

Département Ressources Biologiques et Environnement
 Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade

Hervé CHAVANNE, Elise MAUROUARD, Caroline YONNEAU, Débora HEROIN, Christophe LEDU,
 Lionel DEGREMONT & Abdellah BENABDELMOUNA

**Convention DPMA-IFREMER n° 11/1219297
 relative à la mise en place d'un plan d'approvisionnement
 de sauvegarde 2011 de la filière ostréicole.**



Plan de sauvegarde 2011 : synthèse des résultats 2011-2012.



mars 2013

Table des matières

1. Introduction	4
2. Matériels et méthodes	5
2.1. Matériel biologique	5
2.2. Suivi biométrique : survie et poids	6
2.3. Détection du virus OsHV-1	7
2.4. Analyse du pedigree	8
2.5. Analyses statistiques	9
3. Résultats	11
3.1. Vérification du pedigree	11
3.1.1. <i>Diversité des marqueurs</i>	11
3.1.2. <i>Comparaison des génotypes</i>	13
3.2. Détection du virus OsHV-1	14
3.3. Performances de croissance à l'âge adulte du plan de sauvegarde 2010	15
3.3.1. <i>Synopsis</i>	15
3.3.2. <i>Croissance et sélection</i>	16
3.4. Paramètres de croissance	19
3.5. Mortalité	21
3.5.1. <i>Cinétique de mortalité</i>	21
3.5.2. <i>Taux de mortalité final</i>	23
4. Discussion	27
4.1. Vérification du pedigree	27
4.2. Détection du virus OsHV-1	27
4.3. Mortalité	28
4.4. Croissance	31
5. Conclusion	33
Annexe 1 : Historique des lots diploïdes « R »	34
Annexe 2 : Caractéristiques des huîtres utilisées pour le plan de sauvegarde 2011	38

1. Introduction

Depuis 2008 l'ostréiculture française subit de plein fouet les effets de la surmortalité estivale qui menace les approvisionnements en naissains et, par voie de conséquence, met en péril l'équilibre même de la filière. C'est dans ce contexte que l'IFREMER, la DPMA, le CNC, et des écloséries privées signataires ont mis en place le plan de sauvegarde 2011 (PS2) qui fait suite au premier plan de sauvegarde lancé en 2010 (PS1). L'objectif premier de ce plan est d'apporter une réponse au déficit de production grandissant en fournissant aux éclosiers des géniteurs présentant une résistance accrue aux mortalités estivales (caractère noté R dans la suite du rapport). Ces géniteurs, sélectionnés par l'IFREMER, sont des mâles tétraploïdes ($4nR$) qui, croisés avec des femelles diploïdes ($2n$), produisent du naissain triploïde portant le caractère amélioré ($3nR$). Ce plan prévoit également d'évaluer le caractère R sur différents lots, sélectionnés ou non, provenant à la fois de l'IFREMER et des écloséries. Le testage des lots a été conduit dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron et de façon continue sur une période d'environ 8 mois, avant, pendant et après les pics de mortalités 2012. Le présent rapport se limitera à présenter les résultats inhérents aux seules phases de testage des lots.

Les écloséries ayant pris part au plan de sauvegarde 2011 sont au nombre de 5. C'est dans ce cadre qu'elles ont chacune produit et fourni au moins un lot triploïde résistant ($3nR$). Elles ont également fourni chacune au moins un lot témoin triploïde ($3n$) produit à partir de tétraploïdes non R et, pour certaines d'entre elles, un lot témoin diploïde ($2n$) issu de leur propre parc géniteurs. L'IFREMER a de son côté produit et fourni les géniteurs mâles tétraploïdes $4n$ et $4nR$ qui ont servis à produire les triploïdes. Il a également fourni pour la campagne de testage des lots diploïdes sélectionnés de troisième génération ($2nR$) ainsi que des lots $2n$ produits à partir de géniteurs sauvages échantillonnés dans le bassin de Marennes-Oléron. Ces lots, qui font office de témoins non-sélectionnés, ont un parcours zootechnique entièrement connu, en particulier en ce qui concerne les épisodes de mortalité avant testage.

Afin de donner au lecteur une vision globale sur la façon dont le caractère survie (R) a été amélioré, nous reportons en annexe 1 et 2 les informations déjà présentées dans le précédent rapport complétées des données inhérentes au PS2.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Tous les lots ont été produits entre avril et septembre 2011 par les écloseries participantes (ci-après notées ECL0) et le Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER La Tremblade (LGP). Nous utiliserons par la suite le terme "groupe" pour qualifier la combinaison provenance des lots (ECL0/LGP) et niveau de ploïdie associé ou non au caractère R ($2n/2nR/3n/3nR$). Au total 26 lots ont été suivis dans le cadre du plan de sauvegarde 2011 dont 21 fournis par les écloseries. Les caractéristiques des lots testés sont résumées dans le tableau 1.

Les neuf lots ECL0- $3nR$ ont été produits à partir de parents présentant des niveaux de sélection variables, qu'il s'agisse des mâles $4nR$ (génome de 75 à 100% sélectionné) ou des femelles diploïdes R. Il faut donc s'attendre à une certaine hétérogénéité des lots ECL0- $3nR$ pour ce qui concerne le niveau de sélection atteint. Les lots témoins ECL0 $2n$ et $3n$ sont tous issus de lignées diploïdes propres aux écloseries sans que l'on sache si elles ont été ou non améliorées pour la survie, tandis que les mâles $4n$ utilisés pour produire les $3n$ n'ont subi aucune amélioration pour ce caractère. Les lots LGP- $2nR$ sont les descendants sélectionnés des familles G2A soumises à une nouvelle sélection massale, lesquelles avaient déjà été utilisées comme lot LGP- $2nR$ lors du précédent plan de sauvegarde. Il est donc probable qu'ils se distinguent de ces derniers par une meilleure survie aux mortalités estivales. En provenance du LGP également deux lots témoins produits à partir de géniteurs échantillonnés sur des bancs sauvages dans le bassin de Marennes-Oléron (LGP- $2n$). A la différence des $2n$ en provenance des écloseries, le parcours zootechnique des lots LGP- $2n$ est entièrement connu.

Tableau 1 : Caractéristiques des lots testés dans le cadre du PS2. Origine : lots produits par les écloséries privées (ECLO) et par le Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER (LGP).

origine	ploïdie	lot	date de ponte	réception au LGP	taille à réception	huîtres/poche (Agnas)	huîtres/poche (Floride)	
ECLO	2n	Z6	04/07/2011	08/11/2011	T6	200	200	
		Z8	03/08/2011	08/11/2011	T6	200	200	
		Z13	08/07/2011	23/11/2011	T5	100	100	
		Z14*	31/08/2011	23/11/2011	T3	100	200	
		Z25*	22/06/2011	15/12/2011	T4	100	200	
	3n	Z2	19/04/2011	21/10/2011	T9	200	200	
		Z4	01/06/2011	08/11/2011	T6	200	200	
		Z7	13/07/2011	08/11/2011	T6	100	100	
		Z12	23/08/2011	23/11/2011	T2	200	200	
		Z15*	28/06/2011	23/11/2011	T5	50	100	
		Z17	14/04/2011	13/12/2011	T4	100	100	
		Z26	23/06/2011	15/12/2011	T4	200	200	
		3nR	Z3	23/06/2011	21/10/2011	T6	200	200
	Z5		23/06/2011	08/11/2011	T6	100	100	
	Z10		12/07/2011	23/11/2011	T4	100	100	
	Z11		04/08/2011	23/11/2011	T3	200	200	
	Z16*		13/09/2011	23/11/2011	T2	100	200	
	Z18		01/06/2011	13/12/2011	T4-T8	200	200	
	Z19		09/09/2011	13/12/2011	T3	100	100	
	Z24		04/08/2011	15/12/2011	T4	100	100	
	LGP	2n	Z27	09/08/2011	20/02/2012	T6	100	100
			Z21	16/05/2011	15/12/2011	T15	200	200
Z23		31/08/2011	15/12/2011	T6	200	200		
2nR		Z9	31/08/2011	21/11/2011	T8	200	200	
		Z20	16/05/2011	15/12/2011	T15	200	100	
Z22	31/08/2011	15/12/2011	T6	200	200			

* : densité par poche à La Floride double de celle d'Agnas.

2.2. Suivi biométrique : survie et poids

Les lots ECLO ont été réceptionnés par le LGP du 21/10/2011 au 20/02/2012 et stockés dans un bac de 800 litres du laboratoire dans l'attente de leur transfert sur estran, en mars 2012. La phase de stockage avant testage a donc duré de 30 à 149 jours en fonction des lots. Durant cette période la mortalité, variable en fonction des lots (1 à 87%), a été mesurée afin d'être prise en compte dans l'analyse des résultats.

Comme pour le PS1, le testage sur estran a été réalisé dans le bassin de Marennes-Oléron sur les sites d'Agnas et de La Floride. Le suivi sur un troisième site, à l'éclosérie du LGP dans un bassin de

800 litres, a dû être interrompu dès le mois de juillet en raison de mortalités précoces et récurrentes reproductibles à *Vibrio aesturianus*. Celles-ci, en touchant indistinctement les lots R et non R, diploïdes comme triploïdes, ont biaisé le caractère survie, les lots R n'ayant pas été sélectionnés pour une résistance au vibrion. Les données relevant de ce site ont donc été exclues des analyses.

Tous les lots ont été testés sur les deux sites, avec une poche de 100 à 200 huîtres par site, à l'exception d'un lot ECLO-3n à Agnas contenant 50 individus, ce nombre variant en raison des mortalités survenues avant mise sur estran. Il n'y avait pas de réplicats pour chaque lot car nous avons considéré que le testage a pour but d'estimer les performances des naissains du groupe ECLO-3nR (triploïdes R) produits durant une année donnée par toutes les écloséries et non pas de tester les performances relatives des naissains triploïdes R de chaque éclosérie. Dans notre cas de figure, les différents lots sont à considérer comme autant de réplicats pour leur groupe respectif (groupe ECLO-3nR). Le testage a débuté avec la mise à l'eau des poches le 20/03/2012 sur le site d'Agnas et le 22/03/2012 sur le site de La Floride. Un lot (**Z21**) a cependant été mis sur estran avec deux semaines de retard le 05/04/2012.

Le suivi des mortalités a débuté en juin et s'est prolongé jusqu'au mois d'octobre inclus (fin de testage le 22/10/2012) avec un comptage mensuel des mortes et des vivantes. Pour le suivi de la croissance, deux paramètres ont été enregistrés pour chaque poche en début et fin de testage : le poids individuel de 30 huîtres et le poids total des huîtres vivantes.

2.3. Détection du virus OsHV-1

Le virus OsHV-1 est suspecté d'être impliqué de façon prépondérante dans le phénomène des mortalités massives et, par conséquent, reste le facteur principal sur lequel l'amélioration pour la survie est susceptible d'opérer. Il est donc utile de connaître le niveau d'infection des lots testés afin d'interpréter au mieux les niveaux de mortalités observés.

La recherche de la présence du virus OsHV-1 a été effectuée par la technique analytique du laboratoire national de référence (Ifremer, La Tremblade). Elle a été réalisée sur tous les lots avant

(du 8/11/2011 au 15/12/2011), pendant (début juin 2012) et après le pic de mortalité (18/09/2012) (tableau 2). Pendant la période de mortalité massive l'échantillonnage a porté exclusivement sur des individus moribonds (morts depuis peu ou sur le point de mourir), alors qu'avant et après cette période l'échantillonnage s'est fait de façon préférentielle mais non systématique sur ces mêmes individus. Des analyses sanitaires ont également été effectuées durant la période de stockage sur certains lots ayant subis de fortes pertes.

Tableau 2 : Nombre d'échantillons analysés par lot pour la détection d'OshV-1. avant/pic/après : échantillonnage avant/pendant/après le pic de mortalité ; réception/stockage/Floride/Agnas : échantillonnage à réception des lots/en éclosérie avant mise sur estran/sur estran à La Floride/sur estran à Agnas.

lot	origine	avant		pic		après
		réception	stockage	La Floride	Agnas	Agnas
Z6		10	5	5	5	10
Z8		10	5	5	5	10
Z13	ECLO-2n	10	0	5	5	10
Z14		10	0	5	5	5
Z25		10	0	0	5	4
Z2		10	3	5	5	10
Z4		10	5	5	5	10
Z7		10	5	5	5	10
Z12	ECLO-3n	10	0	5	5	10
Z15		10	5	5	5	10
Z17		10	0	5	5	5
Z26		10	0	4	0	3
Z3		10	0	5	5	10
Z5		10	5	5	5	10
Z10		10	1	5	5	9
Z11		10	0	3	5	8
Z16	ECLO-3nR	10	0	5	5	10
Z18		10	0	5	5	10
Z19		10	0	6	5	9
Z24		10	5	5	5	10
Z27		10	0	5	2	10
Z21	LGP-2n	10	5	5	5	10
Z23		10	5	5	5	10
Z9		10	0	5	5	10
Z20	LGP-2nR	10	1	0	2	10
Z22		10	5	4	5	10

2.4. Analyse du pedigree

Les provenances variées des lots 3nR, produits par 5 écloséries différentes, les nombreux transferts dont ils ont fait l'objet ainsi que la spécificité des géniteurs utilisés pour les produire (♂ 4nR et ♀ 2nR en provenance de l'IFREMER) impose que l'on vérifie leur pedigree. Cela a été réalisé en génotypant, sur 4 marqueurs microsatellites (CG10, L10, CG49 et Amy), tous les lots 3nR et des individus apparentés à leurs géniteurs, les vrais géniteurs n'ayant pu être échantillonnés. Leurs profils génétiques ont ensuite été comparés. Les génotypages réalisés sur les différents groupes sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Nombres de génotypages réalisés avec 4 marqueurs microsatellites sur les lots ECLO-3nR et des individus appartenant au même pool de géniteurs que leurs parents (géniteurs ♀ et ♂). croisements (♀) et (♂) : plans de croisement à l'origine des lots ECLO-3nR, les chiffres correspondant aux exposants reportés dans la colonne « lots ».

lots	ploidie	types	nombre d'échantillons	croisements (♀) x (♂)
G5R1 ¹	2nR	géniteurs ♀	25	-
G5R2 ²	2nR	géniteurs ♀	20	-
G5R3 ³	2nR	géniteurs ♀	25	-
G5R4 ⁴	2nR	géniteurs ♀	21	-
G5R5 ⁵	2nR	géniteurs ♀	25	-
G5R6 ⁶	2nR	géniteurs ♀	20	-
G6R1 ⁷	2nR	géniteurs ♀	30	-
G6R5 ⁸	2nR	géniteurs ♀	18	-
G6R25 ⁹	2nR	géniteurs ♀	20	-
G7R5 ¹⁰	2nR	géniteurs ♀	5	-
4n4R5-Sp ¹¹	4nR	géniteurs ♂	61	-
4n4R55 ¹²	4nR	géniteurs ♂	40	-
Z03	ECLO-3nR	descendant	30	(8+9) x (11)
Z05	ECLO-3nR	descendant	30	(1+2+3+4+5+6) x (11)
Z10	ECLO-3nR	descendant	30	(7+8+9+10) x (11)
Z11	ECLO-3nR	descendant	30	(2+4+6+8+9+10) x (11)
Z16	ECLO-3nR	descendant	30	(10+G7R15) x (12)
Z18	ECLO-3nR	descendant	30	(8+9) x (11)
Z19	ECLO-3nR	descendant	30	(10+G7R15) x (12)
Z24	ECLO-3nR	descendant	10	(9) x (11)
Z27	ECLO-3nR	descendant	30	(9) x (11)

2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Pour le taux de mortalité T_m , une analyse de variance (procédure ANOVA) a tout d'abord permis d'identifier les facteurs principaux. Elle a permis d'exclure l'effet supposé des mortalités survenues pendant la période de stockage à l'Iframer avant le début du testage. La procédure GLIMMIX a ensuite été utilisée en faisant le choix d'une distribution binomiale avec Logit comme fonction de liaison et en appliquant le modèle linéaire généralisé suivant :

$$T_m = \text{groupe} + \text{site} + \text{groupe} * \text{site} + P_i + \text{lot}(\text{groupe})$$

avec comme variable de réponse T_m correspondant au rapport entre les événements de mortalité sur l'ensemble des événements observés par poche; les effets fixes *groupe* (facteur provenance ECLO/LGP combiné au facteur ploïdie 2n/2nR/3n/3nR), *site* (site de testage d'Agnas et de La Floride) et P_i (poids individuel en début de testage) et l'interaction *groupe*site*; enfin l'effet aléatoire Lot hiérarchisé à l'effet groupe *lot(groupe)*.

Pour l'analyse de la croissance nous avons calculé le rendement journalier RJ , qui combine les caractères croissance et survie. Il exprime le gain de croissance en pourcentage journalier et s'écrit sous la forme :

$$RJ = 100 \times \frac{(Pv_f - Pv_i)}{Pv_i \times j}$$

où Pv_i et Pv_f représentent les poids par poche des huîtres vivantes en début et fin de testage et j est la durée du testage exprimée en jours. Cependant, en raison de la grande variabilité entre lots du nombre d'huîtres en début de testage (50 à 200) et du nombre d'huîtres survivantes en fin de testage (1 à 178), un autre paramètre, que nous appellerons rendement journalier ajusté (RJA), a également été calculé en utilisant la formule suivante :

$$RJA = 100 \times \left[\frac{\left(Pv_f - Pv_i \times \frac{N_f}{N_i} \right)}{Pv_i \times \frac{N_f}{N_i} \times j} \right] \times \frac{200}{N_i}$$

où N_i et N_f correspondent aux nombres d'huîtres vivantes par poche en début et fin de testage.

La comparaison des poids individuels en début et en fin d'expérience a été réalisée avec la procédure ANOVA de SAS. Les coefficients de corrélations entre le *RJA* et le taux de mortalité d'une part et le poids et l'âge à la date de mise sur estran d'autre part ont été déterminés à l'aide de la procédure CORR. La procédure REG a été utilisée pour étudier la cinétique de mortalité durant les quatre derniers mois de testage en estimant les coefficients a et b de la relation linéaire $y = a \times x + b$ reliant le taux de mortalité à la date de mesure. Enfin, pour le poids comme pour le taux de mortalité, la significativité des différences entre traitements pris deux-à-deux a été testée par le calcul des contrastes (instruction CONTRAST).

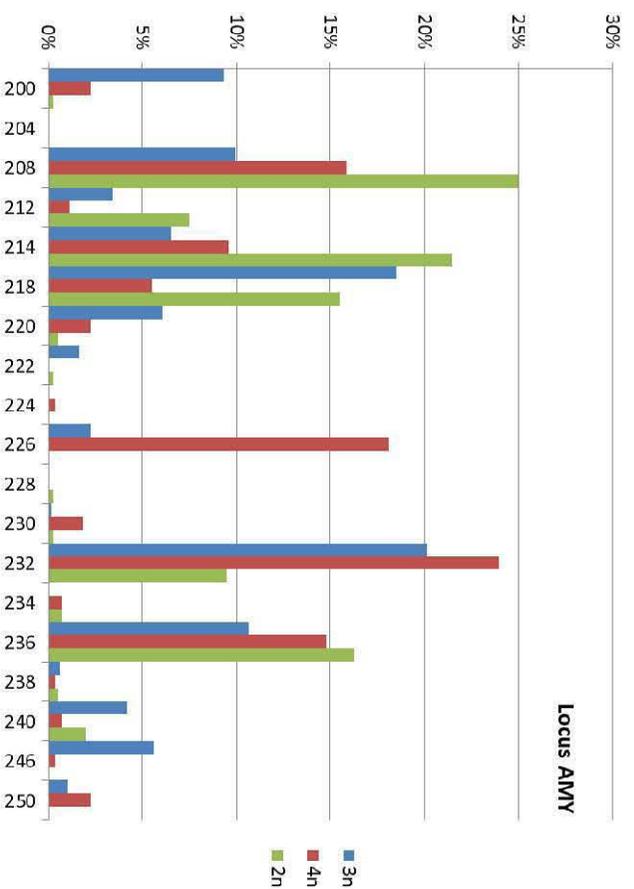
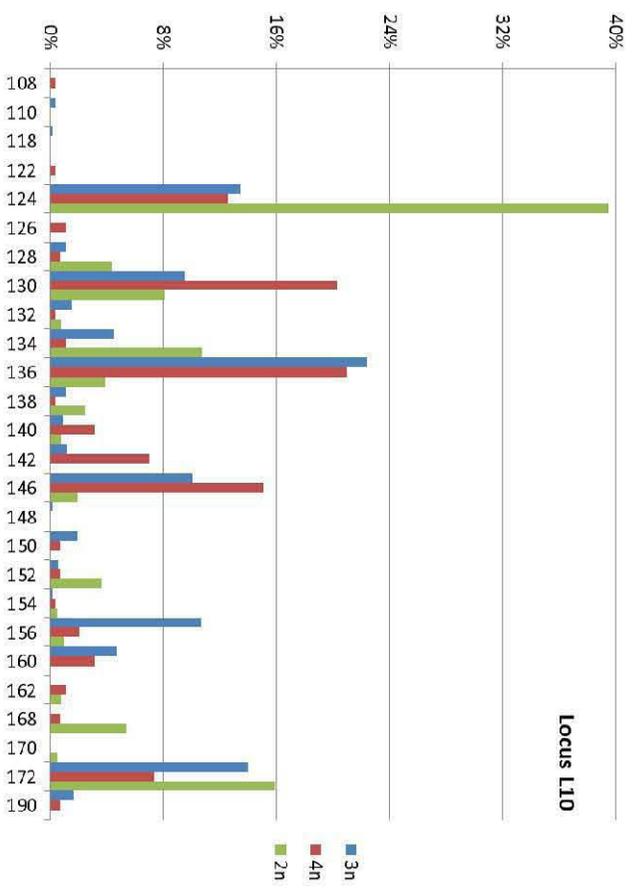
3. Résultats

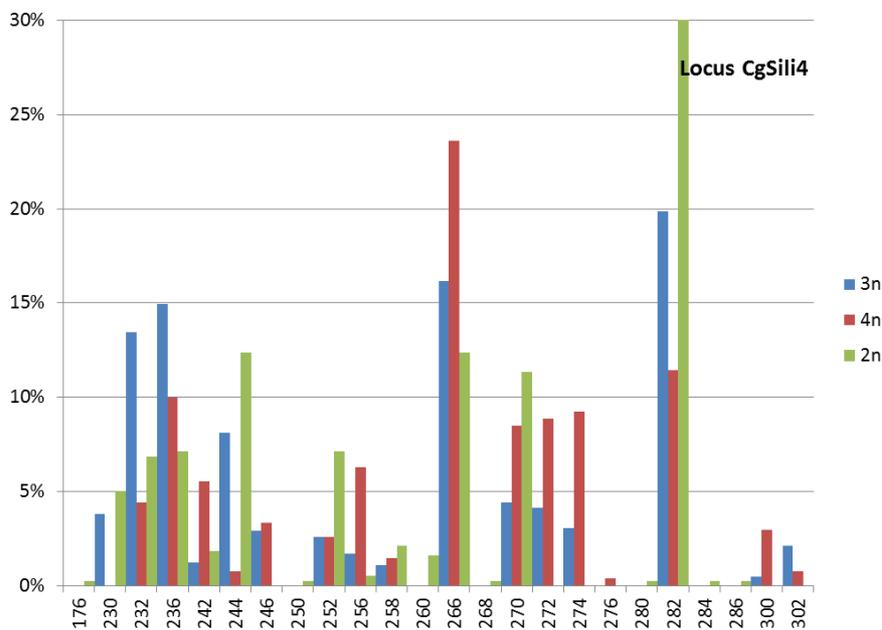
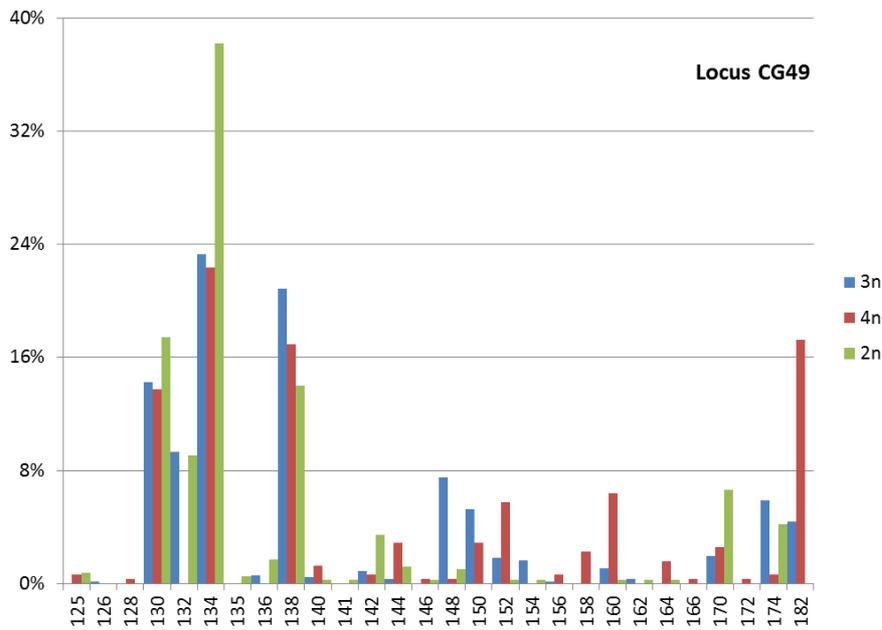
3.1. Vérification du pedigree

3.1.1. *Diversité des marqueurs*

La diversité allélique globale reste relativement élevée avec un minimum de 19 allèles pour le locus AMY et jusqu'à 28 allèles pour le locus CG49. Cependant cette diversité chute fortement au niveau des groupes parentaux comme dans le cas des femelles consanguines G7R5 dont la moyenne se limite à 3,5 allèles par locus. La diversité maximale pour un groupe parental donné se retrouve chez les femelles non consanguines G6R25 avec une valeur proche de 10 allèles par locus. Les fréquences alléliques sont hautement variables d'un allèle à l'autre, certains allèles dominants se rapprochant des 40% (figures 1 – locus L10). D'autres allèles très présents chez les parents disparaissent dans la descendance comme pour l'allèle 226 du locus AMY. A l'inverse certains allèles moyennement présents chez les parents deviennent dominants dans la descendance (allèle 124 du locus L10). Le pourcentage d'allèles sans génotypes est largement plus élevé chez les 4n avec un total de 12,7% sur les 4 loci suivi par les 2n (4,0%) et les 3n (1,5%).

Figures 1 : Fréquences alléliques aux locus L10, AMY, CG49 et CgSili4 pour le groupe 3nR et leurs parents diploïdes et tétraploïdes.





3.1.2. Comparaison des génotypes

Les 9 lots 3nR ont été produits à partir de différents groupes parentaux en croisant un lot de mâles avec un à six lots de femelles pour un total de deux à dix lots utilisés respectivement (tableau 3). Les effectifs des lots parentaux distribués aux écloséries sont présentés en annexe 2.

La comparaison des profils génétiques entre parents et enfants aux quatre loci considérés s'intéresse aux différences de type exclusives c'est à dire à la fois fortes (nombre de nouveaux allèles élevés),

répétitives (même nouvel allèle rencontré plusieurs fois) et significatives (différences de ± 2 pb). Ces résultats sont synthétisés par lot et pour chaque locus dans le tableau 4.

Tableau 4 : Différences génotypiques aux loci considérés entre les parents 2n et 4n et leur descendance 3nR. Valeurs entre parenthèses : nombre allèles associés au nombre de différences.

lot	Types de différences	L10	AMY	CG49	CgSili4	Total
Z3	sans génotype	0	0	0	1	1
	± 2 pb	0	0	5	0	5
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z5	sans génotype	0	0	0	2	2
	± 2 pb	1	0	0	0	1
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z10	sans génotype	0	0	0	0	0
	± 2 pb	0	0	0	0	0
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z11	sans génotype	0	0	0	0	0
	± 2 pb	3	0	0	0	3
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z16	sans génotype	2	4	2	2	10
	± 2 pb	1	1	1	4	7
	$> \pm 2$ pb	3 (2)	3 (1)	3 (1)	3 (1)	12 (5)
Z18	sans génotype	0	0	0	0	0
	± 2 pb	9	0	0	0	9
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z19	sans génotype	0	0	0	2	2
	± 2 pb	0	0	1	1	2
	$> \pm 2$ pb	10 (1)	32 (2)	0	1	43 (3)
Z24	sans génotype	0	0	0	0	0
	± 2 pb	0	0	0	0	0
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0
Z27	sans génotype	6	6	0	12	24
	± 2 pb	0	0	2	0	2
	$> \pm 2$ pb	0	0	0	0	0

3.2. Détection du virus OsHV-1

La recherche du virus au moment du pic de mortalité fait apparaître une présence systématique du pathogène dans tous les lots à l'exception d'une huître sur les 237 analysées (tableau 5). Ce pourcentage baisse fortement au moment de la réception des lots et après le pic de mortalité. A noter l'absence de signal (donc l'absence supposée du virus ou une présence en quantité inférieure

au seuil de détection de la technique analytique utilisée) chez les Eclo-2n et les LGP-2nR à réception des lots et après le pic de mortalité, respectivement. La quantité d'ADN détectée est relativement élevée durant le pic de mortalité, au-dessus de 10^4 copies d'ADN viral par mg de tissu donc à un niveau considéré comme critique pour l'apparition de signes cliniques. Ce nombre baisse avant et après le pic de mortalité où le nombre de copies d'ADN viral se compte par dizaines à quelques centaines.

Tableau 5 : Résultats analytiques de la recherche de la présence du virus dans les 26 lots regroupés par groupe et par date d'échantillonnage.

	Groupe	Nombre d'échantillons analysés	Fréquence de détection	Quantité d'ADN*
Réception	Eclo-2n	50	0%	0
	Eclo-3n	70	19%	3E+01
	Eclo-3nR	90	33%	6E+02
	LGP-2n	20	35%	4E+01
	LGP-2nR	30	30%	1E+02
Pic mortalité (Agnas)	Eclo-2n	25	100%	1E+04
	Eclo-3n	30	100%	1E+04
	Eclo-3nR	42	100%	2E+04
	LGP-2n	10	100%	2E+04
	LGP-2nR	12	100%	2E+04
Pic mortalité (La Floride)	Eclo-2n	20	100%	2E+04
	Eclo-3n	34	100%	4E+04
	Eclo-3nR	45	98%	1E+04
	LGP-2n	10	100%	1E+04
	LGP-2nR	9	100%	2E+04
Après le pic (Agnas)	Eclo-2n	39	23%	1E+02
	Eclo-3n	58	19%	1E+02
	Eclo-3nR	86	2%	2E+01
	LGP-2n	20	10%	2E+01
	LGP-2nR	30	0%	0

* : exprimée en nombre de copies d'ADN viral par mg de tissu.

3.3. Performances de croissance à l'âge adulte du plan de sauvegarde 2010

3.3.1. Synopsis

Durant l'année 2012, 24 lots du plan de sauvegarde 2010 (PS1) ont été mis en testage sur estran, sur le site d'Agnas. Nous nous intéresserons ici aux résultats liés aux seuls paramètres de croissance, les lots ayant été peu affectés par la mortalité (7% en moyenne, pas de différence significative entre

groupes) en raison de la taille des huîtres en début de testage (15 g en moyenne pour un âge de 18 mois).

Le 21 mars 2012, 24 lots du PS1 ont été comptés, pesés (poids par poche et poids individuel) et mis en poche (une poche par lot, tableau 6). En fin d'expérimentation, 212 jours plus tard, les morts et les vivants de chaque lot ont été comptés et le poids des vivants mesuré, dont 30 individuellement.

Les codes spécifiant le niveau de ploïdie (2n, 3n, 2nR et 3nR) et l'origine des lots (ECLO et LGP) suivent les mêmes définitions que dans le PS2.

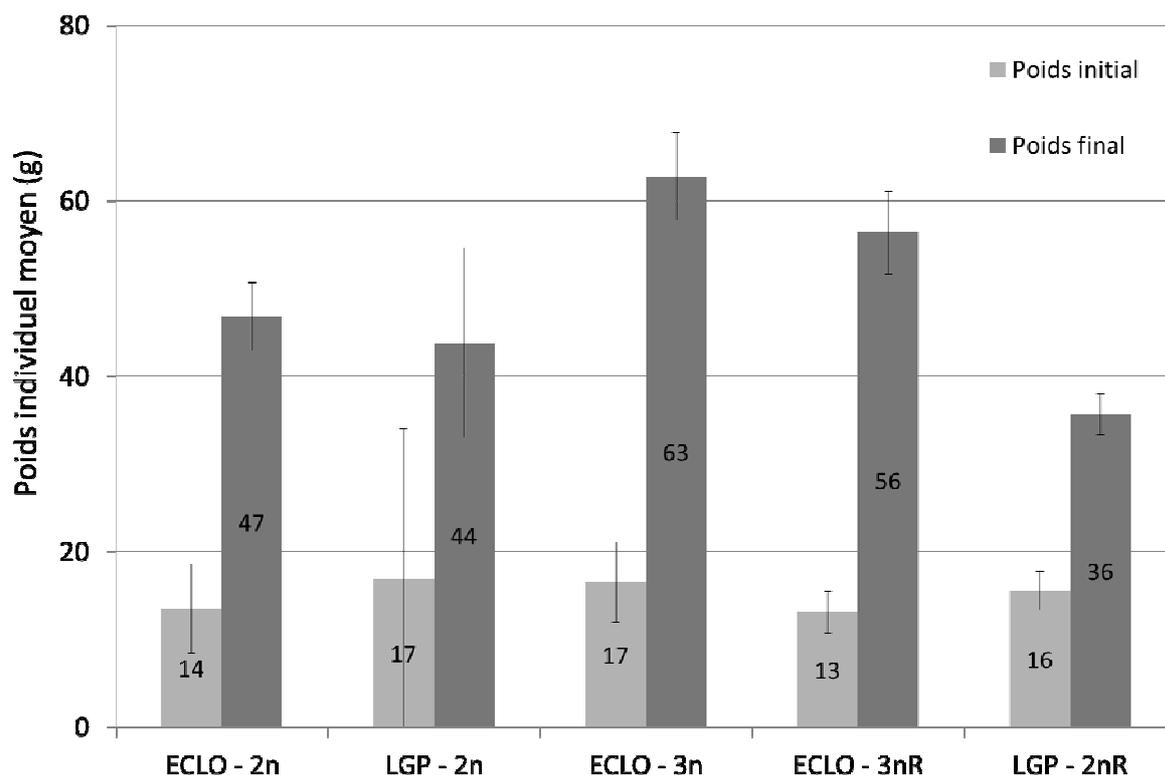
Tableau 6 : Caractéristiques des lots en provenance du PS1 testés en 2012. Origine : lots produits par les écloséries privées (ECLO) et par le Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER (LGP). * et ** : début et fin d'expérimentation les 21/03/2012 et 23/10/2012, respectivement.

origine	ploïdie	lot	poids individuel moyen initial (g)*	poids individuel moyen final (g)**	âge début testage	huîtres par poche
ECLO	2n	PS2	20,3	53,4	643	201
		PS12	14,5	41,7	606	84
		PS16	14,5	45,2	733	165
		PS25	4,8	47,0	547	167
	3n	PS3	23,6	70,4	636	204
		PS5	22,9	66,1	645	199
		PS14	18,7	68,8	684	115
		PS19	9,6	53,8	669	87
		PS26	8,0	54,8	533	192
	3nR	PS1	19,9	65,7	628	202
		PS4	22,2	65,6	651	194
		PS11	11,7	74,2	605	129
		PS13	13,6	57,6	599	115
		PS15	14,9	57,9	581	203
		PS17	16,8	59,5	593	200
		PS18	8,9	46,0	654	136
PS24		7,9	46,2	545	203	
PS27	2,4	34,5	564	114		
LGP	2n	NAT1	19,6	45,5	591	109
		NAT2	14,2	42,1	591	48
	2nR	PS6	14,0	33,1	627	88
		PS8	12,5	33,5	616	166
		PS20	17,7	37,0	616	207
		PS21	18,1	39,1	573	203

3.3.2. Croissance et sélection

L'analyse montre une forte variabilité du poids individuel entre lots (erreur standard élevée avec $p < 0,0001$) en début d'expérimentation sans qu'aucune différence n'apparaisse entre groupes ($p = 0,98$) (figure 2). En fin d'expérimentation la variabilité se maintient entre lots et se renforce entre groupes au point de devenir significative ($p = 0,0025$).

Figure 2 : Poids individuel moyen par groupe du plan de sauvegarde 2010 (PS1) en début et fin d'expérimentation. Barres d'erreur : intervalle de confiance pour $\alpha = 0,05$.



Une analyse plus détaillée, par contrastes, révèle en fin d'expérimentation des différences marquées entre, d'une part, les lots diploïdes sélectionnés 2nR et, d'autre part, les lots triploïdes 3n et 3nR, ces derniers présentant de meilleurs taux de croissance. Des différences qui se manifestent également, mais dans une moindre mesure, entre les 3n et les 2n. Toutefois, à même niveau de ploïdie, il n'y a pas de différence significative entre amélioré R et non amélioré (tableau 7).

Tableau 7 : Tests de significativité par contrastes pour le poids individuel final moyen entre groupes du plan de sauvegarde 2010 (PS1) en fin d'expérimentation. * : test suivant la distribution F de Snedecor.

Contraste	Valeur F	Prob>F*
-----------	----------	---------

ECLO-2n vs. ECLO-3n	4,8	0,04
ECLO-2n vs. ECLO-3nR	3,0	0,10
ECLO-2n vs. LGP-2n	0,2	0,66
ECLO-2n vs. LGP-2nR	3,9	0,06
ECLO-3n vs. ECLO-3nR	0,6	0,45
ECLO-3n vs. LGP-2n	4,9	0,04
ECLO-3n vs. LGP-2nR	18,4	<0,001
ECLO-3nR vs. LGP-2n	3,3	0,08
ECLO-3nR vs. LGP-2nR	16,6	<0,001
LGP-2n vs. LGP-2nR	1,4	0,25

En raison des taux de survie élevés, les valeurs de rendements *RJ* et *RJA* sont très similaires ($p=0,29$, $r=0,99$). Le rendement journalier *RJ* moyen est de 2,0 %/jour, il varie de 0,4 à 7,6 entre lots et de 0,8 à 2,5 entre groupes (tableau 8). Les différences de rendements entre groupes s'estompent au point de devenir non significatives.

Tableau 8 : Rendement journalier *RJ* par lot et par groupes du plan de sauvegarde 2010 (PS1).

origine	ploïdie	lot	<i>RJ</i>	<i>RJ</i> par groupe
ECLO	2n	PS02	0,7%	2,1%
		PS12	2,0%	
		PS16	1,2%	
		PS25	4,5%	
	3n	PS03	0,8%	2,1%
		PS05	0,8%	
		PS14	2,0%	
		PS19	4,3%	
	3nR	PS26	2,6%	2,5%
		PS01	1,0%	
		PS04	0,8%	
		PS11	3,5%	
		PS13	2,5%	
		PS15	1,1%	
		PS17	1,1%	
		PS18	2,7%	
PS24	2,0%			
LGP	2n	PS27	7,6%	2,2%
		NAT1	1,1%	
	NAT2	3,4%		
	2nR	PS06	1,3%	0,8%
		PS08	0,9%	
	PS20	0,4%		

3.4. Paramètres de croissance

Le poids (individuel ou par poche) a été utilisé comme mesure de base pour étudier les paramètres associés à la croissance et vérifier la façon dont ceux-ci pourraient éventuellement interagir avec le caractère survie. A l'exception du lot ECL0-3n **Z26**, caractérisé par un taux de mortalité de 100% en fin de testage, tous les lots ont fourni des données de croissance en début et fin de testage sur les deux sites choisis.

Lors de la mise sur estran, le poids individuel moyen de chaque lot (tableau 9) était homogène entre sites (t-test par paires : $p=0,18$) et fortement corrélé ($r=0,98$) avec une forte hétérogénéité entre lots, le test de Tukey mettant en évidence 5 groupes significativement différents, indépendamment du niveau de ploïdie ou de l'origine des lots (ECL0 ou LGP). Aucune différence significative n'apparaît entre les groupes (test Tukey ANOVA SAS). En fin de testage le cadre change, avec un poids individuel moyen intra-lot significativement supérieur à La Floride (t-test par paires : $p=0,01$), également corrélé entre sites ($r=0,81$), les lots étant plus homogènes qu'en début du testage (2 groupes distincts apparaissent avec le test de Tukey).

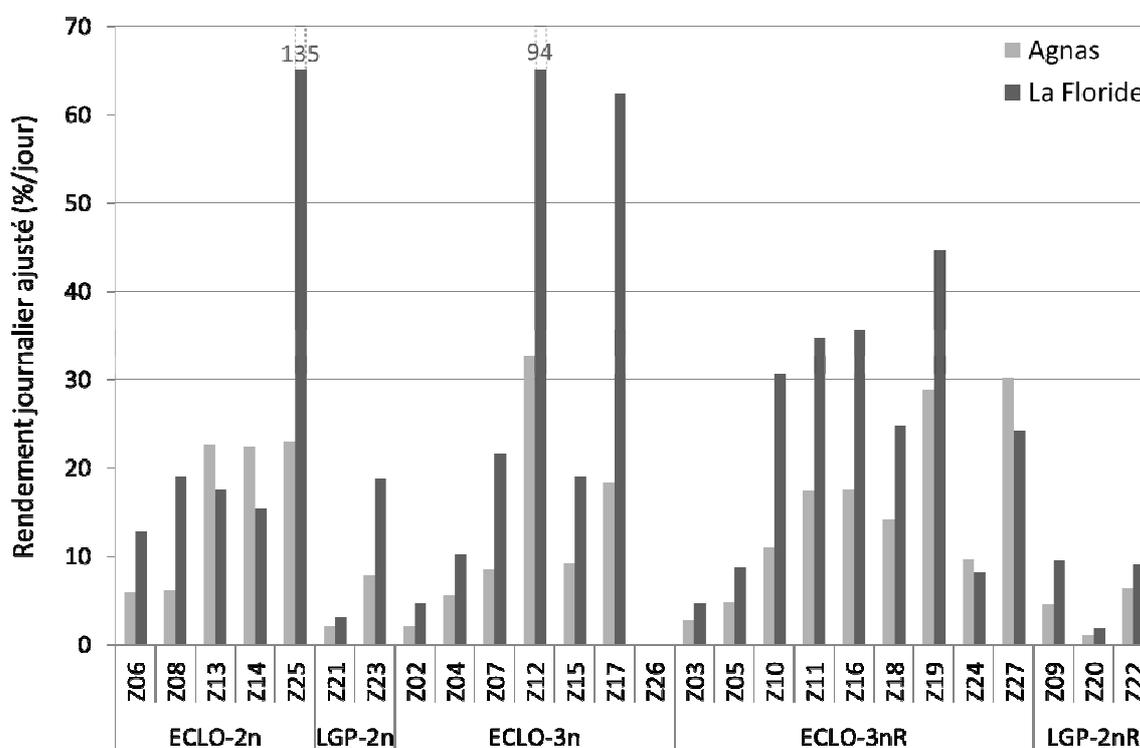
Tableau 9 : Poids individuel moyen par lot, par groupe et par site en début et fin de testage. * : absence de poids en raison de l'absence de survivants en fin de testage.

lot	origine	poids individuel initial			poids individuel final		
		Agnas	La Floride	moyenne	Agnas	La Floride	moyenne
Z6		1,34	0,90		18,2	25,4	
Z8		1,47	0,76		20,6	31,2	
Z13	ECL0-2n	0,89	0,68	0,78	22,2	25,8	21,7
Z14		0,71	0,43		17,7	14,5	
Z25		0,40	0,22		10,0	32,0	
Z2		6,54	4,82		35,9	51,8	
Z4		2,27	1,48		28,9	33,5	
Z7		1,33	0,89		25,4	41,7	
Z12	ECL0-3n	0,37	0,27	1,52	13,3	27,1	28,3
Z15		1,29	0,78		26,5	31,9	
Z17		0,40	0,23		8,2	15,7	
Z26		0,48	0,21		*	*	
Z3	ECL0-3nR	4,79	3,48	1,08	31,8	38,4	17,1
Z5		2,43	1,84		27,3	35,7	

Z10		1,06	0,70		13,3	23,4	
Z11		0,58	0,33		11,3	12,4	
Z16		0,50	0,34		9,8	13,2	
Z18		0,93	0,43		14,8	11,7	
Z19		0,28	0,20		9,0	9,7	
Z24		0,62	0,34		13,3	6,3	
Z27		0,31	0,30		10,3	15,5	
Z21	LGP-2n	4,87	4,06		26,6	30,5	
Z23	LGP-2n	1,01	0,71	2,66	17,8	28,7	25,9
Z9		1,53	0,91		16,1	19,2	
Z20	LGP-2nR	6,03	6,03	2,80	19,1	29,2	20,4
Z22		1,30	0,99		18,6	19,9	

Logiquement, le rendement journalier ajusté *RJA* en fin de testage (figure 3) est largement supérieur au rendement journalier *RJ* (moyenne de 19.7% contre 4.3%) car, en prenant en compte les effectifs initiaux et finaux, *RJA* exprime avant tout l'effet croissance, plutôt que l'effet combiné croissance et survie. Comme pour le poids individuel en fin de testage nous retrouvons aussi des niveaux de rendements significativement supérieurs à La Floride (t-test par paires : $p=0,02$).

Figure 3 : Rendement journalier ajusté *RJA* en fin de testage en fonction des lots. Les lots **Z12**, **Z17** et **Z25** ne comptent que 1 à 7 individus par poche en fin de testage.



L'analyse des corrélations met en évidence, en intra-site mais également en inter-sites, des relations significatives entre paramètres associant croissance et mortalité. Les corrélations entre le taux de mortalité T_m et RJA sont positives, elles deviennent négatives entre le poids initial P_i et T_m ainsi qu'entre P_i et RJA (tableau 10). A noter que les corrélations en intra et inter-sites entre P_i et RJA sont identiques ($r \approx -0,66$ et $p < 0,001$) si l'on élimine de l'analyse les trois lots comptant le moins de survivants par poche (entre 1 et 7 pour **Z12**, **Z17** et **Z25**). A noter également qu'aucune corrélation significative n'est trouvée entre T_m et l'âge des lots en début de testage (tableau 11), et ce malgré la relation significative liant P_i le et l'âge et la grande variabilité de ce dernier (187 à 336 jours).

Tableau 10 : Corrélation de Pearson r entre le poids individuel initial moyen par lot P_i , le rendement journalier ajusté RJA en fin de testage et le taux de mortalité T_m en fin de testage. * : test de significativité suivant la distribution t de Student.

Site	$T_m \times RJA$		$P_i \times RJA$		$P_i \times T_m$	
	r	p-value*	r	p-value*	r	p-value*
Agnas	0,44	0,026	-0,68	<0,001	-0,56	0,003
La Floride	0,45	0,023	-0,45	0,026	-0,58	0,002
2 sites	0,40	0,004	-0,45	0,001	-0,57	<0,001

Tableau 11 : Corrélation de Pearson r de l'âge des lots en début de testage Age avec le poids individuel initial moyen par lot P_i , le rendement journalier ajusté RJA en fin de testage et le taux de mortalité T_m en fin de testage. * : test de significativité suivant la distribution t de Student.

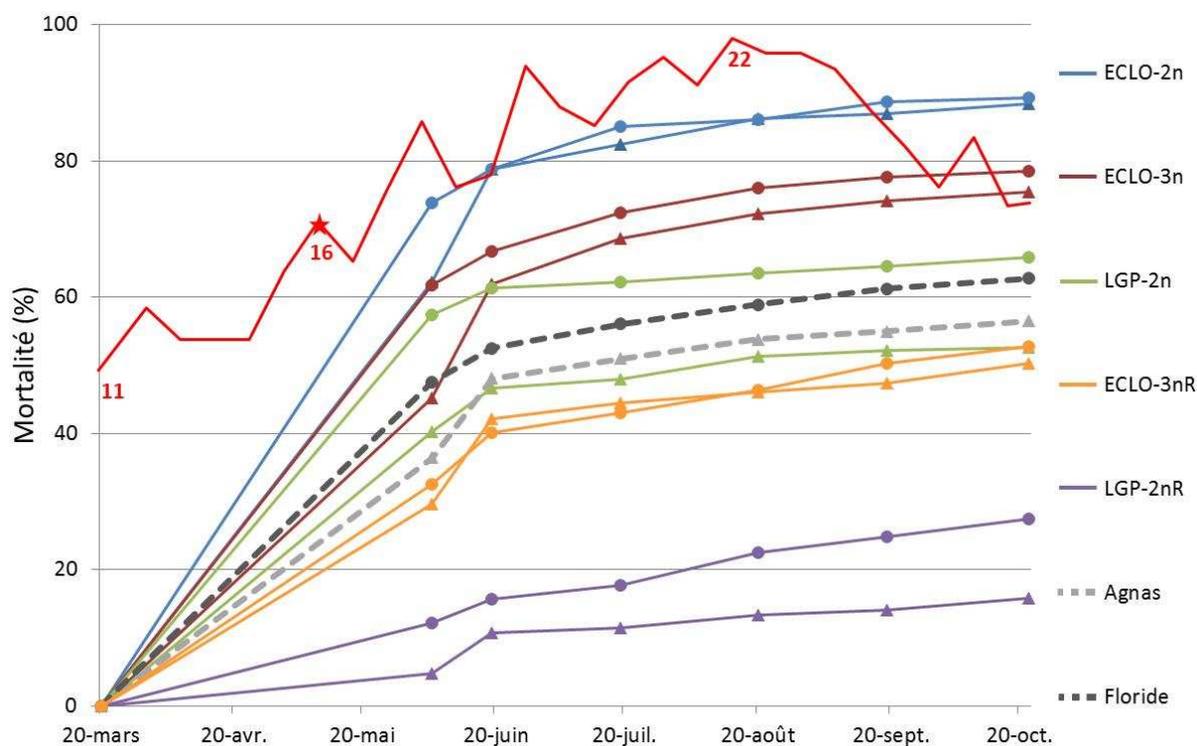
Site	$Age \times P_i$		$Age \times RJA$		$Age \times T_m$	
	r	p-value*	r	p-value*	r	p-value*
Agnas	0,73	<0,0001	-0,53	0,0106	-0,06	0,7925
La Floride	0,70	0,0002	-0,54	0,0095	-0,13	0,5568
2 sites	0,71	<0,0001	-0,51	0,0004	-0,09	0,5456

3.5. Mortalité

3.5.1. Cinétique de mortalité

A la première mesure, début juin 2012, le taux de mortalité tous lots confondus atteint 36% à Agnas et 48% à La Floride (figure 4). Dès la deuxième mesure, fin juin, et jusqu'à la fin du testage, quatre mois plus tard, la différence entre les deux sites se maintient stable entre de 4 à 6%, le taux de mortalité final étant de 57% à Agnas contre 63% à La Floride.

Figure 4 : Evolution de la température et du taux de mortalité en fonction du site et du groupe durant les 7 mois de testage. Δ : site d'Agnas, \circ : site de La Floride ; lignes en pointillés : moyenne sur les groupes ; ligne rouge : température ; \star : seuil de 16°C de l'eau de mer atteint le 11/05/2012. Températures en provenance des bulletins Ifremer BULLDOSER.



Une analyse plus fine montre que cette hiérarchisation des taux de mortalité s’observe tout au long de la période de testage au niveau des groupes non sélectionnés, en maintenant pratiquement à l’identique les différences entre sites. Moins constants dans les différences entre sites, les lots sélectionnés présentent une inflexion de la pente de la droite de régression qui double au niveau de La Floride par rapport à Agnas (tableau 12). Les coefficients a et b reportés dans ce tableau sont tous hautement significatifs et les valeurs de R^2 restent élevées.

Tableau 12 : Paramètres de la régression linéaire du taux de mortalité sur la date de mesure à partir de la seconde mesure. a : pente de la droite; b : ordonnée à l’origine .

Groupe	Site	a	b	R^2
ECLO-2n	Agnas	0,08	80	92%
	La Floride	0,08	81	85%
LGP-2n	Agnas	0,05	47	92%
	La Floride	0,05	61	100%
ECLO-3n	Agnas	0,11	64	89%
	La Floride	0,09	69	89%

ECLO-3nR	Agnas	0,06	42	99%
	La Floride	0,11	40	99%
LGP-2nR	Agnas	0,04	11	98%
	La Floride	0,10	15	98%
All	Agnas	0,07	49	96%
	La Floride	0,08	53	97%

La cinétique de mortalité illustre également le fait que les différences entre groupes sont fixées précocement, pendant la première phase de testage. Cette phase inclut la période de sensibilité majeure aux facteurs causaux, en particulier le moment où la température de l'eau atteint le seuil de 16°C et déclenche le phénomène des mortalités estivales.

3.5.2. Taux de mortalité final

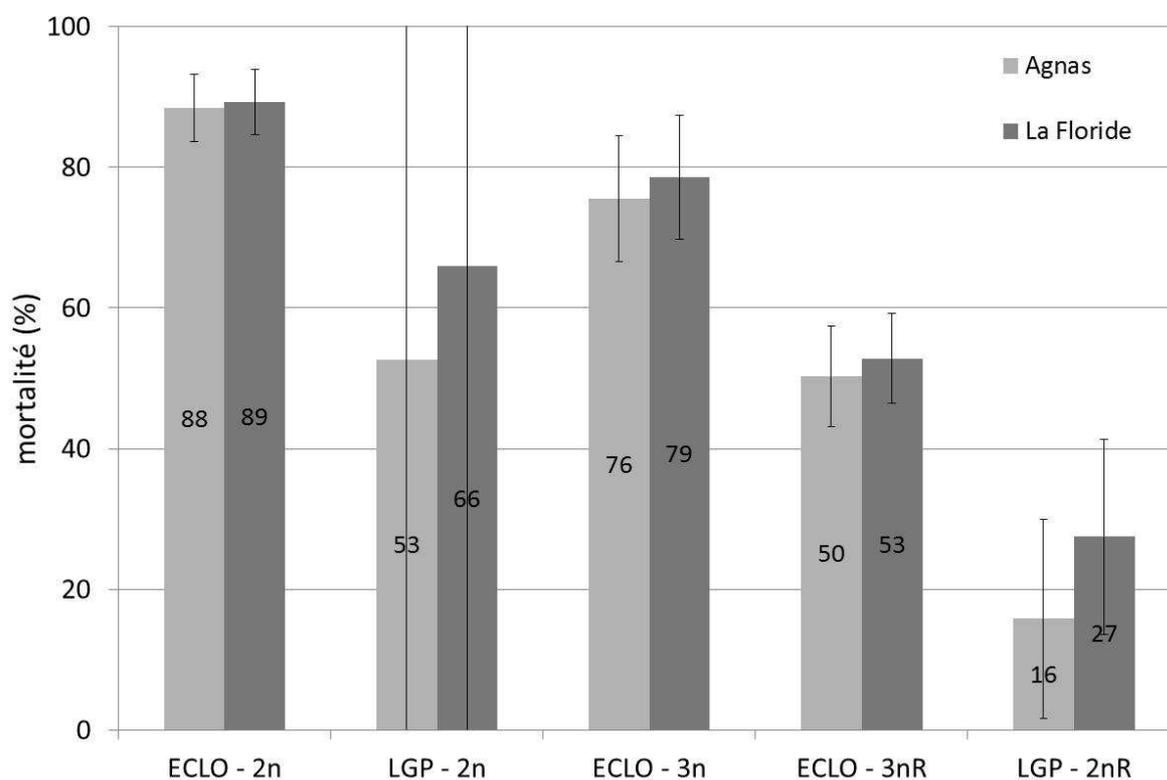
L'analyse globale incluant les données des deux sites fait apparaître des effets significatifs sur le taux de mortalité en fin de testage pour tous les facteurs considérés, avec des différences marquées pour les effets *lot(groupe)* et *groupe* (tableau 13).

Tableau 13 : Tests de significativité des effets du modèle. * : test χ^2 sur les covariances pour l'effet aléatoire *lot(groupe)* ; test F sur les moyennes pour les autres effets.

Effet	DDL	Valeur du test*	Prob>F
<i>groupe</i>	4	12,6	<0,001
<i>site</i>	1	11,4	0,013
<i>groupe*site</i>	4	4,4	0,011
<i>poids_initial</i>	1	7,8	0,011
<i>lot(groupe)</i>	1	179,3	<0,001

Les différences entre groupes reflètent les effets du niveau de ploïdie et de la sélection. Comme attendu les lots sélectionnés 2nR expriment une plus grande capacité de résistance, supérieure à celle des autres groupes testés (figure 5). A noter que les forts intervalles de confiance du groupe LGP-2n sont dus à des erreur-types élevées mais surtout au faible degré de liberté qui lui est associé, ce groupe n'étant constitué que de deux lots.

Figure 5 : Taux de mortalité final par groupe en fonction du site. Barres d'erreur : intervalle de confiance pour $\alpha=0,05$.



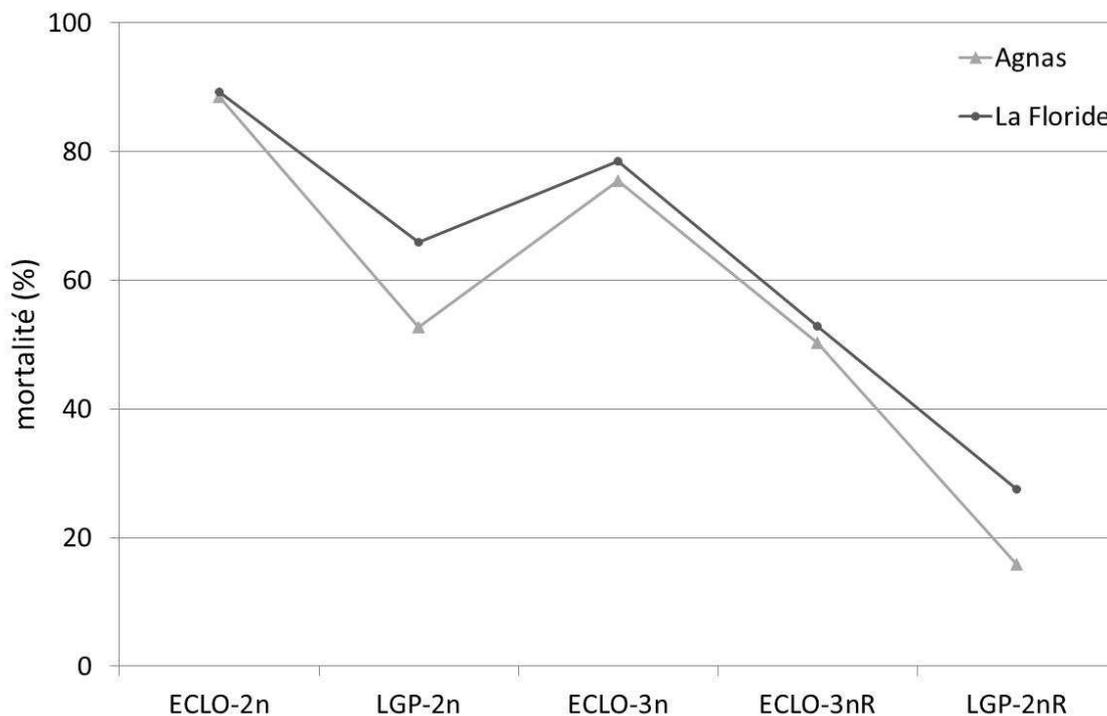
La comparaison des groupes pris deux-à-deux par la technique des contrastes confirme ces écarts systématiques en faveur des 2nR (tableau 14). Elle révèle aussi des différences significatives entre les 2n ainsi qu'entre les ECLO-3nR et les autres lots en provenance des écloséries. Enfin elle ne montre aucune différence entre les diploïdes et les triploïdes non sélectionnés en provenance des écloséries.

Tableau 14 : Tests de significativité par contrastes sur le taux de mortalité final entre groupes. * : test suivant la distribution F de Snedecor.

Contraste	Valeur F	Prob>F*
ECLO-2n vs. ECLO-3n	2,0	0,17
ECLO-2n vs. ECLO-3nR	25,8	<0,001
ECLO-2n vs. LGP-2n	5,1	0,03
ECLO-2n vs. LGP-2nR	32,9	<0,001
ECLO-3n vs. ECLO-3nR	15,5	<0,001
ECLO-3n vs. LGP-2n	1,8	0,19
ECLO-3n vs. LGP-2nR	25,2	<0,001
ECLO-3nR vs. LGP-2n	1,4	0,25
ECLO-3nR vs. LGP-2nR	4,8	0,04
LGP-2n vs. LGP-2nR	7,3	0,01

L'interaction entre les effets *groupe* et *site* illustre la réponse différentielle des différents groupes d'un site à l'autre : si elle est quasi-identique pour les ECLO elle change notablement pour les LGP (figure 6).

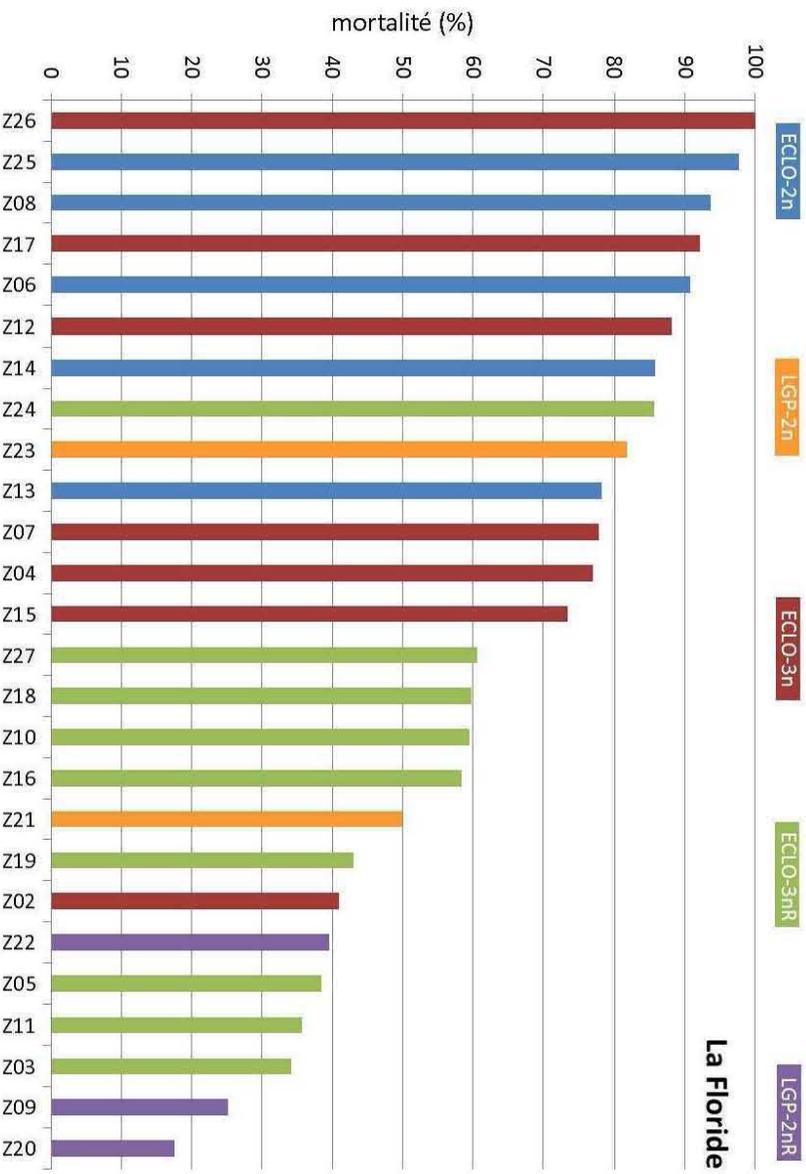
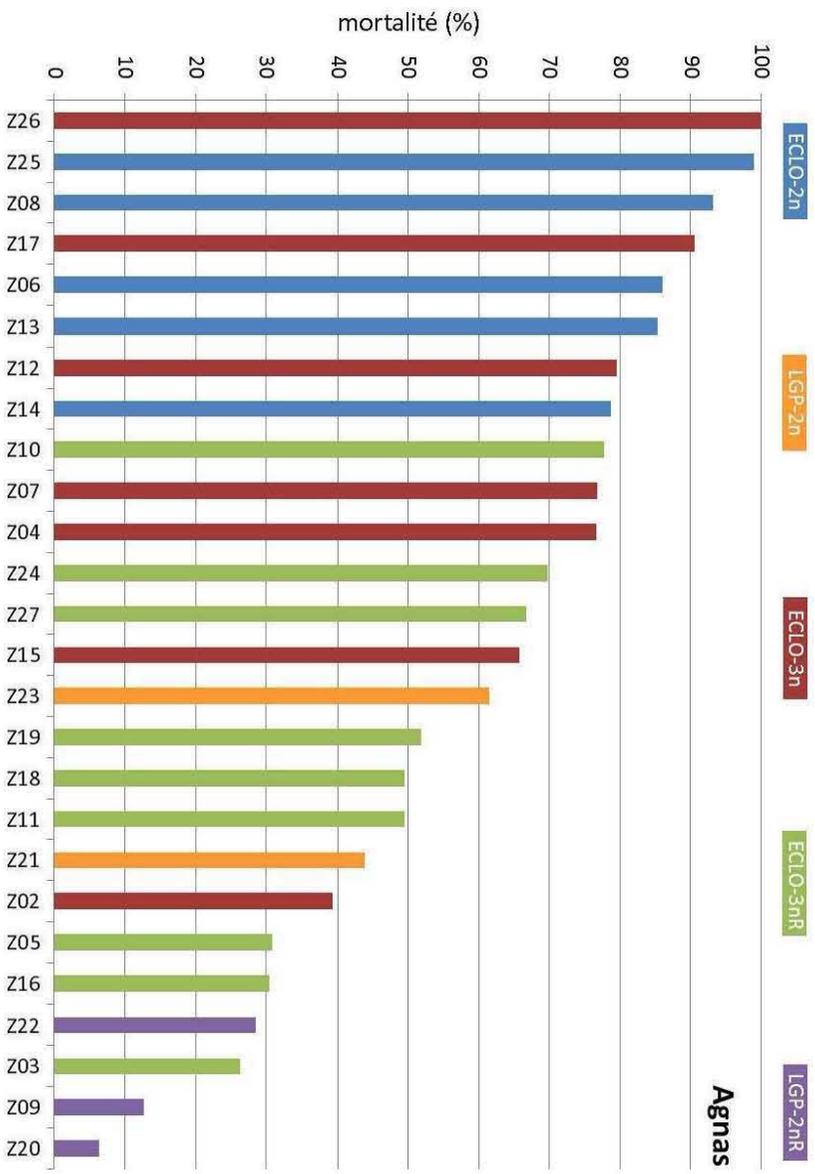
Figure 6 : Taux de mortalité final par groupe en fonction du site.



Enfin, l'effet du poids individuel initial sur le taux de mortalité final est également significatif. La valeur négative du paramètre estimé de cet effet, bien que faible ($-0,22 \pm 0,08$), indique une tendance inverse entre poids et taux de mortalité, celui-ci étant plus élevé pour des huîtres de petite taille au moment de leur mise à l'eau.

Les deux figures suivantes reportent le taux de mortalité par lot dans chacun des sites de testage. Elles montrent le relatif maintien de la classification des lots entre sites et la nette différence entre les ECLO-2n et les 2nR.

Figure 7 : Taux de mortalité final par lot en intra-site.



4. Discussion

4.1. Vérification du pedigree

On compte parmi les neuf lots 3nR analysés 29 allèles présentant une différence de ± 2 pb avec le profil génétique parental. Ces 29 cas apparaissent insignifiants au regard des 3000 profils alléliques obtenus et sont le fruit d'erreurs de génotypage incontournables inhérentes à toute analyse de parenté.

L'analyse des allèles non parentaux présentant une différence de plus de deux paires de bases permet de valider immédiatement sept des neuf lots considérés (tableau 4). En revanche un doute apparaît sur la véritable origine des lots Z16 et Z19 en raison du nombre élevé d'allèles présentant de telles différences. Cependant, il se trouve qu'un des deux groupes de femelles utilisées pour produire ces lots (le groupe G7R15) n'a pu être échantillonné et n'a donc pas été génotypé. Le profil génétique de G7R15 a donc été obtenu indirectement, mais de façon partielle, à partir de celui de ses parents, à savoir les G6R1 et G6R5. Compte tenu de l'incertitude concernant le profil d'un des géniteurs il apparaît opportun d'associer le nombre relativement faible des nouveaux allèles identifiés chez Z16 et Z19 (5 et 3 respectivement) à l'obtention indirecte du génotype des femelles G7R15. En plus des sept lots précédents nous sommes donc en mesure de valider l'origine de ces deux lots avec confiance si l'on considère le nombre d'individus analysés pour chaque lot (30) et la diversité allélique sur laquelle s'est basée l'analyse. Enfin il convient de souligner que le génotypage a porté sur des apparentés et non sur les véritables géniteurs et qu'un nombre élevé d'allèles sans génotypes a été observé chez les parents. Malgré ces limites l'analyse a permis d'identifier dans la quasi-totalité des cas les profils génétiques attendus. Tous les lots 3nR peuvent donc être considérés comme appartenant au groupe des ECL0-3nR avec une probabilité élevée.

4.2. Détection du virus OsHV-1

Si l'on accepte le principe selon lequel le virus OsHV-1 contribue au phénomène des mortalités estivales, les résultats des analyses pathologiques sont là pour le confirmer. En effet, avec une fréquence de détection de 100% sur un nombre élevé d'échantillons (237) et des quantités d'ADN viral supérieures à 10000 copies, les valeurs laissent peu de place au doute.

L'interprétation des résultats avant et après le pic de mortalité permet de souligner une tendance vers une moindre présence du virus. En effet le tableau 5 reporte des moyennes par groupe qui ne reflètent pas la diversité au niveau des lots, à l'exception toutefois des lots ECL0-2n et LGP-3nR avant et après testage où le virus n'est pas détecté. Cela peut signifier dans le premier cas que les écloséries disposent de protocoles d'élevage qui permettent de produire du naissain naïf, sachant que les lots de cinq écloséries sont concernés. Dans le second cas, représenté par 3 lots et 30 échantillons, on pourrait imaginer que les survivants des lots sélectionnés sont en mesure de se débarrasser du virus. Ce dernier point ne peut cependant être généralisé compte tenu des conditions d'élevage et d'échantillonnage non optimales pour tirer de telles conclusions.

4.3. Mortalité

Durant les trois premiers mois de testage, du 20 mars au 19 juin 2012, le taux de mortalité cumulé a atteint 48% à Agnas et 53% à La Floride, équivalents dans les deux cas à 81% du taux de mortalité final. Pendant les 4 mois qui ont suivis la mortalité a continué à augmenter à un rythme constant mais nettement plus faible. Le pic de mortalité s'est donc produit dans la première phase de testage durant laquelle le seuil de 16°C de l'eau de mer a été dépassé. Les 2nR et 3nR se distinguent des autres groupes par leur capacité à mieux amortir ce choc, en particulier pour le groupe 2nR dont le cumul de mortalité pendant cette période n'a atteint que 62% du taux final, contre des valeurs supérieures à 88% chez les groupes non R.

La linéarité de la progression de la mortalité observée après le troisième mois se retrouve dans tous les groupes, comme le montrent les valeurs élevées du R^2 de la régression linéaire. Les huîtres

continuent donc de mourir à un rythme constant durant la période estivale, mais de façon hétérogène selon le groupe ou le site. Ainsi, la progression de la mortalité intra-groupe peut ne présenter aucune différence notable entre sites, ce qui se traduit par une évolution constante du taux de mortalité et devient une caractéristique des groupes non sélectionnés. Au contraire, toujours à partir du troisième mois, les groupes sélectionnés voient leur courbe de mortalité diverger d'un site à l'autre avec un niveau deux fois moindre à Agnas comparé à la Floride. Cette cinétique de mortalité, variable entre site, met ainsi en évidence la capacité de mieux résister aux conditions d'Agnas typique des ECL0-3nR et LGP-2nR. D'une façon plus générale elle interpelle sur la constance de la mortalité une fois le pic passé, et ce jusqu'en octobre. On peut se poser la question de savoir quelle en est la cause et, si la présence d'autres pathogènes comme *Vibrio aestuarianus* était mise en évidence, chercher à comprendre quel rôle pourrait jouer le caractère R.

Si l'on s'intéresse maintenant au taux de mortalité final on note en premier lieu un net effet dû au groupe, et au travers de celui-ci à la sélection pour le caractère R. Les comparaisons entre groupes pris deux-à-deux montrent un avantage significatif et systématique du groupe 2nR qui, calculé sur les moyennes entre sites, apporte un gain de survie de 38 à 67% par rapport aux groupes non-R. Toujours en faveur du caractère R, le groupe 3nR présente un taux de survie nettement supérieur aux autres groupes ECL0 ($p < 0,001$). Ici aussi le gain de survie est notable comparé aux non-R puisqu'il oscille entre 8 et 37%. Enfin la différence détectée entre les 2nR et les 3nR, plus ténue ($p = 0,04$), s'explique par le moindre niveau de sélection atteint par ces derniers : d'une part leurs parents présentent une génération de sélection en moins par rapport aux 2nR et, d'autre part, leur génome n'est que partiellement sélectionné car seuls les mâles tétraploïdes ont apporté le caractère R.

Ces résultats montrent sans ambiguïté que des améliorations notables pour la survie peuvent être obtenues au travers de la sélection. De plus, le caractère est efficacement transmis aux individus triploïdes qui, bien que seule une partie de leur génome soit sélectionné, s'avèrent plus résistants que les autres groupes ECL0. Le rapport du précédent plan de sauvegarde avait anticipé une

amélioration des performances pour les lots 3nR testés dans le cadre du PS2 en raison d'un matériel génétique plus performant transmis par le biais des nouveaux 4nR. Malgré des conditions de testage différentes rendant la comparaison délicate, cette prévision trouve sa confirmation dans les meilleurs gains de survie observés chez les 3nR.

L'interprétation des résultats liés aux lots LGP-2n (**Z21** et **Z23**) est plus délicate. On pouvait en effet s'attendre à les retrouver parmi ceux présentant les taux de survie les plus bas en raison de l'origine sauvage de leurs géniteurs. Ainsi dans le PS1 le groupe LGP-2n apparaît comme le plus sensible de tous avec un taux de mortalité supérieur à 96% dans les trois sites. Au lieu de cela les lots **Z21** et **Z23** du PS2 se situent dans une position intermédiaire au niveau des deux sites (figure 7), et ne se différencient pas des lots 3n, en particulier des 3nR ($p=0,25$). On peut rappeler ici le fait que **Z21**, le moins touché des deux lots, a été mis sur estran avec 15 jours de retard, mais comme l'eau de mer n'a atteint le seuil de 16°C que 36 jours plus tard aucune incidence sur la mortalité n'est attendue. Le taux de mortalité durant la phase de stockage avant testage ne peut servir d'explication car les valeurs obtenues pour **Z21** et **Z23** (30 et 64% respectivement) se trouvent dans la partie médiane des valeurs observées. En fait les huîtres destinées à ces deux lots ont subi une mortalité anormalement élevée en éclosion, à des stades précoces antérieurs à la phase de stockage, ce qui peut expliquer ces résultats inattendus. De plus un sous-groupe de ces mêmes lots ayant subi un parcours zootechnique différent a également été testé par l'Ifremer pour aboutir à des taux de mortalités proches de 90%, en phase avec les résultats attendus. Ces différences montrent l'importance de disposer de l'historique zootechnique complet des lots en testage et, dans la mesure du possible, de travailler avec du matériel biologique naïf.

Concernant les lots 2n en provenance des éclosiers il est surprenant de constater le niveau de mortalité atteint, 89% en moyenne, sachant que ces mêmes éclosiers ont, depuis plusieurs années, entamé des programmes d'amélioration de leurs cheptels pour le caractère survie. Il convient cependant de signaler que les lots ECLO-2n n'ont fait l'objet d'aucune mention particulière

concernant ce caractère dans la mesure où aucune demande préalable n'a été faite en ce sens. Enfin cette valeur moyenne relativement élevée cache des disparités au sein des lots, les moyennes intra-lots variant de 78 à 99%. Enfin ces lots sont les seuls non porteur du virus au moment de leur réception au LGP, le taux de mortalité du groupe ECL0-2n a donc pu pâtir de cet état naïf par rapport aux autres groupes.

On voit aussi apparaître un effet d'interaction entre le site de testage et le groupe. Cet effet peut être assimilé à une interaction de type génotype*environnement, même si en combinant les niveaux de ploïdie et de sélection le caractère génétique de l'effet *groupe* a un sens plus complexe que celui qui lui est généralement attribué. Les lots ECL0 font preuve d'une plus grande passivité face au changement d'environnement où les différences du taux de mortalité restent constantes. Au contraire les lots LGP semblent plus sensibles aux changements, ou plus aptes à s'adapter, avec un effet positif attendu chez les 2nR.

4.4. Croissance

Preuve que la mise en poche de chaque lot a été effectuée selon un échantillonnage aléatoire, le poids individuel moyen par lot en début de testage (P_i) est identique entre les deux sites mais significativement différent d'un lot à l'autre. Par contre la densité entre sites n'est pas homogène pour tous les lots car quatre d'entre eux comptent deux fois plus d'huîtres à La Floride (tableau 1). Malgré cela les lots pris dans leur globalité présentent de meilleures performances de croissance à La Floride, que ce soit pour le poids final ou pour le rendement journalier ajusté *RJA* (+28% et +54% respectivement en excluant les lots **Z12**, **Z17** et **Z25**).

Les différences initiales de poids entre lots sont à attribuer aux différentes dates de ponte, les deux paramètres étant corrélés ($r=0,71$ avec $p<0,0001$). Cependant, les tests de significativité des effets du modèle le montrent (tableau 13), c'est le facteur poids qui prédomine et influence le taux de mortalité final. La corrélation négative entre ces deux paramètres ($r=-0,57$; $p<0,001$), identique d'un

site à l'autre, indique que les huîtres résistent mieux lorsqu'elles sont plus grosses au moment de leur mise à l'eau, P_i variant de 0,18 à 6,24 g pour une valeur médiane de 0,46 g (tableau 9). Par ailleurs la relation négative qui relie P_i au rendement RJA ($r \approx -0,66$; $p < 0,001$) indique que, pour la catégorie de poids et la durée de testage considérées, les huîtres les plus petites réussissent à compenser leur moindre taux de survie par un meilleur taux de croissance. Il convient toutefois de rappeler qu'à la différence du poids final le rendement RJA exprime un pourcentage de croissance journalier, donc une valeur relative. Le rendement est donc particulièrement sensible aux différences qui peuvent exister entre les poids initiaux, et dans notre cas précis elles restent élevées puisqu'un multiple de 35 sépare les poids extrêmes. Cependant, en comparant les résultats des deux plans de sauvegarde et en faisant abstraction des différences qui les caractérisent à l'exception de P_i , on s'aperçoit que cette relation négative se confirme. En effet les valeurs moyennes de RJA sont nettement supérieures dans le cas du PS2 (17%/j contre 2,2%/j pour le PS1) pour un poids individuel moyen initial nettement inférieur (0,96 g contre près de 15 g pour le PS1).

Concernant l'âge des huîtres en début de testage il est fort probable que l'absence d'effet et de corrélation sur/avec le taux de mortalité ou le rendement soit due à la durée et aux conditions d'élevage qui ont précédé l'envoi des lots à l'Ifremer, forcément différentes d'une écloserie à l'autre. De plus, malgré la corrélation positive liant l'âge au poids en début de testage ($r = 0,71$ pour $p < 0,001$) celle-ci est encore trop faible pour transposer la relation poids – taux de mortalité et, par le jeu de variabilités opposées, rends caduque toute influence de l'âge sur le taux de mortalité.

En raison des fortes différences du poids individuel initial et de densité des poches qui caractérisent les lots PS2, il apparaît difficile de comparer les groupes entre eux pour le caractère croissance. Cependant les résultats du PS1 de 2012, dont les conditions de testage initiales étaient mieux contrôlées, permettent d'apporter un éclairage sur ce point. Rappelons-le, aucune différence de poids n'apparaît entre les groupes au moment de la mise à l'eau des poches. On observe que les lots 2nR grossissent moins bien que les 3n sélectionnés et non sélectionnés ($p < 0,001$) alors que les 2n ne

présentent pas de différences significatives avec les 3nR ($p>0,08$) ou sont légèrement inférieurs aux ECL0-3n ($p=0,04$). Cette moindre performance qui contraste avec leur plus grande capacité de survie n'est pas une surprise en soit car le processus de sélection a porté sur le caractère R et non sur la croissance. De plus ces lots sont le produit d'une succession de cycles de sélections (3) et de propagations initiés en 2000 avec le programme MOREST. La base génétique a rapidement été restreinte à peu de familles et les générations se sont succédées sans qu'il n'y ait jamais eu d'introgession génétique extérieure. Dans le temps cette situation est propice à l'augmentation du taux de consanguinité et à la manifestation d'effets négatifs qui peuvent toucher, entre autres, les performances de croissance. L'autre résultat concerne la croissance des 3n qui, comme on pouvait s'y attendre, est supérieure à celle des lots 2n ($p=0,04$) avec une différence du poids moyen proche de 30%.

5. Conclusion

Le plan de sauvegarde 2011 montre que des améliorations notables pour la survie peuvent être obtenues au travers de la sélection. On remarquera cependant que, non pris en compte dans l'index de sélection, le caractère croissance peut subir une régression par le biais des effets d'une sélection négative (corrélation survie - croissance) ou de la consanguinité. On notera que le caractère de robustesse a aussi été transmis efficacement aux individus triploïdes malgré un niveau de sélection incomplet sur le génome. L'analyse du poids en début de testage montre que, dans des conditions de croissance identiques, on peut s'attendre à un gain de survie pour les lots produits précocement dans la saison par rapport à ceux produits plus tardivement. Enfin, comme dans toute expérimentation incluant des challenge avec pathogènes, la justesse de l'analyse nécessite de connaître l'historique zootechnique complet des lots testés et de disposer de matériel biologique naïf.

Annexe 1 : Historique des lots diploïdes « R »

(Tel que décrit dans le rapport du plan de sauvegarde 2010 et ajourné à 2011)

Cinq générations d'huîtres ont été produites depuis 2001 (G1 à G5). Une sélection divergente a été effectuée entre la G1 et la G2, visant à améliorer ou diminuer la survie pendant la période estivale pour des huîtres *Crassostrea gigas* âgées de 6 mois. Depuis, plusieurs générations de reproduction ont été réalisées sans aucune pression de sélection supplémentaire.

Pour chaque génération G2, G3, G4-2004, G4-2005 et G5, les parents utilisés n'ont jamais connu d'épisodes de mortalités et il a été produit une lignée sélectionnée résistante et une lignée sélectionnée sensible aux mortalités estivales ainsi qu'un témoin. Les mortalités estivales en Rivière d'Auray pour les divers groupes produits en G2, G3 et G4 sont rappelées dans le tableau 1. Dans les sites répertoriés comme favorables aux mortalités estivales chez les juvéniles *C. gigas* (ex : Rivière d'Auray, Ronce-Perquis), les lots sélectionnés résistants ont toujours montré des mortalités plus faibles que les lots sélectionnés sensibles, les lots témoins (non sélectionnés) ayant des performances intermédiaires aux lots sélectionnés.

Tableau 1 : Mortalités estivales (% ± écart-type) des lignées sélectionnées et du témoin en Rivière d'Auray pour des huîtres âgées de 6 mois.

Année	Génération	Résistant - R	Sensible – S	Témoin – T2n
2002	G2	7 ± 3	43 ± 12	24 ± 7
2003	G3	27 ± 13	73 ± 13	48 ± 8
2004	G4* (production 2004)	32	62	57
2005	G4* (production 2005)	19 ± 17	70 ± 4	58 ± 10

* Deux G4 ont été produites à partir d'animaux de la G3. Voir p 169 in Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* pour plus d'informations.

Concernant la G5, elle diffère des générations précédentes par une production (juin 2007) et une caractérisation des lignées sélectionnées plus tardives (huîtres âgées de 16 mois en octobre 2008), par l'absence de testage en Rivière d'Auray et par la disparition de plusieurs lots sélectionnés sensibles ainsi que les témoins à cause de fortes mortalités en micronurserie à La Tremblade (*Vibrio mytilii*) et en nurserie à Bouin (OsHV-1) en août et octobre 2007 respectivement. En conséquence, la comparaison avec les générations précédentes est tronquée. Cependant, l'épisode de mortalité entre mai et juillet 2008, montre une nouvelle fois que les huîtres R meurent moins que les huîtres S dans l'ensemble des environnements testés (Tableau 2). Pour le site B, les mortalités des lots composants les lignées sélectionnées R et S sont représentées en figure 1.

Tableau 2 : Mortalités estivales (% ± écart-type) des lignées sélectionnées de la G5 pour des huîtres âgées de 17 mois.

Site	Résistant - R	Sensible – S
A = Marais	32 ± 10	66 ± 12
B = Bouin puis Géfosse	29 ± 15	77 ± 10
C = Agnas puis Blainville	44 ± 15	67 ± 12

La surmortalité touchant les deux groupes sélectionnés a déjà été constatée pour la G3 en 2003. Cette mortalité a été classée comme d'origine inconnue et n'a pas fait l'objet de recherche visant à étudier les paramètres génétiques. La diminution de l'écart entre les mortalités des lots R et S pourrait être facilement expliquée par :

- l'élimination de deux lots S en nurserie et donc diminution de la mortalité moyenne du groupe S,
- la différence entre les lots R et S est réduite pour des huîtres âgées (Dégremont et al., 2010).

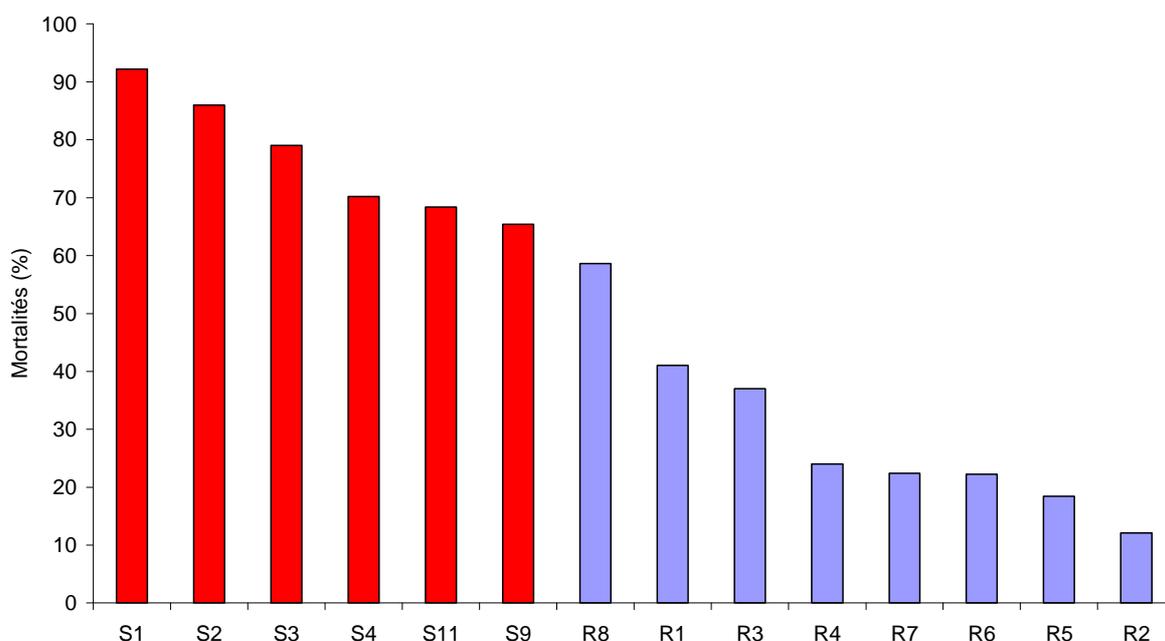


Figure 1 : Mortalités 2008 des lots sélectionnés G5 résistants aux mortalités estivales (R en bleu) et des lots sélectionnés sensibles aux mortalités estivales (S en rouge) ayant connu le parcours zootechnique B (testage à Bouin puis à Géfosse, Voir Tableau 2).

En 2009, une nouvelle génération d’huîtres sélectionnées a été produite le 23 février 2009 à l’écloserie du Laboratoire de Génétique et Pathologie (Ifremer, La Tremblade), ainsi que des témoins. Ces lots sélectionnés constituent la G6 et ils ont été testés à plusieurs reprises pendant la période estivale. Le tableau 3 montre les mortalités observées en octobre 2009 des lots R1 et R5, des deux témoins et des lots S4 et S11. Comme pour les générations précédentes, les mortalités des lots R ont été plus faibles que celles des lots S, alors que les témoins ont montré des mortalités intermédiaires. Globalement, les mortalités des lots S sont restées élevées quelque soit la date de mise sur estran alors que les mortalités des lots R ont fortement diminué lorsque la mise sur estran était plus tardive. Ce résultat peut être expliqué par l’âge des animaux, la résistance des animaux augmentant avec l’âge (et/ou la taille) (Dégremon et al., 2010), et/ou, par le pic de mortalité des cheptels en élevage qui a eu lieu en mai-juin dans les sites où les animaux ont été testés.

Tableau 3 : Mortalités estivales (%) des lignées sélectionnées de la G6 et des témoins en octobre 2009 pour des huîtres âgées de 7 mois.

Site	Date de mise à l'eau	R1	R5	Agnas (témoin)	La Grève (témoin)	S4	S11
Gresseloup	09/06/2009	76	48	90	78	95	98
Agnas	09/07/2009	49	54	92	67	84	98
Agnas	07/08/2009	23	19	56	64	91	99
Agnas	28/08/2009	5		53			94
Agnas	16/09/2009	0		0			0

Les témoins Agnas et La Grève ont été produits à partir d'huîtres sauvages détroquées de divers substrats. Ces lots ont ensuite été produits en écloserie en même temps que les huîtres sélectionnées.

Enfin, la dernière génération produite est la G7 issue d'un croisement réalisé entre mars et avril 2010 à partir des lots G6-R1 et G6-R5. Trois nouveaux lots ont été constitués, deux lots consanguins et un non consanguin (tableau 4).

Tableau 4 : Plans de croisement à l'origine des lots G7.

Mâle G0					2	9
Familles G1					♂F2-5/♂F2-8	♂F9-35/♂F9-36
				
		Familles G5			♂R1	♂R5
		Familles G6			♂R1	♂R5
2	♀F2-5/♀F2-8	...	♀R1	♀R1		G7R15
9	♀F9-35/♀F9-36	...	♀R5	♀R5	G7R15	G7R5

Annexe 2 : Caractéristiques des huîtres utilisées pour le plan de sauvegarde 2011

(Tel que décrit dans le rapport du plan de sauvegarde 2010 et ajourné à 2011)

Huîtres diploïdes R

- Les lots diploïdes R fournis par l'IFREMER aux écloserieurs sont des lots de la G5, G6 et G7 (cinquième, sixième et septième génération de reproduction).
- Les lots diploïdes R de la G5 sont les lots R1 à R2, R3, R4, R5, R6, ceux de G6 sont les lots R1, R5 et R25 et ceux de la G7 sont les lots R5 et R15.
- Les lots R1, R2, R3 et R4 sont des lots consanguins produits à partir des familles G1 2-5 et 2-8 (croisements du mâle 2 et des femelles 5 et 8 de la G0), lots R5, R6 sont des lots consanguins produits à partir des familles G1 9-35 et 9-36 (croisements du mâle 9 et des femelles 35 et 36 de la G0) et les lots R15 et R25 sont des lots non consanguins issus du croisement des R1 avec les R5 et des R2 avec les R5, respectivement
- Tous les lots utilisés ont été produits dans l'écloserie IFREMER du LGP puis élevés sur estran.

Début 2011, environ 1000 géniteurs de la G5, 2100 géniteurs de la G6 et 2000 géniteurs de la G7 ont été distribués aux écloseries participantes. Les effectifs par lot sont reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Effectif par lot G5, G6 et G7 distribués aux écloseries.

Génération - Lot	France Turbot	Satmar	Vendée Naissain	Kerné	Vendée écloserie	Total
G5 – R1	40	32	52	6	6	136
G5 – R2	73	60	97	11	11	252
G5 – R3	47	38	64	7	7	163
G5 – R4	19	16	25	3	3	66
G5 – R5	37	30	50	6	6	129
G5 – R6	64	53	86	11	11	225
Total G5	280	229	374	44	44	971
G6 – R1	215	176	286	33	33	743
G6 – R5	164	135	218	31	31	579
G6 – R25	220	181	294	34	34	763

Total G6	599	492	798	98	98	2085
G7 – R5 Lot A	195	160	260	30	30	675
G7 – R5 Lot B	234	192	312	36	36	810
G7– R15	156	128	208	24	24	540
Total G7	585	480	780	90	90	2025
Total	1464	1201	1952	232	232	5081

Huîtres tétraploïdes R

- Les tétraploïdes R livrés dans la campagne 2011 dérivent des tétraploïdes qui ont été obtenus suite à une induction directe à partir de géniteurs diploïdes issus de la famille G5R5. Ces tétraploïdes originels s'appellent 4n4R5. Les inductions de tétraploïdie, les élevages larvaires, le micronursage et le nursage ont été réalisés en 2009 dans les structures sécurisées IFREMER du LGP La Tremblade,
- En 2010, deux autres induction par la méthode « Ronçoise », ont été utilisées afin d'obtenir deux nouvelles familles tétraploïdes à partir de deux types de femelles diploïdes : des tétraploïdes appelés 4n4R5-Sp obtenus en utilisant une famille diploïdes sauvages de Seudre ayant présenté de très bonne performances de survie, et les tétraploïdes appelés 4n4R55 obtenus en utilisant comme femelles diploïdes la famille G2A.
- Toutes les opérations de production des tétraploïdes allant des inductions cytogénétiques ainsi que toutes les différentes phases de l'élevage (larvaire, micronursage et nursage) sont réalisées avec de l'eau de mer traitée aux UV. Dans un but de biovigilance, tous les rejets ayant été en contact avec ces huîtres ont systématiquement subi des traitements physiques (filtres) et chimiques (ozonation) avant leur évacuation hors des structures sécurisées du LGP la Tremblade. Dans un souci de traçabilité, chaque tétraploïde R est marquée avec une puce électronique collée sur sa valve supérieure.

- Les individus tétraploïdes ont été identifiés et triés par cytométrie en flux non destructive en utilisant des biopsies branchiales, puis ils ont été conditionnés à la maturation dans les structures sécurisées IFREMER du LGP de La Tremblade,
- Tous les effluents liés à la production des tétraploïdes ont été systématiquement traités par des traitements physiques (filtres) et chimiques (ozonation) avant leur évacuation hors des structures sécurisées IFREMER du LGP la Tremblade,
- Avant chaque livraison, les tétraploïdes R ont été au préalable sexés et vérifiés au niveau de leur ploïdie.
- Les livraisons des tétraploïdes ont obéi aux impératifs zootechniques et notamment la taille des géniteurs tétraploïdes. Ainsi, les premières livraisons ont concerné les tétraploïdes 4n4R5-Sp (les plus grands) alors que les tétraploïdes 4n4R55, vu leur taille plus réduite, ont été réservés pour la dernière ponte de l'année.

