifying the curves compared to references. The entire procedure we proposed of HRMA in combination with qPCR is completed within 1h20 min as a single closed-tube assay that allowed in the same time to monitor PCR quality and to perform a scanning of more than 300 samples on two 384- or four 96-well plates on a LightCyclerTM 480 Instruments and will be a very useful technique to identify some spots of resistant populations in the field.

Variabilité génétique et sélection de souches d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) résistants à des agents pathogènes spécifiques: diagnostic du polymorphisme dans les études environnementales sur les espèces marines

Depuis 1998, des mortalités de masse épisodiques de l'ormeau *Haliotis tuberculata* ont été observées le long de la côte nord de la Bretagne provoquée par une interaction complexe entre l'hôte, des agents pathogènes et des paramètres environnementaux. Dans notre étude, les ormeaux ont été soumis à deux infections successives par le pathogène *Vibrio harveyi* dans des conditions contrôlées. Pendant la première infection, l'infection par *V. harveyi* a causé 64% de mortalité chez les ormeaux matures. Après une seconde infection des individus survivants, seul 44% de mortalité a été observée. La variabilité physiologique dans la réponse de l'hôte semble donc être un paramètre déterminant dans sa susceptibilité à *V. harveyi*. Afin d'isoler des gènes différentiellement exprimés par *H. tuberculata* lors de l'infection bactérienne, nous avons réalisé une hybridation suppressive et soustractive (SSH), une bibliothèque d'ADNc a été construite à partir de muscles des ormeaux moribonds (sujets sensibles), survivants (apparemment résistants à la bactérie) et contrôles (non exposés). Sur les 1152 clones séquencés, 218 différentes séquences partielles d'ADNc ont été obtenus qui représentaient 69 gènes connus. Parmi eux, 65 ont été identifiés pour la première fois chez *H. tuberculata*. En utilisant une PCR en temps réel, une étude a été menée sur 19 des gènes identifiés par SSH. La majorité des gènes différentiellement exprimés ont été régulés à la baisse chez les individus sensibles par rapport à leurs homologues résistants.

Le challenge bactérien de l'ormeau a abouti à la régulation à la hausse de trois transcriptions (ferritine encodage, Heat Shock Protein HSP84 et Fatty Acid Binding Protein FABP) dans ceux qui ont survécu à l'exposition à *V. harveyi*. Des marqueurs génétiques ont été développés pour le génotypage d'*H. tuberculata* à l'aide d'une technique récente, par analyse de fusion de l'ADN à haute résolution (AGRH), qui n'avait d'ailleurs jamais été utilisé avant cette étude pour les organismes marins. Cette méthode consiste tout simplement un dépistage rapide et un génotypage basés sur l'analyse des courbes de fusion des amplicons, les mutations modifiant les courbes de fusion par rapport aux courbes de référence. L'ensemble de la procédure proposée utilisant l'AGRH en combinaison avec la qPCR est réalisée en 1h20 min comme un seul essai en tube fermé permettant en même temps de surveiller la qualité de la PCR et d'effectuer une numérisation de plus de 300 échantillons sur deux plaques de 384 puits sur un LightCycler™ 480. Cette technique sera très utile pour identifier des zones de populations résistantes sur le terrain.

Identifying pathogens in farm stocks

D. Schikorski¹, L. Meistertzheim², C. Paillard², B. Chollet¹, D. Saulnier¹, N. Faury¹, S. Huchette³ and T. Renault¹

1 : LGP - Ifremer La Tremblade - France

2 : LEMAR - IUEM Brest - France

3 : France Haliotis - Plouguerneau - France

Analyses based on histological examination, bacteriology and molecular techniques were carried out on juvenile and adult abalone during the course of SUDEVAB project. The objective was to define the health status of animals before making transfers in the different SME partners farming facilities. Sample examination allowed to report the presence of *Candidatus xenohaliois californiensis* in abalone. This prokaryote was detected by PCR and its detection constituted the first evidence in French abalone. No other pathogen including *Vibrio harveyi* was observed in analysed samples. The susceptibility of abalone to *Perkinsus olseni* was investigated. No mortality was observed in abalone in contact with *P. olseni* during the course of the experiment. Thioglycollate analysis indicated that abalone appeared not infected. In comparison to *V. harveyi* ORM4, 6 strains of *Vibrio* isolated from French moribund oysters *Crassostrea gigas* presented a low pathogenicity to *H. tuberculata*. Mortality rates significantly different were observed between abalone injected with the OsHV-1 suspension and with the control suspension. However, to the view of mortality rates observed in control batches, the virus OsHV-1 seems not to be highly pathogenic to *H. tuberculata*. No significant mortality was evidenced in abalone incubated in presence of moribund oysters infected by OsHV-1. For specific detection of pathogenic strains of *V. harveyi* a real time PCR technique has been developed.

Key-words: *Haliotis tuberculata*, pathogens, *Candidatus xenohaliois californiensis*, *Vibrio harveyi*, experimental infection, diagnostic, real time PCR

Identification de pathogènes dans les élevages

Des analyses ont été réalisées en histologie, en bactériologie et en biologie moléculaire sur des ormeaux juvéniles et adultes durant le projet SUDEVAB. L'objectif était de définir le statut sanitaire des animaux avant de réaliser des transferts vers les installations d'élevage de différents partenaires du projet. Les analyses effectuées ont permis de mettre en évidence la rickettsie *Candidatus xenohaliois californiensis* par PCR. Aucun autre agent infectieux n'a été détecté. La sensibilité d'ormeaux appartenant à l'espèce *Haliotis tuberculata* a été testée vis-à-vis de différents agents infectieux (*Perkinsus olseni*, bactéries appartenant au groupe des vibrions apparentés à *Vibrio harveyi* et Ostreid herpes virus 1) au travers d'essais de pathologie expérimentale. Les résultats obtenus montrent que les agents infectieux testés n'induisent pas de mortalité dans les conditions retenues pour les expérimentations. Enfin, une technique de PCR en temps réel a été développée pour détecter la bactérie *V. harveyi*, espèce bactérienne responsable d'épisodes de mortalité massive chez l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata*.

Mots-clés : *Haliotis tuberculata*, agents infectieux, *Candidatus xenohaliois californiensis*, *Vibrio harveyi*, infection expérimentale, diagnostic, PCR en temps réel

Influence de la typologie d'élevage sur les infestations de polychaetes

Erika Burioli¹

¹PhD Student, Facoltà di Medicina Veterinaria, Corso di Laurea in Acquacoltura e Ittiopatologica, università di Bologna.

L'ormeau a une croissance relativement lente, il est donc normal, dans le milieu naturel, que des épibiontes se développent sur sa coquille. Cependant, lorsque l'on parle de polychètes, en cas d'infestation importante, la santé et la croissance de l'ormeau peuvent être compromises. L'épibionte devient alors un parasite et la mise en place d'un protocole définissant les bonnes pratiques d'élevage se révèle nécessaire pour maintenir un taux de croissance acceptable et une production de qualité. Les polychètes sont des vers marins annélidés. Certaines espèces sont prédatrices, d'autres se nourrissent de particules organiques en suspension dans l'eau. Ces dernières ont un style de vie sédentaire et font partie intégrante du benthos en trouvant refuge dans des galeries qu'elles creusent dans les matériaux calcaires. C'est ainsi qu'elles peuvent perforer les coquilles des mollusques et poser de sérieux problèmes aux activités conchylicoles.

Quand l'intensité de l'infestation est élevée, le gastéropode subit de lourdes conséquences procurant, à l'éleveur, une perte économique:

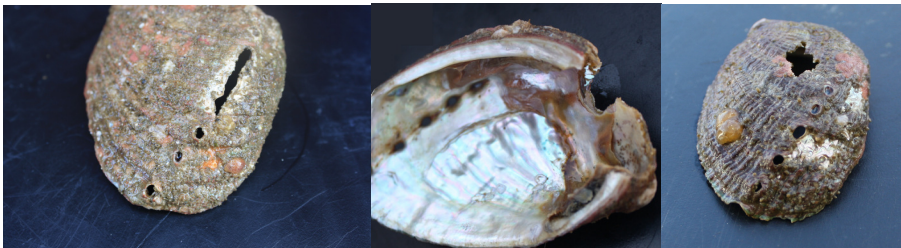
- lorsque le polychète perce la coquille, le mollusque recouvre la lésion d'une couche de matériel organique puis de carbonate de calcium. Cette réparation de la coquille intervient au détriment de la croissance.
- une coquille poreuse est plus fragile face aux prédateurs
- l'accumulation de matériel malodorant dans les galeries abandonnées provoque une dévaluation du produit.

Pour vérifier s'il existait une corrélation entre la technique d'élevage et la densité d'infestation nous avons comparé des individus issus:

- de la mariculture sur filières
- de la polyculture dans des poches à huitres
- de l'élevage en terre, à circuit hydrique fermé

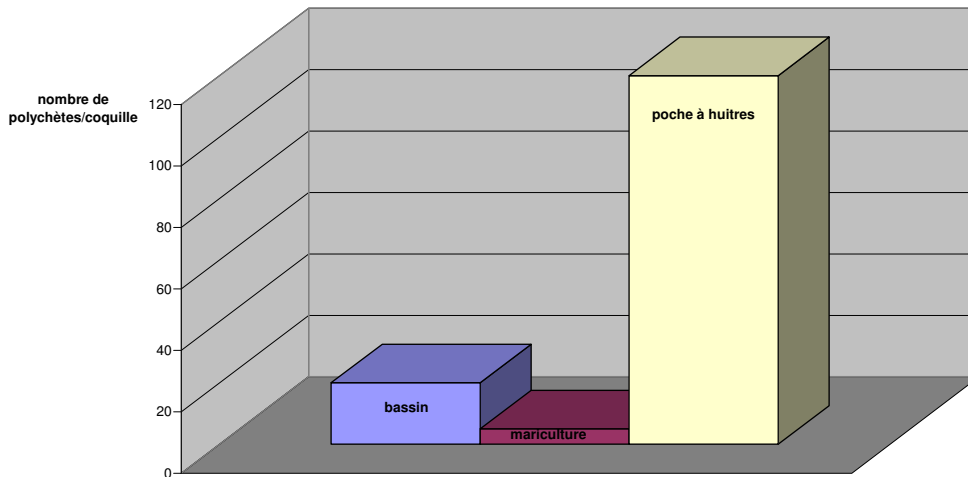
D'après ces résultats il semble évident que la technique d'élevage influence l'intensité d'infestation. Cette valeur, dans le cas de la mariculture, est très proche de celle relevée dans la population sauvage.

Deux familles ont été recensées, Spionidés et Sabellidés avec plusieurs espèces représentées.



Exemple de lésions provoquées par les polychaetes.

intensité d'infestation par typologie d'élevage



Toutefois, les sabellidés, qui créent les lésions les plus importantes n'ont été trouvés que sur les individus sauvages ou élevés dans les poches à Huitres. Les huitres de la polyculture, quand à elles, n'étaient infestées que par un type de Spionidés, ceci laisse supposer que le problème de cette technique d'élevage n'est pas due à la présence du bivalve mais à d'autres facteurs.

Le mécanisme de reproduction des polychètes n'est pas encore totalement clair, cependant les œufs sont déposés au fond de la galerie et les larves ne la quittent que lorsqu'elles ont les semblances de petits adultes. Les appendices natatoires de ces vers sédentaires n'étant pas développés, la larve ne peut parcourir de grandes distances avant de se fixer.

Comment: a revoir

Une forte infestation semble donc attribuable aux effets combinés d'une haute densité d'élevage et d'un hydrodynamisme limité à l'intérieur des poches. Pour lutter contre ce fléau, il est donc d'importance primordiale une technique d'élevage prévoyant:

- une densité d'élevage basse
- un bon hydrodynamisme qui permette un renouvellement hydrique important
- un type d'habitat évitant l'accumulation de matériel minéral et organique et facilement nettoiyable

Abalone cell cultures as tools for *in vitro* pathogenicity assays

Benoit Cudennec^{1,2}, David Schikorski^{2,4}, Sylvain Huchette⁴, Christine Paillard³,
Tristan Renault² and Stéphanie Auzoux-Bordenave¹

1: UMR CNRS-7208, Station de Biologie Marine MNHN, Concarneau, France

2: LGP, Ifremer La Tremblade, France

3: LEMAR – IUEM/UBO, Plouzané, France

4: France Haliotis, Kerazan, Plouguerneau - France

Cell cultures provide alternative and controlled experimental models for fundamental studies as well as for various applications in developmental biology, physiology and host-pathogen studies. Here we report the development of primary cell cultures from abalone tissues and their use for studying pathogenicity at a cellular level. Primary cell cultures were developed from the gill which is a target tissue for two abalone parasites, *Vibrio harveyi* bacteria and the Ostreid Herpes Virus OsHV1. Cells were obtained using the explants culture method as previously described for abalone tissue culture. First, our investigations focused on cell characterization, intra-cellular metabolism and viability of cultured cells. Cytological staining as well as flow cytometry analysis was used to characterize the cell populations. The results showed that gill cells could be maintained in sub-cultures over 13 days with a significant metabolic activity. In a second part, we report the use of gill cell cultures to investigate the mode of action of both pathogens at the cellular level. The results showed that in the presence of *V. harveyi* bacteria, phenol-oxydase activity of gill cells increased during the four first hours of contact and strongly decreased afterwards. The interaction of gill cells with OsHV1 virus was also investigated *in vitro*. Flow cytometry experiments are in progress to investigate furthermore the interaction between gill cells and abalone pathogens. To conclude, primary short-term cultures derived from target tissues are suitable tools for *in vitro* investigations and open the way to innovative biotechnological assays for abalone aquaculture.

Key-words: abalone, *Haliotis tuberculata*, gill cell culture, *Vibrio Harvey*, OsHV1, *in vitro* assays

Les cultures de cellules d'orveau: un outil pour les tests de pathogénicité *in vitro*

Les cultures cellulaires, comme l'ont montré les travaux réalisés chez les Vertébrés et les Insectes, constituent de précieux outils de recherche fondamentale et trouvent des applications dans les domaines de la physiologie, l'écotoxicologie, la pathologie et la génétique. Bien qu'il n'existe pas de lignées cellulaires chez les mollusques marins, les cultures cellulaires primaires permettent de réaliser des tests à court terme, contrôlés et reproductibles complémentaires des études *in vivo*. Dans le cadre de la thématique "Pathologie" du programme européen SUDEVAB, nous avons développé des cultures primaires à partir des tissus de l'orveau *Haliotis tuberculata* afin de réaliser des tests de pathogénicité *in vitro*. Des cultures primaires ont été établies à partir des branchies, tissu cible de l'infection causée par deux agents pathogènes, la bactérie *Vibrio harveyi* et le virus OsHV1, d'après la méthode des explants développée précédemment pour les tissus d'orveau. Les méthodes d'analyse cytologique, de cytométrie en flux et des tests d'activité métabolique ont permis de caractériser les populations cellulaires présentes en culture. Ces cultures primaires ont ensuite été utilisées pour étudier le mode d'action des deux agents pathogènes à l'échelle cellulaire. Les effets des pathogènes sur la viabilité cellulaire, l'activité phénol-oxydase (PO) et la capacité de phagocytose ont été évalués sur les cellules cibles en culture. Les résultats ont montré une diminution significative de l'activité PO dans les cellules branchiales en présence de *V. harveyi*. En conclusion, les cultures primaires établies à partir des tissus d'orveau permettent d'étudier *in vitro* les interactions hôte-pathogène. Ces biotests constituent des outils innovants pour l'aquaculture.

Mots-clés : orveau, *Haliotis tuberculata*, culture cellulaire, *V. harveyi*, OsHV1, tests *in vitro*

The European Abalone: genetic resources

Valérie Roussel¹, Sylvain Huchette² and Alain Van Wormhoudt²

1 : UMR 7208 BOREA Station de biologie marine de Concarneau –MNHN –BP225 29180 Concarneau

2 : France Haliotis, Kerazan, 29880 Plouguerneau, France.

The aim of the work was to study genetic diversity and structuration of the European abalone (*Haliotis tuberculata*) populations using molecular markers (mitochondrial gene, microsatellite and nuclear markers). 21 populations of this species from Canary Islands to Normandy and from the Mediterranean sea were collected and analyzed. By using different analysis a phylogeographic scenario of evolution was proposed taking into account the variation of the level of the sea and the currents changes during the Pleistocene. The COI results evidenced the presence of two groups of sequences which did not fit with the two subspecies defined by morphological traits and geographical localization; *H.t. tuberculata* in Northern Europe and *H. t. coccinea* in the Canary Islands. The existence of a mitochondrial introgression was characterized in the two subspecies. The results obtained with the microsatellites markers evidenced the presence of three genetic clusters located in Northern Atlantic, Canary Islands and Mediterranean sea. In this later region, especially in Banyuls, a recent mixture with Atlantic cluster was demonstrated whereas, in the Adriatic sea, an isolation of the population was evidenced. This results was confirmed by using another nuclear marker: a lysin protein gene which presented a specific signature. These results will be useful for further aquaculture improvement programs.

Key-words: European abalone, *Haliotis tuberculata*, genetic resources, diversity, structuration

Ressources génétiques de l'orveau européen

L'objectif du travail était d'étudier la diversité génétique et la structuration de populations d'orveaux européens (*Haliotis tuberculata*), à l'aide de marqueurs moléculaires (gène mitochondrial, gène nucléaire et microsatellites nucléaires). 21 populations allant des Canaries à la Normandie, et dans la mer Méditerranée ont été échantillonnées et analysées. A l'aide de différentes méthodes d'analyse, un scénario d'évolution phylogéographique a été proposé, prenant en compte la variation du niveau de la mer et des courants pendant le Pleistocène. Les résultats obtenus avec le gène COI ont mis en évidence deux groupes de séquences qui ne correspondent pas complètement avec les deux sous-espèces définies morphologiquement et au niveau géographique : *H.t.tuberculata* en Europe du Nord et *H.t.coccinea* aux Canaries. L'existence d'une introgression entre ces deux sous-espèces a été mise en évidence. Les résultats obtenus avec les marqueurs microsatellites ont permis de différencier trois clusters génétiques localisés en Atlantique Nord, aux Canaries et en Méditerranée. Dans cette dernière région, particulièrement à Banyuls, il apparaît une récente introduction des orveaux Atlantiques dans le cluster génétique méditerranéen, alors qu'en Adriatique, nous n'observons que ce cluster. Ce résultat a été confirmé à l'aide d'un autre marqueur nucléaire : le gène de la sperm lysin, qui présente aussi une signature spécifique en Méditerranée. Ces résultats seront utiles lors de programmes d'amélioration de l'orveau européen.

Mots-clés : Orveau européen, *Haliotis tuberculata*, ressources génétiques, diversité, structuration

The European Abalone: first steps of a MAS (Marker Assisted Selection) program

Valérie Roussel^a, Sylvain Huchette^b and Alain Van Wormhoudt^a

1 : UMR 7208 BOREA Station de biologie marine de Concarneau –MNHN –BP225 29180 Concarneau

2 : France Haliotis, Kerazan, 29880 Plouguerneau, France.

As the European abalone becomes of high economical importance in Europe and especially in France, the aim of our work was to initiate a MAS (Marker Assisted Selection) program for this marine gastropod. As we worked on farming conditions, we disposed of ten families issued from different crosses, supposingly being full-sib families. The first step was to determine the parentage of the descents by using microsatellite markers. Three families were showed to have a pluri-parental origin, and seven families were compound of full-sib individuals. We used these seven families to study different traits of interest and obtain preliminary results concerning weight, size, and color. These traits presented a unimodal distribution revealing a polygenic determinism. Concerning the size parameter, we evidenced a high heritability for length, width and weight (0.37, 0.29 and 0.40 respectively) with an important correlation between them, but a low heritability for condition factor and length/width (0.12 and 0.02 respectively). Concerning the shell color trait, a medium to high heritability was evidenced for the red color and hue (0.33 and 0.20 respectively) with a high correlation between them. No correlation was evidenced between size and color traits. To obtain more precise results concerning these traits, 14 new full-sib families were created and will permit to study more precisely the different characters.

Key-words : European abalone, *Haliotis tuberculata*, selection, hérabilité

L'ormeau européen: données préliminaires concernant la Sélection Assistée par Marqueurs

L'ormeau européen devenant une espèce a forte valeur économique en Europe et spécialement en France, le but de notre travail a été d'initier un programme de sélection assistée par marqueurs pour ce gastéropode marin. Comme nous travaillions dans des conditions d'élevage, nous avons pu disposer de 10 familles d'élevage, issues de différents croisements, et *a priori* composées de plein-frères. La première étape de ce travail a été de déterminer la parenté des descendants de ces différentes familles à l'aide de 8 marqueurs microsatellites. Si sept de ces familles étaient effectivement composées de plein-frères, trois autres se sont avérées être composées d'individus d'origine pluri-parentale. Nous avons utilisé les sept familles pour étudier différents caractères d'intérêt, et nous avons obtenu des résultats préliminaires concernant le poids, la taille et la couleur de la coquille. Ces caractères ont présenté des distributions unimodales probablement liées à un déterminisme polygénique. Concernant la taille, les valeurs de l'hérabilité au sens large ont été assez importantes pour le poids, la longueur et la largeur (0,37 , 0,29 , et 0,40 respectivement) avec une corrélation importante entre ces caractères, mais une faible hérabilité pour le facteur de condition et le rapport longueur/largeur (, and , respectivement). Concernant les caractères de couleur de la coquille, une hérabilité moyenne a forte a été mise en évidence pour la couleur rouge et la teinte (0,33 et 0,2 respectivement) avec une forte corrélation entre ces deux caractères. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les caractères de taille et de couleur. Pour obtenir des résultats plus précis concernant ces caractères, 14 nouvelles familles de plein-frères ont été développées et seront étudiées.

Key-words : Ormeau européen, *Haliotis tuberculata*, selection, hérabilité

First step of genetic selection in France.

Sylvain Labarre and Sylvain Huchette

Master student, Aquacaen, France.
France Haliotis, Kerazan, 29880 Plouguerneau, France.

First technical results of the production of 14 selected families are presented. These are the first step towards the domestication of European abalone. The main technical difficulties were identified and technical solutions were provided. The first assessment of the families during the first 90 days after settlement provided information about the influence of the culture environment on the performances. The future directions to give to the program are discussed.

Les premiers pas d'un programme de sélection génétique en France.

Les premiers résultats techniques d'une production de 14 familles sélectionnés sont présentés. Ce sont les premiers pas vers la domestication de l'ormeau européen. Les principales difficultés liées à la mise en place d'un tel programme de sélections ont été identifiées et des solutions proposées. Une évaluation précoce à 90 jours après fixation des premières familles a permis de comprendre l'influence des conditions d'élevage sur les performances techniques. Les futures orientations du programme de sélection sont discutées.

Seaweeds, food for thought!

Anna Soler-Vila¹, Gercende Courtois de Viçose², Maria del Pino Viera², and Marisol Izquierdo².

1: Irish Seaweed Centre, MRI, National University of Ireland, Galway.

2: Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) & Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) P.O. Box 56. 35200 Telde, Las Palmas, Islas Canarias, España.

The increasing demand from the industry for macroalgae biomass as a source of bioactive molecules, animal feed and/or for biofuel production, is helping to develop intensive sea and tank cultivation of various macroalgae species all over Europe. Seaweed cultivation trials of relevance to abalone feed were performed in Ireland (long-line cultivation) and Gran Canaria (tank cultivation). In Ireland at the reproductive season for each species, seaweeds were brought to the laboratory, spores were released and after a few weeks seeded long-lines were brought at sea. Seaweeds were placed next to salmon cages. In Gran Canaria, four trials were carried out evaluating the biological indexes of the seaweeds *Gracilaria cornea* J. Agardh, *Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützinger and *Ulva rigida* J. Agardh under different rearing conditions. Maximum growth rate and yield were obtained at a low initial stocking density and high water exchange. Production was significantly highest in *G. cornea* whereas *U. rigida* showed the highest growth rate. The present study examined the nutritional variability of the macroalgae by analyzing the biochemical composition as well as the fatty acid profiles of, fresh and dried, macroalgal species present in all the partners' states. Differences between, drying method, seasons, locations, nutrients enrichment and species were studied. Proximate biochemical compositions as well as fatty acids profiles were characteristic of each macroalgae classes and were influenced by seasons, nutrient enrichment and drying processes.

Key-words : Seaweed production, long-line, biofilters, growth rate nutrients enrichment, proximate biochemical composition, fatty acids

Algues, nourriture à réfléchir !

La demande croissante de biomasse algale par l'industrie en tant que source de molécules bioactives, pour l'alimentation animale et / ou pour la production de biocarburants, contribue à développer la culture intensive de différentes espèces de macroalgues, en mer et sur terre, dans toute l'Europe. Des essais de culture d'algues utiles pour l'alimentation des ormeaux ont été réalisés en Irlande (culture sur long-line) et en Grande Canarie (culture en bassins). En Irlande, lors de la saison de reproduction de chaque espèce, les algues ont été ramenées au laboratoire, les spores ont été relâchées et après quelques semaines les long-linesensemencées ont été placées en mer. Les algues furent placées à côté de cages de production de saumon. Sur Grande Canarie, quatre essais ont été réalisés évaluant les indices biologiques des algues *Gracilaria cornea* J. Agardh, *Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützinger et *Ulva rigida* J. Agardh dans différentes conditions d'élevage. Le taux de croissance maximale et de rendement ont été obtenus à une densité initiale faible et avec un renouvellement d'eau élevé. La production a été significativement plus élevée pour *G. cornea* alors que *U. rigida* a présenté un plus fort taux de croissance. Cette étude a étudié la variabilité nutritionnelle des macroalgues en analysant la composition biochimique ainsi que les profils d'acides gras des espèces de macroalgues, fraîches et sèches, présentes dans tous les états partenaires. Les différences entre les méthodes de séchage, les saisons, les lieux, l'enrichissement en éléments nutritifs et les espèces ont été étudiées. Les compositions biochimiques ainsi que des profils d'acides gras sont caractéristiques de chaque classe de macroalgues et ont été influencés par les saisons, l'enrichissement en nutriments et les méthodes de séchage.

Mots-clés : Production d'algues, long-line, biofiltres, taux de croissance, enrichissement en nutriments, composition biochimique, acides gras.

Development of various seaweed- based diets and their suitability for European abalone *haliotis tuberculata* spp.

Gercende Courtois de Viçose¹, Maria del Pino Viera¹, and Marisol Izquierdo¹.

¹Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) & Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) P.O. Box 56. 35200 Telde, Las Palmas, Islas Canarias, España.

In order to develop a sustainable, ecobased, low-cost artificial diet, based on vegetable sources and matching abalone nutritional requirements, more than 70 publications related to the nutrition of various species of abalone in different countries have been reviewed. Results showed that the proximate composition of artificial diets tested averaged: 30% crude protein; 2-5% lipid content and 45% carbohydrate whereas the caloric content was generally around 4 Kcal.g⁻¹. The nutritional values of the seaweeds *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, *Gracilaria sp.* and *Ulva sp.* were examined in order to estimate their potential inclusion in vegetal based artificial diets for abalone, *H. tuberculata* spp. Three isoproteic and isoenergetic, seaweed-based, diets, with proximate biochemical compositions matching the ones of other artificial diets according to the revision, were formulated and processed. These experimental diets are actually tested against two control diets; one mixed algal diet containing fresh *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*, and a commercial one. Biochemical composition and energy content of the diets have been analysed and will be related to survival, growth performance and feed utilization by the animals.

Key words: Macro-algae, growth performance, European abalone, *H. tuberculata* spp., *Gracilaria sp.*, *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, *Ulva sp.*, artificial diets.

Développement de divers aliments à base d'algues et leur adéquation aux besoins de l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* spp.

Afin de développer des aliments de faible coût, écologiques, durables et à base de sources végétales, correspondant aux besoins nutritionnels de l'ormeau, plus de 70 publications relatives à la nutrition des différentes espèces d'ormeaux, dans différents pays, ont été révisées. Les résultats ont montré que les compositions biochimiques des aliments artificiels testés contenaient en moyenne: 30% de protéines brutes; des teneurs en lipides et en glucides de 2-5% et 45% alors que le contenu calorique était en général d'environ 4 Kcal g⁻¹. Les valeurs nutritionnelles des algues *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, *Gracilaria sp.* et *Ulva sp.* furent examinées afin d'estimer leur inclusion éventuelle dans des aliments artificiels, pour l'ormeau *H. tuberculata* spp, composés exclusivement de sources végétales. Trois aliments isoprotéiques et isoénergétiques, à base d'algues, possédant des compositions biochimiques correspondantes à celles d'autres aliments artificiels, selon la révision, ont été formulés et préparés. Ces aliments expérimentaux sont actuellement testés face à deux aliments contrôle, l'un un aliment mixte contenant des algues fraîches *G. cornea* et *U. rigida*, et l'autre un aliment commercial. La composition biochimique et le contenu énergétique des aliments ont été analysés et seront associés à la performance de croissance, de survie, et à l'utilisation des aliments par les animaux.

Mots clés: Macroalgues, performances de croissance, ormeau Européen, *H. tuberculata* spp, *Gracilaria sp.*, *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, *Ulva sp.*, aliments artificiels

Commercial farming trials of abalone (*Haliotis tuberculata*) in offshore and intertidal sea cages: technical results

Sylvain Huchette¹, Anna Soler², Tony Legg³, Martin Syvret⁴, Andrew Fitzgerald⁴

1: France Haliotis, Kerazan, Plouguerneau - France

2: Irish Seaweed Centre, MRI, National University of Ireland, Galway.

3: Jersey Sea Farms, Le catillon, St. Martins, Jersey JE36BG, tony@legg.co.je

4: South Western Abalone Grower Association, U.K.

In the context of SUDEVAB, four commercial cage trials were programmed to assess the economical and technical feasibility of abalone farming in four different European countries. Three types of cages were tested: lanterns, ORTAC and large offshore cage. Three trials were successfully set up in western France (Aber Wrac'h), South western England (Portland) and South of Jersey in the Channel. The set up of a fourth trial in Spain aborted in the early stage of the set up due to very high handling mortalities in the first 2 weeks. The trial lasted from 18 to 21 months. Mortality was mostly observed in the early stage of the experiment probably associated to initial handling stresses. It ranged from 0 to 73% mortality. Growth ranged from 0.23 to 1.90 mm per month with the best growth obtained in France. The biomass gained over the 21 months of experiment ranged from 0 to 2 kg of abalone per square meter of available habitat. At a given density of abalone, the best biomass gain per square meter of available habitat was obtained in ORTAC cages in an offshore set up. Lantern cage were rapidly disqualified because of their fragility inadapted to intertidal and offshore set up. Large offshore cages were inadapted to intertidal set up but were very efficient to reduce labour feeding cost in offshore set up. Despite the very variable results between experimental sites, it appeared quite clearly that experience and know how are a key to success. Production cycle to reach 45 to 50 gr abalone from 20mm spat was evaluated at 3 years. Abalone farming remains a very "technical" activity.

Essais d'élevage de l'ormeau européen (*Haliotis tuberculata*) en cage en pleine mer et en zone intertidale : résultats techniques

Dans le cadre de SUDEVAB, quatre essais en cage commerciales ont été programmés afin d'évaluer la faisabilité économique et technique de l'aquaculture des ormeaux dans quatre pays européens différents. Trois types de cages ont été testés: lanternes, Ortac et grande cage offshore. Trois essais ont été mis en place avec succès dans l'ouest de la France (Aber Wrac'h), Sud-ouest de l'Angleterre (Portland) et au sud de Jersey dans la Manche. La mise en place d'un quatrième essai a échoué en Espagne lors de sa mise en place en raison de la mortalité très élevée liée à la manutention animaux dans les 2 premières semaines. Les essais ont duré entre 18 et 21 mois. La mortalité a principalement été observée au démarrage de l'expérience sans doute associée à la manipulation des animaux. Des taux de mortalité allant de 0 à 73% ont été observés. La croissance observée allait de 0,23 à 1,90 mm par mois, la meilleure croissance obtenue dans l'Aber Wrac'h. La biomasse acquise au cours des 21 mois d'expérience variait de 0 à 2 kg de ormeaux par mètre carré d'habitat disponible. A une densité donnée, le meilleur gain de biomasse par mètre carré d'habitat disponible a été obtenue dans des cages Ortac. Les cages de type lanterne ont été rapidement abandonnées en raison de leur fragilité inadaptée pour le milieu intertidales et offshore. Les grandes cages de type geobox étaient inadaptées à l'élevage sur estran due à leur importante « prise à l'eau », mais elles ont été très efficaces pour réduire les coûts de travail liés à l'alimentation dans le cadre d'un élevage en eau profonde. Malgré les résultats très variables entre les sites expérimentaux, il est apparu très clairement que l'expérience et le savoir faire sont les clés du succès. Le cycle de production pour obtenir des ormeaux de 45 à 50 gr à partir de naissain de 20mm a été évalué à 3 ans.

European abalone marketing

John Dallimore¹

1: Aqua Gold Fisheries GmbH - Germany

For aquaculture to be sustainable, a project has to be able to make money to repay its investment. To achieve this, a project has to be designed to function technically, but also to produce products that are in demand from the market. A project therefore should be a market led development – just because the technology exists to produce a product does not mean that a project will be economically successful unless the product it produces sells for a profit. Market analysis is there to ensure that the markets exist and that the demand and prices will provide the expected returns which will sustain the project development.

In the case of market analysis for abalone, the market data is difficult to obtain, clouded in secrecy, and has a large volume of “black” traded products being fished illegally due to high market prices. During SUDEVAB, extensive market data was collected to assess products available, prices in worldwide markets, volumes traded from aquaculture and wild production, and the future standards that have been developed by the WWF abalone dialogue for sustainable abalone production. In Work Package 8 an assessment was also undertaken to understand and estimate the potential demand for abalone in European markets and the type of products the European gastronomy sector desired. The marketing study concluded that there is a strong demand for “live” quality European abalone in Europe, and these products were also seen as premium products in the major Far Eastern markets.

Technical and economical analysis of three types of abalone farming systems in Europe

Sylvain Huchette¹, Michael O'Neil², Erwan Tonnerre³, Anna Soler⁴, Tony Legg⁵ and Martin Syvret⁶

1: France Haliotis, Kerazan, Plouguerneau - France

2: Aquatower product, Ireland

3: Groix Haliotis, Ile de Groix, France.

4: Irish Seaweed Centre, MRI, National University of Ireland, Galway.

5: Jersey Sea Farms, Le catillon, St. Martins, Jersey JE36BG, tony@legg.co.je

6: South Western Abalone Grower Association, U.K.

The technical and economic operation of three types of abalone farms were analyzed to better understand the potential of halioticulture in Europe. Slower growth are obtained by sea-farming compared to farmed land in semi-recirculating farms. The control of temperature and photoperiod allows for better growth performance and shorten the production cycle. However, the labour required for feeding and cleaning of tanks is more important in semi-recirculating systems. The rearing at sea requires the use of natural and live food, the algae that are more expensive but can also reduce maintenance time throughout the production cycle. The choice of farming system based on several technical and financial criteria such as the production site or the level of investment ... Abalone farming is a long-term economic adventure with many risks. The risks of long cycles that are often incompatible with the usual economic rhythms are also presented.

Etude technico-économique de trois types d'élevages d'ormeaux en Europe

Le fonctionnement technique et économique de trois type d'élevage d'ormeaux en fonctionnement a été analysé pour mieux comprendre les enjeux de l'halioticulture en Europe. Des croissances plus lentes sont obtenues par les élevages en mer en comparaison aux élevage à terre en circuit semi-fermé. Le contrôle des températures et de la photopériode permet d'obtenir de meilleures performances de croissance et de raccourcir le cycle de production. Cependant, la main d'œuvre nécessaire pour le nourrissage et le nettoyage des bassins est plus importante. L'élevage en pleine mer impose l'utilisation d'aliment naturel et vivant, les algues qui sont plus coûteuses mais permettent de réduire le temps d'intervention tout au long du cycle de production. Le choix du système d'élevage reposera sur plusieurs critères techniques et financiers tels que : le site de production ou le niveau d'investissement... L'élevage d'ormeaux est une aventure économique à long terme présentant de nombreux risques. Les risques d'un élevage long qui sont souvent incompatibles avec les rythmes économiques habituels sont présentés.