

Département Ressources Biologiques et Environnement  
Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques  
Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, IFREMER La Tremblade

Lionel DEGREMONT, Elise MAUROUARD, Coralie Connès, Christophe LEDU, Abdellah BENABDELMOUNA

**Convention DPMA-IFREMER n° 2011/1/1219611  
relative à la mise en place d'un plan d'approvisionnement  
de sauvegarde 2012 de la filière ostréicole.**



Plan de sauvegarde 2012, 3<sup>ème</sup> édition : synthèse des résultats  
2012-2013.



Février 2014



## Contenu

1. Introduction.....	5
2. Matériels et méthodes.....	6
2.1. Matériel biologique du PS3 .....	6
2.2. Suivi des mortalités et de la croissance des animaux du PS3 .....	8
2.3. Suivi température au cours du PS3 .....	9
2.4. Recherche du virus OsHV-1 et de <i>Vibrio aestuarianus</i> pour les animaux du PS3 .....	9
2.5. Analyse du pedigree des lots 3nR-Eclo et d'apparentés 2nR et 4nR du PS3 .....	11
2.6. Analyses statistiques du PS3 .....	11
2.7. Testage de nouvelles lignées sélectionnées pour leurs résistances aux mortalités sur estran et comparaison avec les 2nR et 3nR du PS3 .....	12
3. Résultats.....	14
3.1. Vérification du pedigree du PS3 .....	14
3.1.1. Diversité des marqueurs .....	14
3.1.2. Comparaison des génotypes.....	14
3.2. Mortalité des huîtres du PS3 .....	17
3.2.1. Cinétiques de mortalité .....	17
3.2.2. Taux de mortalité finaux.....	19
3.3. Détection du virus OsHV-1 et de <i>V. aestuarianus</i> pour les huîtres du PS3 .....	23
3.4. Mortalités des lots entre septembre et novembre 2013 pour le PS3.....	24
3.5. Performances de croissance des huîtres du PS3.....	27
3.6. Testage de nouvelles lignées sélectionnées pour leur résistance aux mortalités sur estran et comparaison avec les 2nR et 3nR du PS3 .....	30
3.7. Suite des suivis des mortalités des animaux des PS1 et PS2.....	31
4. Discussion.....	32
4.1. Vérification du pedigree des huîtres du PS3.....	32
4.2. Détection du virus OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i> dans les huîtres du PS3 .....	32
4.3. Mortalité des huîtres du PS3 .....	33
4.4. Performances de croissance sur estran des huîtres du PS3 .....	37
5. Conclusion .....	37
6. Références.....	39
Annexe 1 : Historique des lots diploïdes « R » .....	40
Annexe 2 : Caractéristiques des huîtres utilisées pour le plan de sauvegarde 2012 (PS3) .....	45



# 1. Introduction

Depuis 2008 l'ostréiculture française subit des mortalités massives d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, qui menacent les approvisionnements en naissains et, par voie de conséquence, fragilise la filière ostréicole. C'est dans ce contexte qu'a été mis en place à partir de 2010 une opération désignée sous le terme plan de sauvegarde. Cette opération sous forme contractuelle fait intervenir l'Ifremer, des écloseries privées, le Ministère en charge de l'Agriculture et le CNC. Le premier plan de sauvegarde (PS1) a été initié en 2010, suivi par un deuxième en 2011 (PS2), et un troisième en 2012 (PS3). L'objectif premier de ce plan est d'apporter une réponse temporaire au déficit de production grandissant en fournissant aux écloseries des animaux présentant une résistance accrue aux mortalités (caractère noté « R » dans la suite du rapport) ayant pour cause l'herpès virus OsHV-1. Ces animaux, sélectionnés par l'Ifremer, sont des mâles tétraploïdes (**4nR**) qui, croisées avec des femelles diploïdes (**2nR**), 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 écloseries, ainsi que des lots de captage naturel. Le testage des lots a été conduit en laboratoire et dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron, et de façon continue sur une période d'environ 5 mois, avant, pendant et après les épisodes de mortalités observées en 2013. Ce rapport présente les résultats correspondants aux testages des lots du PS3 en première année d'élevage, ainsi que ceux des testages des lots du PS1 et PS2 en troisième et seconde année d'élevage respectivement.

Les écloseries ayant pris part au plan de sauvegarde 2012 sont au nombre de 8 et tous les lots testés en 2013 dans le cadre du PS3 ont été produits en 2012. Une des écloseries n'a pas produit de lot 3nR, alors qu'une autre n'a pas fourni de lots 3nR et témoins pour le testage. Les 6 autres écloseries ont chacune produit et fourni au moins un lot triploïde résistant (3nR). Elles ont également fourni, pour certaines, au moins un lot témoin triploïde (3n) produit à partir de mâles tétraploïdes non R et, un lot

témoin diploïde (2n) issu de leur propre stock de géniteurs. L'Ifremer a également produit et fourni pour la campagne de testage des lots diploïdes sélectionnés (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 connu, en particulier en ce qui concerne les épisodes de mortalité avant testage. Enfin, des lots de captages naturels ont également été intégrés aux suivis comme témoins non sélectionnés.

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 du PS3.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériel biologique du PS3**

Tous les lots ont été produits entre mai et septembre 2012 par les écloseries participantes (ci-après notées Eclo) et le Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins de l'Ifremer (LGPM, La Tremblade). Quatre lots ont également été produits en février 2013 par le LGPM, et trois lots de captage naturel ont également été intégrés aux suivis. Nous utiliserons par la suite le terme "groupe" pour qualifier la combinaison provenance des lots (Eclo/LGP/captage) et niveau de ploïdie associé ou non au caractère R (2n/2nR/3n/3nR). Au total 32 lots ont été suivis dont 23 fournis par les écloseries. Les caractéristiques des lots testés sont résumées dans le tableau 1.

Onze lots 3nR-Eclo ont été produits par les écloseries en 2012 à partir des huîtres 2nR et 4nR fournies par l'Ifremer. Le gain de survie attendu pour les 3nR par rapport à des lots non sélectionnés est estimé à 50-60% pour des mortalités causées par OsHV-1 au stade naissain d'après les testages expérimentaux réalisés en 2011, 2012 et 2013 (Benabdelmouna et al. 2012 ; Dégremon et al. soumis).

**Tableau 1 :** Caractéristiques des lots testés dans le cadre du PS3. Origine : lots produits par les écloseries privées (Eclo) et par le Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins de l'Ifremer (LGPMM).

Groupe	Date de ponte	Date de réception à l'Ifremer	Taille à la réception	Nom Testage
2n-captage	été 2012	29/03/2013	T6	Y26
2n-captage	été 2012	29/03/2013	T6	Y27
2n-captage	été 2012	29/03/2013	T8	Y28
2n-Eclo	03/05/2012	06/12/2012	T10	Y9
2n-Eclo	19/05/2012	29/11/2012	T12-T15	Y3
2n-Eclo	17/07/2012	29/11/2012	T6	Y5
2n-Eclo	18/07/2012	19/03/2013	T6	Y25
2n-Eclo	06/09/2012	25/01/2013	T2	Y16
2n-Eclo	10/09/2012	07/02/2013	T3	Y17
3n-Eclo	20/06/2012	29/11/2012	T12-T15	Y1
3n-Eclo	05/07/2012	06/12/2012	T4-T6	Y11
3n-Eclo	17/07/2012	29/11/2012	T6	Y7
3n-Eclo	08/08/2012	06/12/2012	T4-T6	Y10
3n-Eclo	28/08/2012	19/03/2013	T5	Y23
3n-Eclo	19/09/2012	25/01/2013	T2	Y15
3nR-Eclo	11/05/2012	06/12/2012	T4-T6	Y8
3nR-Eclo	16/05/2012	29/11/2012	T12-T15	Y2
3nR-Eclo	07/06/2012	07/02/2013	T6	Y20
3nR-Eclo	12/06/2012	29/11/2012	T12-T15	Y4
3nR-Eclo	12/06/2012	19/03/2013	T6	Y24
3nR-Eclo	10/07/2012	05/03/2013	T6	Y22
3nR-Eclo	07/08/2012	29/11/2012	T6	Y6
3nR-Eclo	15/08/2012	25/01/2013	T2	Y14
3nR-Eclo	23/08/2012	07/02/2013	T6	Y21
3nR-Eclo	19/09/2012	07/02/2013	T3	Y19
3nR-Eclo	27/09/2012	07/02/2013	T2	Y18
2n-LGP	12/03/2012	07/12/2012	T8	Y12
2n-LGP	05/02/2013	08/04/2013	T6	Y31
2n-LGP	05/02/2013	08/04/2013	T6	Y32
2nR-LGP	12/03/2012	07/12/2012	T10	Y13
2nR-LGP	14/02/2013	08/04/2013	T6	Y29
2nR-LGP	14/02/2013	08/04/2013	T6	Y30

Les lots témoins 2n-Eclo et 3n-Eclo sont tous issus de lignées diploïdes propres aux écloseries sans que l'on sache si elles ont fait l'objet d'un processus d'amélioration pour une résistance accrue à OsHV-1, mais il est fortement probable qu'elles le soient. Pour la production des lots 3n-Eclo, les mâles 4n utilisés ont également été sélectionnés pour une meilleure survie au stade naissain de leurs descendants triploïdes. Ces mâles tétraploïdes sont issus d'huîtres tétraploïdes ayant survécu en

2010 au stade naissain à une cohabitation avec des huîtres moribondes. Après le test, les naissains tétraploïdes survivants ont été élevés jusqu'au stade adulte pour être utilisés comme géniteurs afin de produire les mâles tétraploïdes livrés en 2012 dans le cadre des productions d'huîtres triploïdes des écloséries privées. La réponse à la sélection de ce stock 4n combinée aux 2n des écloséries est ainsi obtenue pour la première fois dans le cadre du testage des lots du PS3. Les lots 2nR-LGP sont soit les descendants du lot 2nR fourni aux éclosiers (lot Y13), soit des nouveaux lots sélectionnés pour une meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 (lots Y29 et Y30), et donc ayant un fond génétique différent du lot 2nR, mais présentant des survies face à l'infection à OsHV-1 similaires. En provenance du LGPMM également, trois lots témoins produits à partir de géniteurs échantillonnés sur des bancs sauvages dans le bassin de Marennes-Oléron (2n-LGP). Les lots 2n-captage ont pour origine Arcachon, Marennes-Oléron et la baie de Bourgneuf. Il s'agit des mêmes lots que ceux utilisés pour Resco. A la différence des groupes en provenance des écloséries et de captage, le parcours zootechnique des lots 2n-LGP et 2nR-LGP est entièrement connu.

## **2.2. Suivi des mortalités et de la croissance des animaux du PS3**

Tous les lots ont été réceptionnés par le LGPMM entre le 29/11/2012 et le 08/04/2013 puis stockés dans plusieurs bacs du laboratoire dans l'attente de leur transfert sur estran, le 30 avril 2013. Durant cette période, aucune mortalité anormale n'a été enregistrée pour l'ensemble des lots. 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. Dans chaque site, les mortalités ont été enregistrées par comptage sur une poche de 200 huîtres par lot jusqu'en septembre 2013. Pour le suivi de la croissance, trois paramètres ont été enregistrés pour chaque lot en début (30 avril 2013) et fin de testage (septembre 2013): le poids individuel et la longueur individuelle pour 50 huîtres, et le rendement, correspondant au poids total de toutes les huîtres vivantes. Enfin, tous les lots ont été conservés à Agnas pour poursuivre les suivis en 2014, ainsi que 13 lots à La Floride. Pour ces derniers, un comptage supplémentaire des mortalités a été réalisé en novembre 2013.



Le suivi des mortalités de 100 huîtres par lot a également été réalisé en laboratoire au LGPMM de la réception du lot jusqu'en juillet 2013 dans un bac de 800 litres. Aucun suivi de croissance et rendement n'a été réalisé pour cette condition.

### **2.3. Suivi température au cours du PS3**

Dans chaque environnement, la température de l'eau de mer a été enregistrée toutes les 30 minutes à partir de deux sondes ThermoTrack (Progesplus, 59780, Willems, France).

### **2.4. Recherche du virus OsHV-1 et de *Vibrio aestuarianus* pour les animaux du PS3**

Le virus OsHV-1 est suspecté d'être impliqué de façon prépondérante dans le phénomène des mortalités massives des naissains et juvéniles de *C. gigas* et, par conséquent, reste le facteur principal sur lequel l'amélioration pour la survie est susceptible d'opérer. Il est donc utile de connaître la présence du virus et la charge virale associée pour les 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 PCR en temps réel (technique basée sur l'utilisation du SybrGreen, une des deux techniques officielles de détection de l'ADN viral). Elle a été réalisée sur des échantillons de tous les lots à leur réception (de novembre 2012 à avril 2013), pendant (mai-juin-juillet 2013) et après les épisodes de mortalité (septembre 2013) (tableau 2). Pendant la période de mortalité, l'échantillonnage a porté exclusivement sur des individus morts récemment ou moribonds, alors qu'avant et après cette période, la recherche d'OsHV-1 a été entreprise sur des animaux vivants ne présentant aucun signe particulier.

La recherche de *Vibrio aestuarianus* a également été entreprise pour tous les animaux moribonds analysés pour la recherche d'OsHV-1 par PCR en temps réel (technique officielle de détection de l'ADN bactérien). Cette bactérie est associée à des épisodes de mortalités massives d'huîtres creuses

adultes et elle a été détectée particulièrement en 2012 et 2013 sur des lots d'animaux présentant des mortalités dans le milieu.

**Tableau 2 :** Nombre d'individus prélevés par lot pour la détection d'OsHV-1, à réception, lors des mortalités dans les 3 sites de testage et à la fin du suivi sur estran en septembre.

Groupe	Nom testage	A réception	Episode de mortalité*			Fin du suivi en septembre	
			Laboratoire	Agnas	La Floride	Agnas	La Floride
2n-captage	Y26	10	2			5	5
2n-captage	Y27	10	2	2	2	5	5
2n-captage	Y28	10	1	1	1	5	5
2n-Eclo	Y9	10	1	4		5	5
2n-Eclo	Y3	10	6	5	1	5	5
2n-Eclo	Y5	10	1	5	1	5	5
2n-Eclo	Y25	10	1	5		5	5
2n-Eclo	Y16	10	1	2	1	5	5
2n-Eclo	Y17	10	1	4	2	5	5
3n-Eclo	Y1	10	1	2		5	5
3n-Eclo	Y11	10		5		5	5
3n-Eclo	Y7	10	1	3	1	5	5
3n-Eclo	Y10	10	1	2	1	5	5
3n-Eclo	Y23	10	1	5	2	5	5
3n-Eclo	Y15	10	1	5		5	5
3nR-Eclo	Y8	10	1	4	3	5	5
3nR-Eclo	Y2	10	6	3		5	5
3nR-Eclo	Y20	10		1		5	5
3nR-Eclo	Y4	10		3		5	5
3nR-Eclo	Y24	10	1			5	5
3nR-Eclo	Y22	10	1		5	5	5
3nR-Eclo	Y6	10				5	5
3nR-Eclo	Y14	10	1	1		5	5
3nR-Eclo	Y21	10				5	5
3nR-Eclo	Y19	10	6	2	1	5	5
3nR-Eclo	Y18	10	1	1		5	5
2n-LGP	Y12	10	1	4		5	5
2n-LGP	Y31	10	5	2	4	5	5
2n-LGP	Y32	10	2	3		5	5
2nR-LGP	Y13	10	1			5	5
2nR-LGP	Y29	10	5	1	1	5	5
2nR-LGP	Y30	10	2		2	5	5

\* le nombre d'individus échantillonnés lors des mortalités est variable entre les lots car seuls les animaux jugés dans un état correct lors du comptage ont été prélevés.

### **2.5. Analyse du pedigree des lots 3nR-Eclo et d'apparentés 2nR et 4nR du PS3**

Les provenances variées des lots 3nR, produits par 6 écloséries différentes, les nombreux transferts dont ils ont fait l'objet pendant leur parcours zootechnique, ainsi que la spécificité des géniteurs utilisés pour les produire (♂ 4nR et ♀ 2nR en provenance de l'Ifremer) imposent que l'on vérifie leur pedigree. Cela a été réalisé en génotypant, sur 4 marqueurs microsatellites (CG108, L10, CG49 et Amy), tous les lots 3nR et des individus 2nR et 4nR apparentés à leurs géniteurs, ceux-ci n'ayant pu être échantillonnés. Leurs profils génétiques ont ensuite été comparés. Les génotypages réalisés sur les différents lots sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3 :** Nombres de génotypages réalisés avec 4 marqueurs microsatellites sur les lots 3nR-Eclo et des individus appartenant au même pool de géniteurs que leurs parents 2nR et 4nR.

Lots	Groupe	types	nombre d'individus
Y8	3nR-Eclo	descendant	25
Y2	3nR-Eclo	descendant	25
Y20	3nR-Eclo	descendant	25
Y4	3nR-Eclo	descendant	25
Y24	3nR-Eclo	descendant	25
Y22	3nR-Eclo	descendant	25
Y6	3nR-Eclo	descendant	25
Y14	3nR-Eclo	descendant	25
Y21	3nR-Eclo	descendant	25
Y19	3nR-Eclo	descendant	25
Y18	3nR-Eclo	descendant	25
4nR	4nR	Apparentés géniteurs ♂	50
2nR	2nR	Apparentés géniteurs ♀	75

### **2.6. Analyses statistiques du PS3**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), et uniquement pour le PS3.

Pour le taux de mortalité  $T_m$ , la procédure GLIMMIX a été utilisée en faisant le choix d'une distribution binomiale avec Logit comme fonction de liaison et en appliquant le modèle linéaire généralisé suivant :

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

avec comme variable de réponse  $T_m$  correspondant au rapport entre les événements de mortalité sur l'ensemble des évènements observés par poche; les effets fixes *groupe* (facteur provenance Eclo/LGP/captage combiné au facteur ploïdie 2n/2nR/3n/3nR), *site* (site de testage du laboratoire, d'Agnas et de La Floride) et l'interaction *groupe\*site* ; enfin les effets aléatoires *Lot* hiérarchisé à l'effet groupe *lot(groupe)* et l'interaction *site\*lot(groupe)*.

Pour l'analyse de la croissance sur estran, une transformation log a été réalisée pour le poids afin d'augmenter la normalité et l'homoscédasticité des variances. Cette valeur transformée et la taille ont ensuite été analysées selon le même modèle que ci-dessus, mais en utilisant la procédure MIXED de SAS et en y ajoutant le temps en co-variable (date de mesure).

Le rendement sur estran a également été analysé par la procédure MIXED de SAS pour les données avec une transformation log, suivant le même modèle utilisé pour l'analyse des mortalités, mais sans l'effet lot, car chaque lot était représenté par une seule poche. Dans cette analyse, une co-variable a été ajoutée au modèle pour prendre en compte le poids total des animaux au début du suivi.

Enfin, les coefficients de corrélations entre le taux de mortalité d'une part et le poids et l'âge lors des mortalités d'autre part, ont été déterminés à l'aide de la procédure CORR.

### **2.7. Testage de nouvelles lignées sélectionnées pour leurs résistances aux mortalités sur estran et comparaison avec les 2nR et 3nR du PS3**

Un lot 2nR et un lot 3nR ont été produits en février 2013 par le LGPMM, en utilisant les mêmes stocks de géniteurs 2nR et 4nR que ceux utilisés pour produire les 3nR du PS3. En complément, deux nouvelles souches d'huîtres *C. gigas* (souches A et B) ont été sélectionnées pendant 4 générations par sélection massale (SM) sur le caractère survie au stade naissain lors de testage sur estran. La 4<sup>ème</sup> génération a été produite en février 2013 au LGPMM ainsi que leur témoin respectif (T), lesquels ont été protégés des mortalités au cours des générations de reproduction. Des 3n ont également été produits pour chacune des souches sélectionnées par une méthode d'induction chimique. Les 8 lots ont ensuite été mis sur estran à Agnas à 4 reprises : en mai, juin, juillet et août 2013 pour un poids

individuel moyen de 0,7 ; 1,4 ; 2,3 et 3,3 g respectivement. Les comptages des mortalités des 4 séries de mises à l'eau ont été réalisés en octobre 2013. Enfin, douze huîtres moribondes, prélevées lors d'un épisode de mortalités en juin 2013, ont été individuellement analysées pour la recherche d'OsHV-1 et de *V. aestuarianus*.

#### **2.8. Suite des suivis des mortalités des animaux du PS1 et PS2**

Les mortalités des lots du PS1 et PS2 ont également été suivies en 2013 sur le site d'Agnas en mai 2013 et août 2013 respectivement. La recherche d'OsHV-1 et de *V. aestuarianus* a été réalisée à partir de 4 animaux moribonds échantillonnés en août 2013 pour le PS2. Pour rappel, les groupes du PS1 et PS2 ont été produits en 2010 et 2011 respectivement. Les mortalités ont donc été suivies annuellement jusqu'en 2013.

## 3. Résultats

### 3.1. Vérification du pedigree du PS3

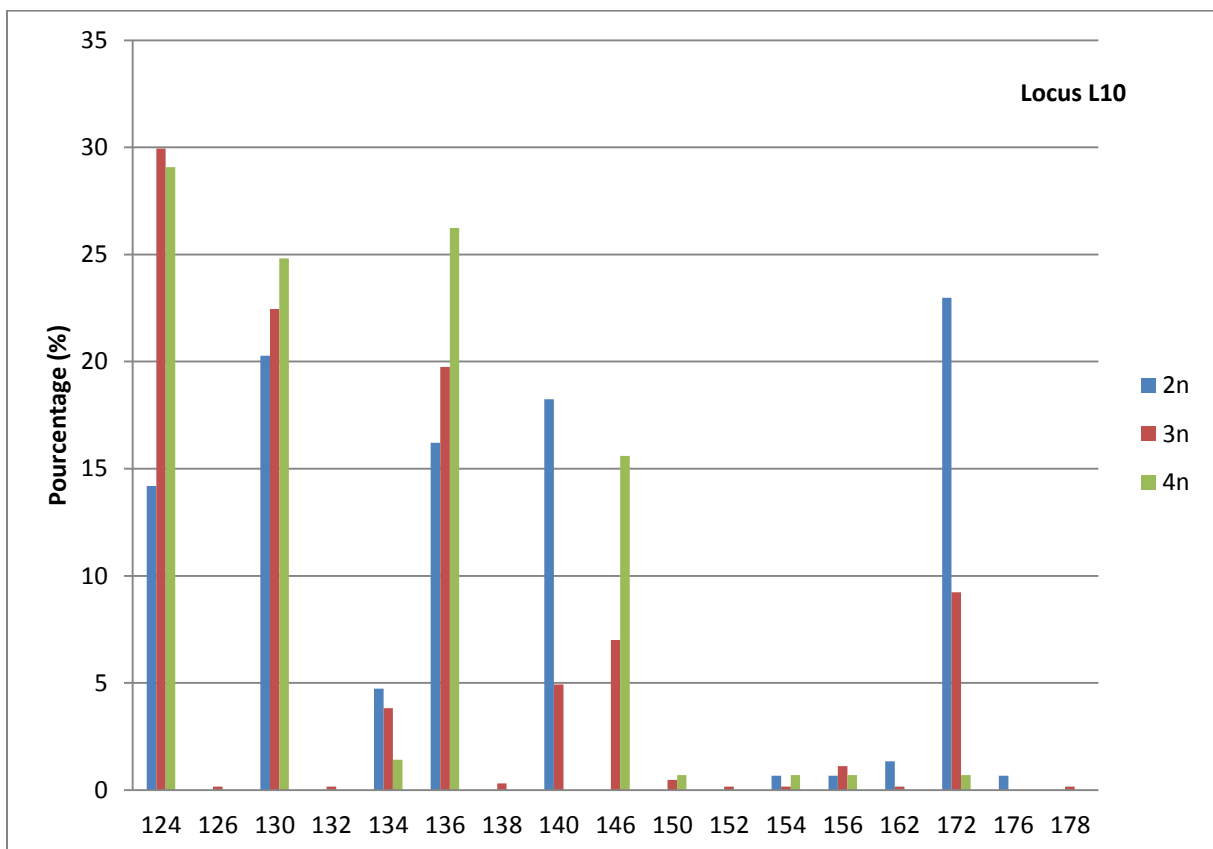
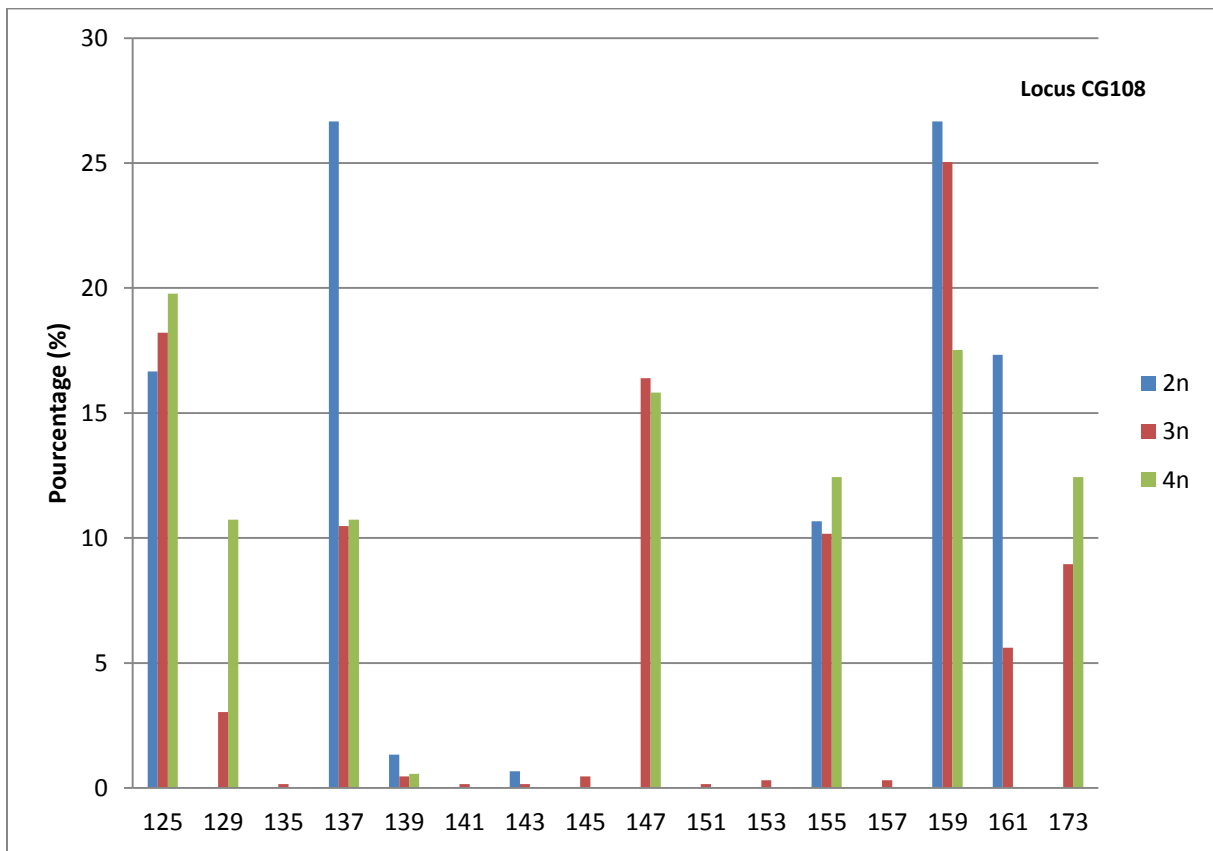
#### 3.1.1. *Diversité des marqueurs*

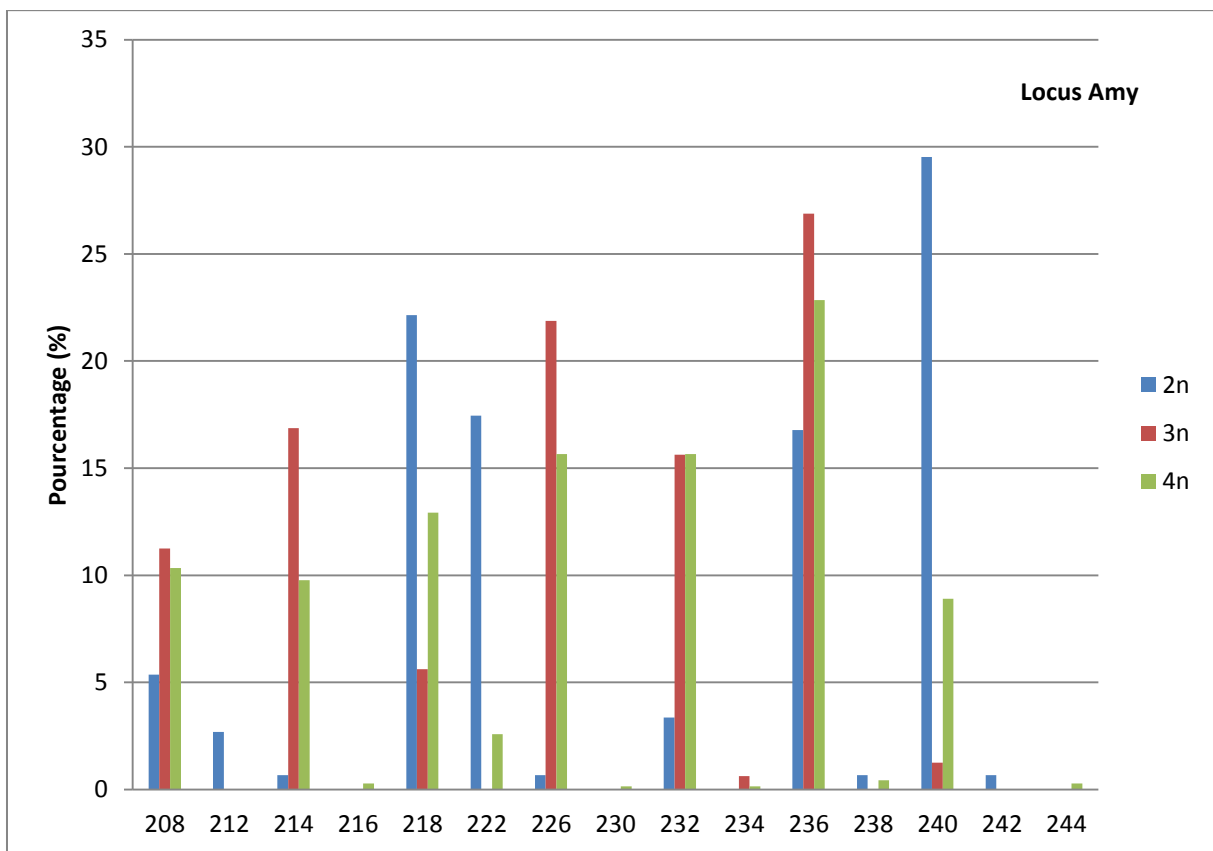
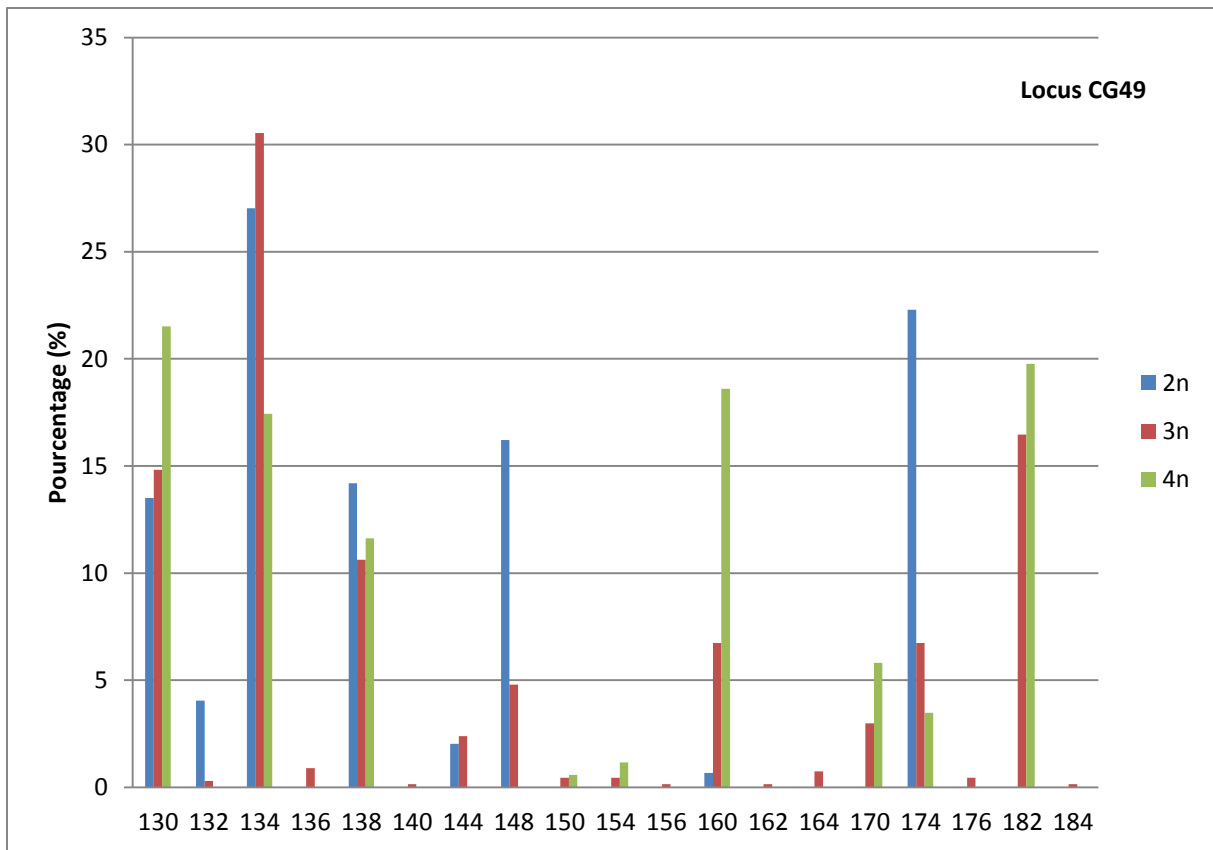
La diversité allélique globale des huîtres du PS3 (2nR, 3nR et 4nR) est plus faible que celle obtenue pour le PS2, mais elle reste relativement élevée avec un minimum de 15 allèles pour le locus AMY et jusqu'à 19 allèles pour le locus CG49. Cependant cette diversité diminue avec en moyenne 9 allèles par locus pour les 2nR et 4nR, dont près de la moitié sont probablement liés à des erreurs de lecture à cause de différences de  $\pm 2$  paires de bases des allèles fréquents. Les fréquences alléliques sont ainsi hautement variables d'un allèle à l'autre, certains ayant une fréquence allélique inférieure à 2%, alors que d'autres représentent plus de 25% aux 4 loci analysés (figure 1). Globalement, les allèles très présents chez les parents le sont également dans la descendance.

#### 3.1.2. *Comparaison des génotypes*

Pour chacun des 11 lots 3nR, la comparaison des profils génétiques entre parents et enfants aux quatre loci considérés ne montrent pas de 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  $\pm 2$  pb).

Figure 1 : Fréquences alléliques aux locus CG 108, L10, CG49 et AMY pour le groupe 3nR et leurs parents diploïdes et tétraploïdes.







### 3.2. Mortalité des huîtres du PS3

#### 3.2.1. Cinétiques de mortalité

Les mortalités ont été observées à partir de juin 2013 pour les deux sites de testages sur estran (Figures 2 & 3), coïncidant avec une température de l'eau de mer atteignant, puis dépassant les 16°C.

On constate deux phases dans les mortalités. La première correspond à une phase de mortalité aigüe en juin. La seconde phase montre des mortalités chroniques de juillet à septembre 2013. En septembre, la mortalité moyenne atteint 60% à Agnas et 61% à La Floride.

En laboratoire, de fortes mortalités ont été observées pour l'ensemble des groupes en mai 2013, atteignant en moyenne 84% à la fin du suivi (Figure 4).

Figure 2 : Evolution de la température et du taux de mortalité pour chaque groupe à d'Agnas de mai à septembre 2013

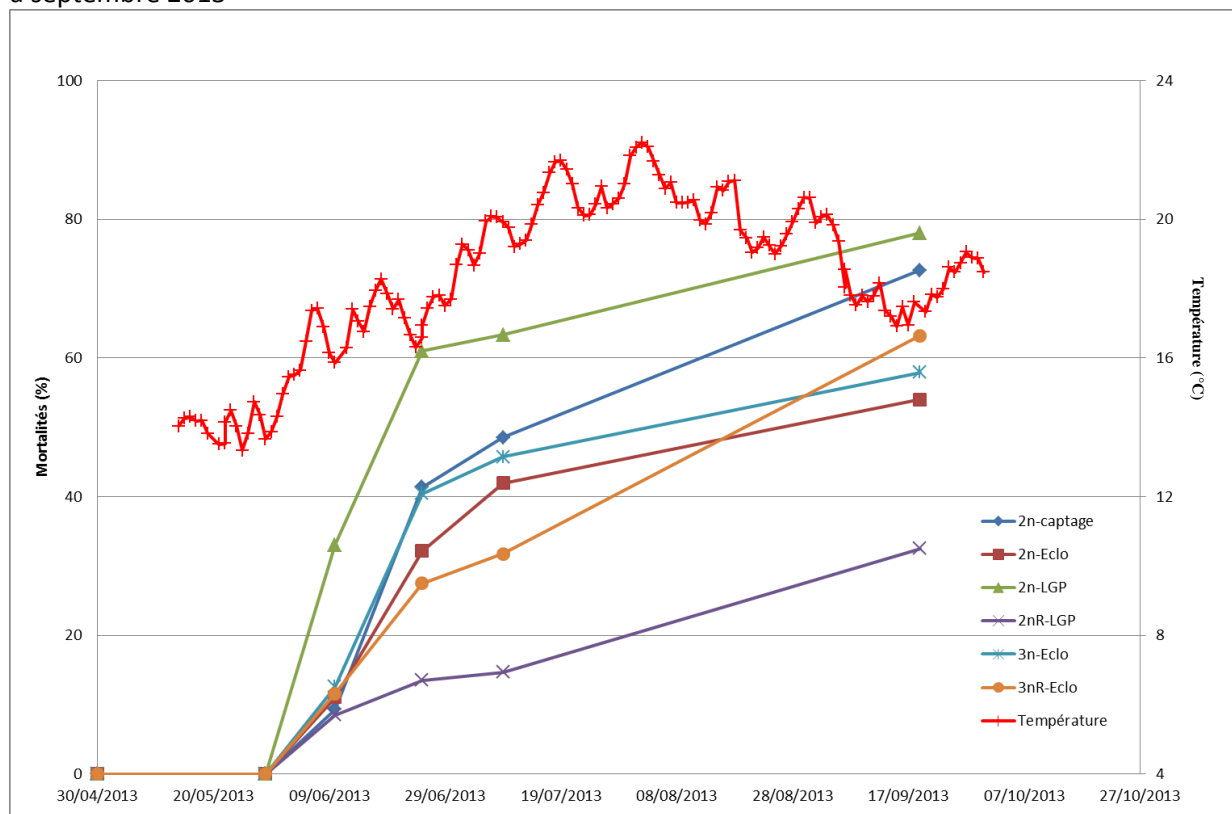


Figure 3 : Evolution de la température et du taux de mortalité pour chaque groupe à La Floride de mai à septembre 2013

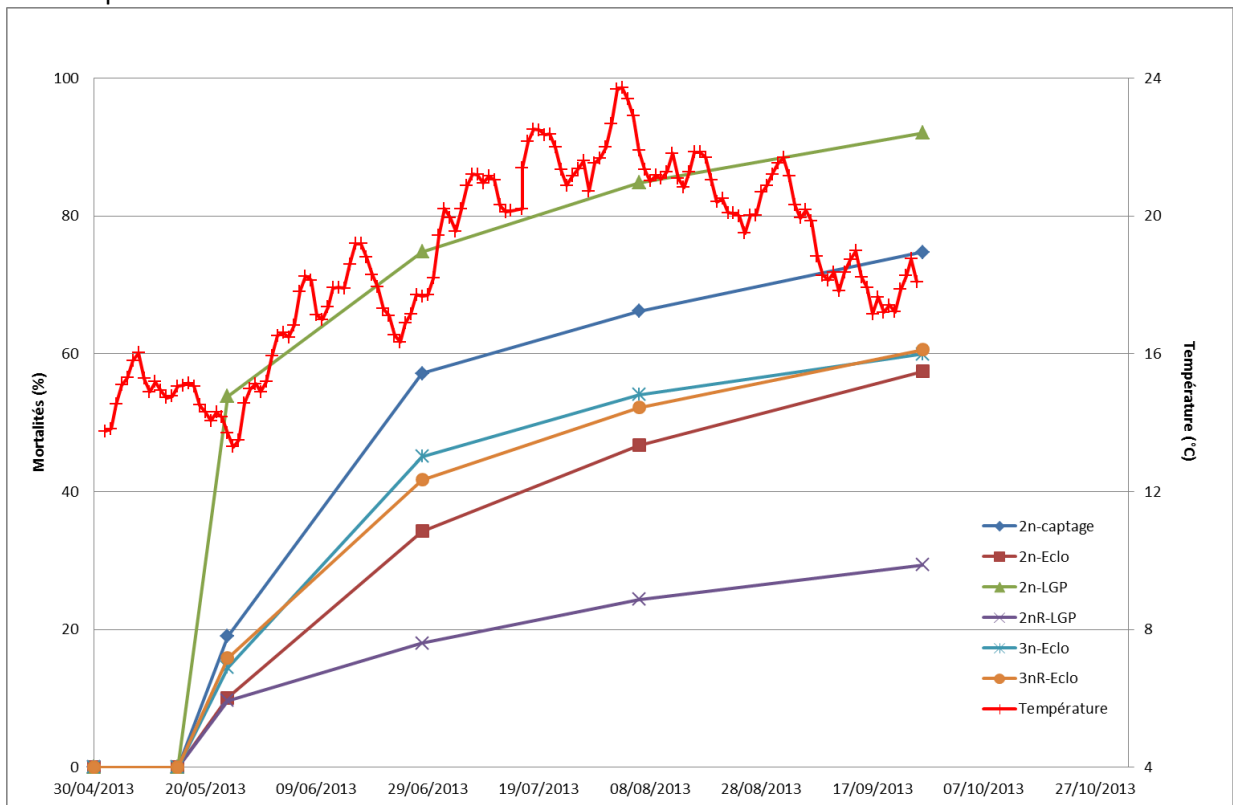
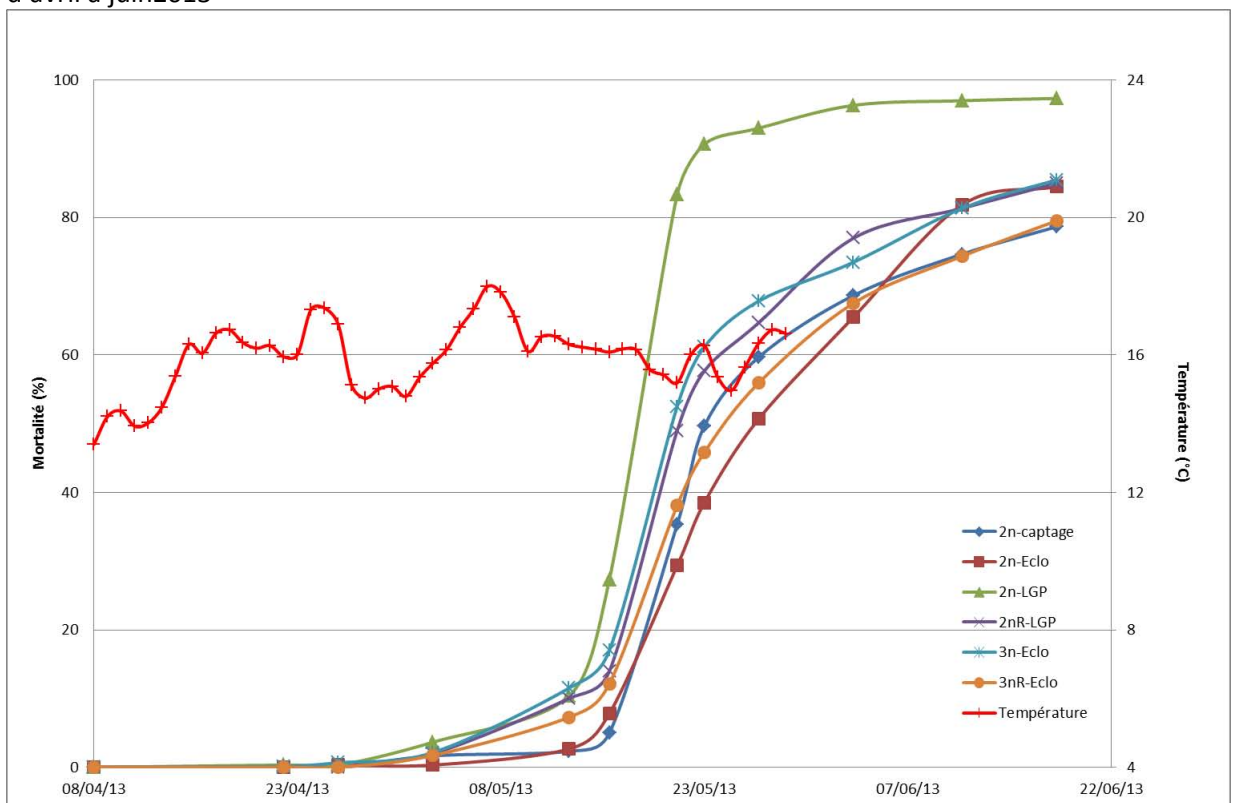


Figure 4 : Evolution de la température et du taux de mortalité pour chaque groupe en laboratoire de d'avril à juin 2013



### 3.2.2. Taux de mortalité finaux

L'analyse globale incluant les données des trois sites fait apparaître des effets significatifs sur le taux de mortalité en fin de testage avec des différences marquées pour les effets site, groupe et une interaction très significative entre les sites et les lots hiérarchisés par les groupes (Tableau 4). Cette interaction illustre la réponse différentielle des différents lots d'un site à l'autre, et les figures 5, 6 et 7 permettent de la visualiser. Par exemple, les lots 2nR-LGP Y29 et Y30 présentent les mortalités les plus faibles (<25%) dans les deux sites sur estran, alors qu'il s'agit des lots 3nR Y18 et Y24 en laboratoire, mais avec des mortalités supérieures à 50%.

Les différences entre groupes reflètent les effets du niveau de ploïdie et de la sélection. Comme attendu les lots sélectionnés 2nR-LGP présentent des taux de mortalités faible et donc, expriment une plus grande capacité de résistance, supérieure à celle des autres groupes testés, alors que le groupe 2n-LGP montre les mortalités les plus élevés, et donc, la plus grande sensibilité aux mortalités (Figure 8). La comparaison des groupes pris deux-à-deux par la technique des contrastes confirme ces écarts systématiques en faveur des 2nR (tableau 5). Elle révèle aussi des différences significatives entre le groupe 3nR-Eclo et le groupe 2n-LGP, avec des mortalités moindres pour le premier. Enfin elle ne montre aucune différence significative de mortalité entre les groupes 3nR-Eclo, 3n-Eclo, 2n-Eclo et 2n-captage. L'analyse des corrélations ne met pas en évidence en intra-site une relation significative entre paramètres associant poids et mortalité, et âge et mortalité, même si les coefficients sont légèrement négatifs (-0,30 à 0), et que la nature de la relation est plus importante pour le poids. L'analyse en inter-sites révèle une corrélation négative et significative ( $r = -0,26$  ;  $p = 0,04$ ) entre les mortalités et le poids, et dans une moindre mesure entre les mortalités et l'âge ( $r = -0,11$  ;  $p = 0,39$ ).

Figure 5 : Taux de mortalité final par lot à Agnas

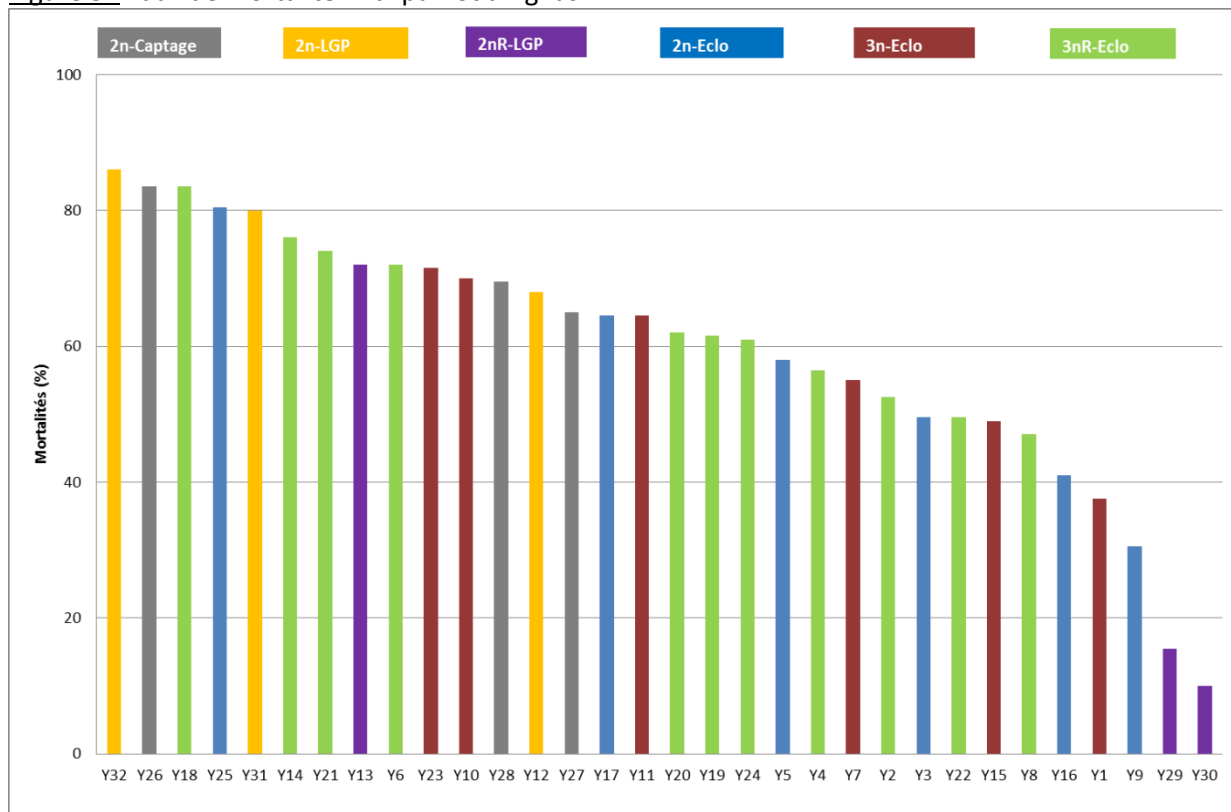


Figure 6 : Taux de mortalité final par lot à La Floride

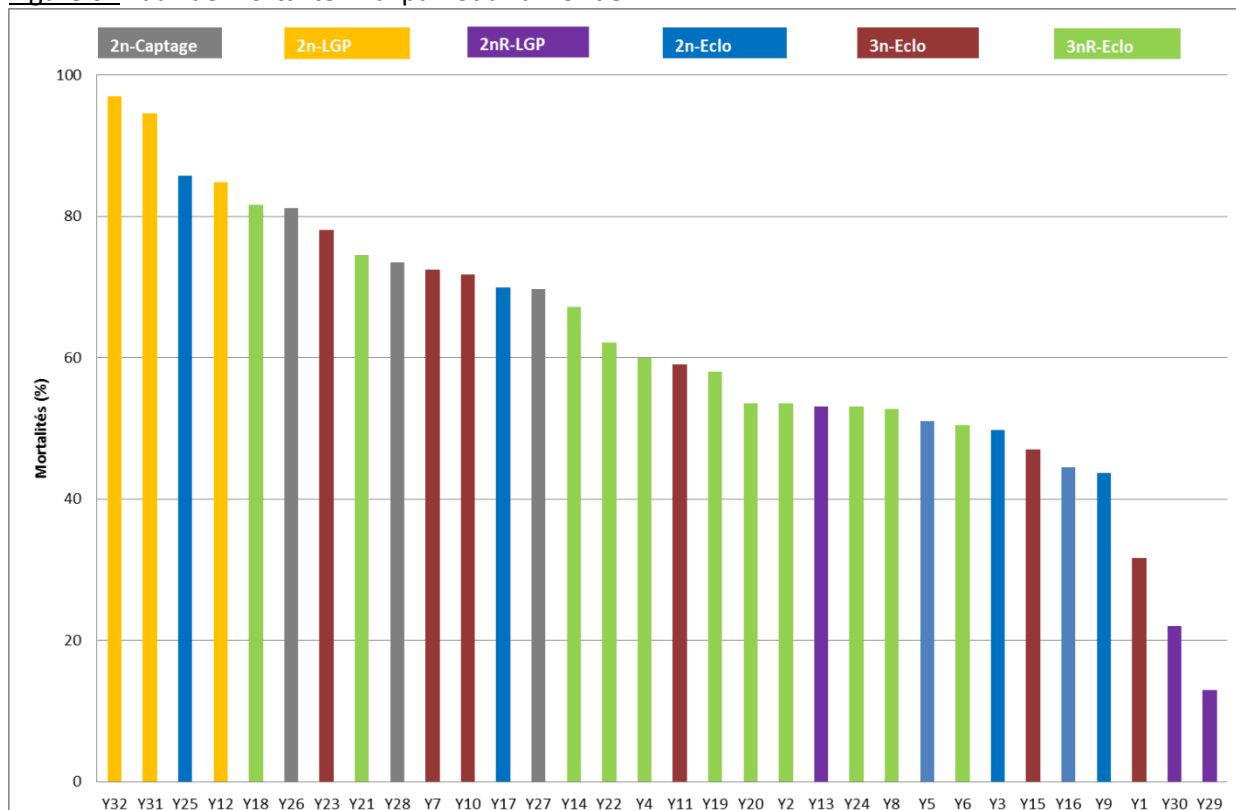


Figure 7: Taux de mortalité final par lot en laboratoire

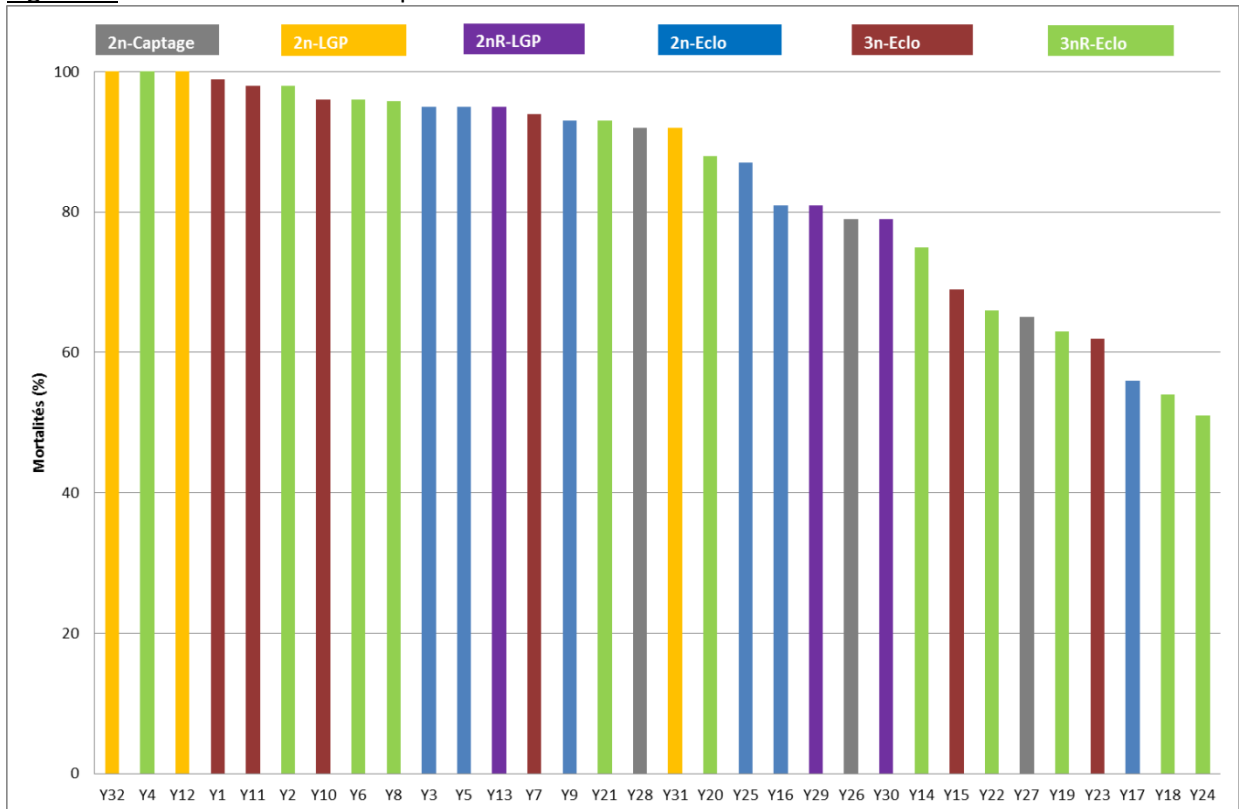


Figure 8 : Taux de mortalité final par groupe en fonction du site. Barres d'erreur : intervalle de confiance pour  $\alpha=0,05$ .

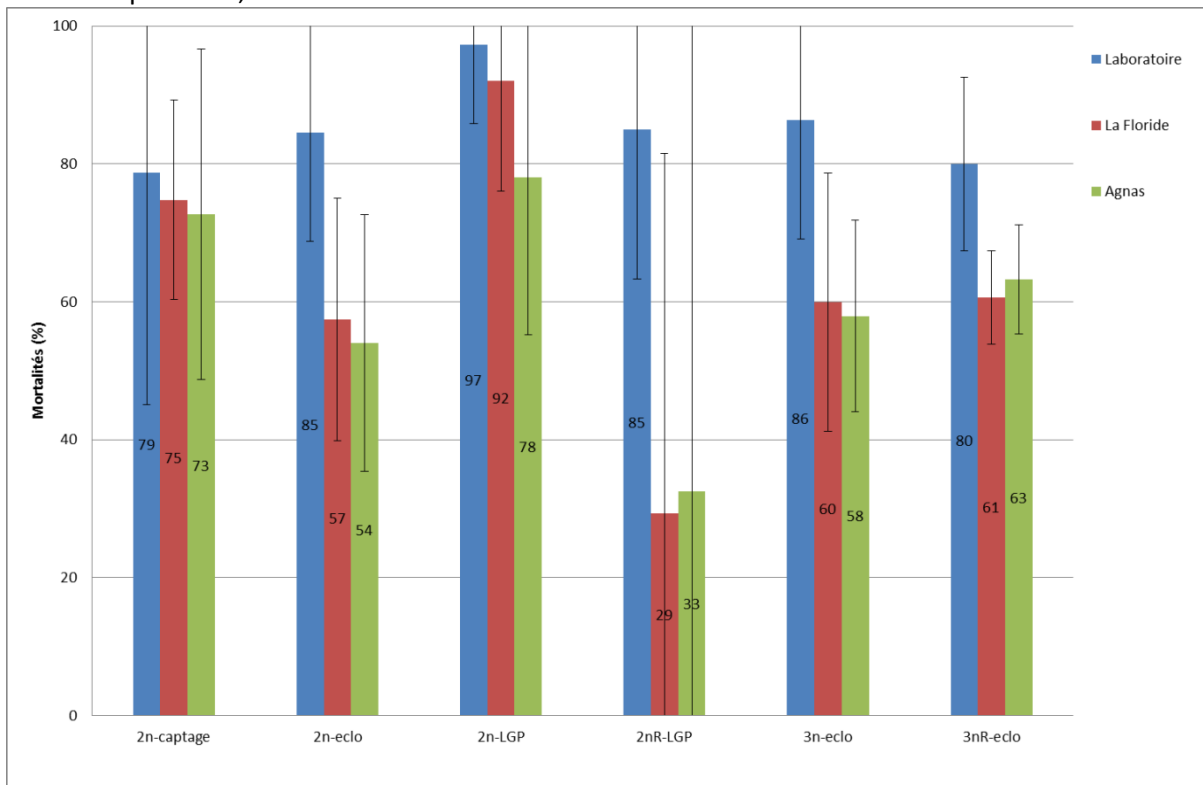


Tableau 4 : Analyses statistiques des mortalités dans les 3 environnements de testages.

Source	ddl	F or $\chi^2$ <sup>a</sup>	P
Site	2	28,37	< 0,0001
Groupe	5	6,47	0,0005
Groupe x site	10	1,24	0,29
<i>Lot(groupe)</i>	<i>1</i>	<i>0,45</i>	<i>0,50</i>
<i>Site x lot(groupe)</i>	<i>1</i>	<i>243,94</i>	<i>&lt;0,0001</i>

<sup>a</sup>  $\chi^2$  en italique

Tableau 5 : Tests de significativité par contrastes sur le taux de mortalité final entre groupes ou entre sites (en gras, la comparaison du groupe 3nR-Eclo avec les autres groupes).

Groupe	Groupe	t Value	Pr >  t
2n-LGP	2n-captage	3.07	0.0045
2n-LGP	2n-Eclo	4.43	0.0001
2n-LGP	2nR-LGP	5.51	<.0001
2n-LGP	3n-Eclo	3.77	0.0007
<b>2n-LGP</b>	<b>3nR-Eclo</b>	<b>4.29</b>	<b>0.0001</b>
2n-captage	2n-Eclo	1.03	0.3145
2n-captage	2nR-LGP	2.59	0.0159
2n-captage	3n-Eclo	0.33	0.7475
<b>2n-captage</b>	<b>3nR-Eclo</b>	<b>0.61</b>	<b>0.5471</b>
2n-Eclo	2nR-LGP	1.96	0.0615
2n-Eclo	3n-Eclo	-0.85	0.4036
<b>2n-Eclo</b>	<b>3nR-Eclo</b>	<b>-0.64</b>	<b>0.5253</b>
2nR-LGP	3n-Eclo	-2.64	0.0138
<b>2nR-LGP</b>	<b>3nR-Eclo</b>	<b>-2.62</b>	<b>0.0145</b>
<b>3n-eclo</b>	<b>3nR-Eclo</b>	<b>0.32</b>	<b>0.7484</b>
Agnas	La Floride	-0.67	0.5050
Agnas	Laboratoire	-6.95	<.0001
La Floride	Laboratoire	-6.30	<.0001

### **3.3. Détection du virus OsHV-1 et de *V. aestuarianus* pour les huîtres du PS3**

A réception des 32 lots, le virus n'a été détecté que pour 1% des 310 animaux analysés (Tableau 6). La recherche du virus au moment des épisodes de mortalité fait apparaître une présence d'OsHV-1 dans 90% des 103 animaux analysés sur estran et 76% des 54 animaux analysés en laboratoire. La quantité d'ADN détectée est relativement élevée durant les épisodes de mortalité, au-dessus de  $10^4$  copies d'ADN viral par mg de tissu (un niveau considéré comme critique pour l'apparition de mortalités liées à l'infection virale). Ce nombre est moindre avant et après les épisodes de mortalité, où le nombre de copies d'ADN viral par mg de tissu d'huître se compte par dizaines à quelques milliers.

La recherche de *V. aestuarianus* pour des huîtres moribondes prélevées pendant les épisodes de mortalité montre une fréquence de détection de 3%, 9% et 82% à Agnas, La Floride et en laboratoire respectivement et des quantités d'ADN bactérien élevées supérieures à  $10^5$  copies par mg de tissu d'huître (Tableau 7).

Enfin, les 2 agents pathogènes ont été détectés dans 5% et 61% des animaux moribonds à Agnas et en laboratoire.

### 3.4. Mortalités des lots entre septembre et novembre 2013 pour le PS3

Sur le site de La Floride, un comptage des mortalités a été réalisé le 18/11/13 pour les 13 lots conservés pour la suite des suivis. Entre septembre et novembre 2013, des mortalités relativement importantes ont été constatées avec en moyenne 28% et variant de 6% à 51% (Figure 9). Il ressort en général que les mortalités observées sont positivement et significativement corrélés au poids des animaux, c'est-à-dire que plus les animaux sont gros, plus la mortalité est élevée ( $r = 0,58$  ;  $p = 0,04$ ). A noter également l'absence de corrélation significative entre les mortalités de septembre à novembre et l'âge des lots en septembre 2013 ( $r = 0,09$  ;  $p = 0,32$ ).

Le taux de mortalité final pour 2013 de ces lots s'établit alors à 78% pour le groupe 2n-captage, 70% pour le groupe 3nR-Eclo, 62% pour les groupes 2n-Eclo et 3n-eclo, et 36% pour le groupe 2nR-LGP.

Figure 9 : Mortalités (%) entre septembre et novembre 2013.

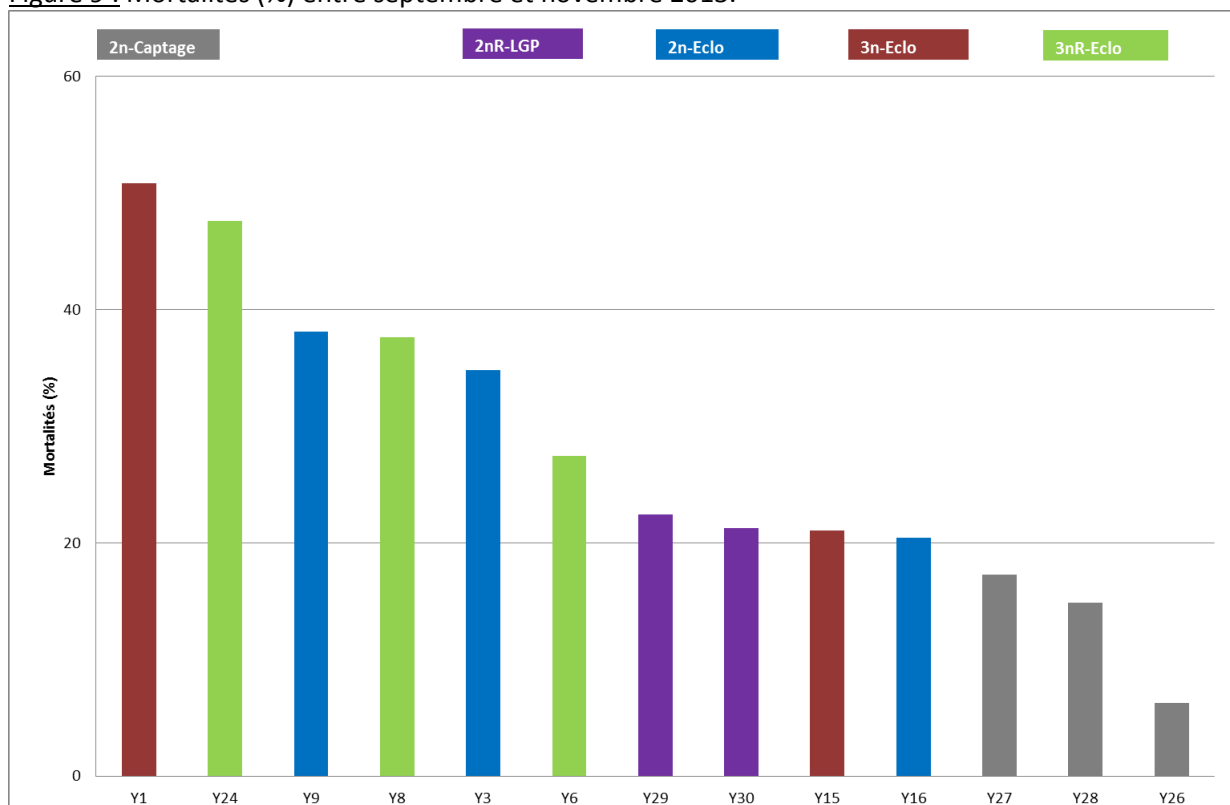




Tableau 6 : Résultats analytiques de la recherche de la présence d'OshV-1 (PCR en temps réel).

	Groupe	Nombre d'individus analysés	Fréquence de détection	Quantité d'ADN*
Réception	2n-captage	30	0%	0
	2n-Eclo	60	2%	1E+02
	3n-Eclo	60	0%	0
	3nR-Eclo	110	2%	3E+02
	2n-LGP	30	0%	0
	2nR-LGP	30	0%	0
	Moyenne			1%
Episode de mortalité à Agnas	2n-captage	3	66%	5E+05
	2n-Eclo	25	100%	4E+06
	3n-Eclo	20	85%	5E+06
	3nR-Eclo	18	78%	2E+06
	2n-LGP	9	100%	3E+06
	2nR-LGP	0		
	Moyenne		89%	4E+06
Episode de mortalité à La Floride	2n-captage	3	100%	8E+05
	2n-Eclo	5	80%	1E+05
	3n-Eclo	4	100%	3E+06
	3nR-Eclo	9	89%	3E+05
	2n-LGP	4	100%	6E+05
	2nR-LGP	3	66%	4E+04
	Moyenne		90%	7E+05
Episode de mortalité en laboratoire	2n-captage	5	100%	3E+06
	2n-Eclo	11	82%	3E+06
	3n-Eclo	5	60%	9E+04
	3nR-Eclo	15	73%	3E+06
	2n-LGP	9	89%	1E+08
	2nR-LGP	9	56%	1E+03
	Moyenne		76%	2E+07
Point final en septembre à d'Agnas	2n-captage	14	7%	7E+02
	2n-Eclo	24	12%	4E+02
	3n-Eclo	32	28%	1E+03
	3nR-Eclo	52	11%	4E+02
	2n-LGP	15	13%	4E+02
	2nR-LGP	18	17%	2E+03
	Moyenne		15%	9E+02
Point final en septembre à La Floride	2n-captage	15	20%	5E+03
	2n-Eclo	30	30%	3E+04
	3n-Eclo	30	33%	3E+04
	3nR-Eclo	55	18%	3E+05
	2n-LGP	15	33%	2E+03
	2nR-LGP	14	7%	4E+03
	Moyenne		24%	1E+05

\* : moyenne des animaux positifs et négatifs exprimée en nombre de copies d'ADN viral par mg de tissu.

**Tableau 7 :** Résultats analytiques de la recherche de la présence de *Vibrio aestuarianus* dans les 32 lots regroupés par groupe et par date d'échantillonnage.

	Groupe	Nombre d'individus analysés	Fréquence de détection	Quantité d'ADN*
Episode de mortalité à d'Agnas	2n-captage	3	0%	0
	2n-Eclo	25	8%	1E+06
	3n-Eclo	20	10%	3E+06
	3nR-Eclo	18	17%	3E+05
	2n-LGP	9	0%	0
	2nR-LGP	0		
	Moyenne		9%	1E+06
Episode de mortalité à La Floride	2n-captage	3	0%	0
	2n-Eclo	5	0%	0
	3n-Eclo	4	0%	0
	3nR-Eclo	8	0%	0
	2n-LGP	4	0%	0
	2nR-LGP	3	33%	2E+06
	Moyenne		3%	2E+05
Episode de mortalité en laboratoire	2n-captage	5	20%	2E+05
	2n-Eclo	11	73%	3E+06
	3n-Eclo	5	80%	2E+07
	3nR-Eclo	15	93%	1E+07
	2n-LGP	9	89%	5E+06
	2nR-LGP	9	100%	4E+07
	Moyenne		82%	1E+07

\* : moyenne des animaux positifs et négatifs exprimée en nombre de copies d'ADN bactérien par mg de tissu.

### **3.5. Performances de croissance des huîtres du PS3**

En avril 2013, les 50 huîtres par lot ont été individuellement pesées et mesurées. Les données moyennes pour chaque groupe sont indiquées dans le tableau 8, et tous groupes confondus, le poids individuel était de 2,8 g pour une longueur de 31 mm. En septembre 2013, le poids moyen et la longueur moyenne étaient de 30 g et 65 mm sur le site de La Floride, et 19 g et 55 mm à Agnas. L'analyse de la croissance montre des différences significatives de croissance pour les facteurs site, lot, et les interactions site x lot et site x groupe (Tableau 9). Cependant, il n'a pas été observé de différence significative de croissance entre les groupes dans les 2 sites de testage sur estran.

Concernant le rendement, tous les facteurs testés étaient significatifs (Tableau 10), bien que l'interaction entre les sites et les groupes soit faible. Pour une mise à l'eau d'environ de 0,5 kg en avril 2013, le rendement moyen final en septembre était de 2,2 kg et 1,6 kg à La Floride et à Agnas respectivement. La comparaison des groupes révèle trois catégories, avec le meilleur rendement pour le groupe 2nR-LGP, intermédiaire pour les groupes 2n-Eclo, 3n-Eclo, 3nR-Eclo et 2n-captage, et le plus faible pour le groupe 2n-LGP (Tableau 11 et Figure 10).

Tableau 8 : Poids individuel moyen par lot, par groupe et par site en début et fin de testage.

Groupe	Lot	initial		final			
		Taille (mm)	Poids (g)	Taille (mm)	Poids (g)	La Floride	Agnas
2n-captage	Y26	26	1,5	47	11,2	39	8,0
	Y27	23	1,3	50	14,6	47	11,6
	Y28	27	1,7	69	23,4	51	13,6
<i>moyenne</i>		26	1,5	56	17,1	47	11,5
2n-eclo	Y16	24	1,4	65	29,7	52	16,5
	Y17	30	1,5	62	22,8	58	18,6
	Y25	19	0,6	45	11,0	49	12,4
	Y3	46	8,1	73	46,5	69	34,7
	Y5	28	2,0	59	23,7	52	16,0
	Y9	38	3,2	64	27,7	64	22,2
<i>moyenne</i>		31	2,8	63	28,5	58	20,2
2n-LGP	Y12	41	4,9	65	29,8	57	20,5
	Y31	18	0,5	47	10,5	32	3,9
	Y32	30	1,4	64	20,8	54	13,6
<i>moyenne</i>		30	2,2	60	23,5	48	13,4
2nR-LGP	Y13	43	5,1	71	34,0	61	21,5
	Y29	22	0,8	63	20,4	53	12,5
	Y30	24	0,8	68	26,2	50	12,1
<i>moyenne</i>		30	2,2	67	26,9	56	15,9
3n-eclo	Y1	49	9,0	88	64,2	74	46,4
	Y10	35	3,2	71	38,5	66	31,4
	Y11	42	4,2	74	40,6	64	24,8
	Y15	29	1,9	57	23,1	55	18,9
	Y23	19	0,6	56	18,7	49	12,7
	Y7	33	2,9	69	32,7	71	28,1
<i>moyenne</i>		34	3,6	69	36,5	63	27,0
3nR-Eclo	Y14	28	1,9	58	25,2	46	15,4
	Y18	20	0,9	57	21,1	46	8,2
	Y19	22	1,1	57	23,1	46	9,9
	Y2	49	8,6	77	52,7	69	38,8
	Y20	33	2,8	74	38,2	61	19,6
	Y21	28	1,8	69	31,9	57	18,6
	Y22	29	2,1	68	34,8	52	15,0
	Y24	17	0,5	50	14,5	41	9,3
	Y4	46	7,5	72	46,2	66	35,9
	Y6	39	3,5	70	34,4	51	15,2
Y8	28	2,1	60	22,9	37	6,7	
<i>moyenne</i>		31	3,0	65	31,7	52	18,1
<i>moyenne</i>		31	2,8	65	29,9	55	19,1

Tableau 9 : Analyses de covariance pour la croissance sur estran.

Source	ddl	Poids		Taille	
		F	P	F	P
Site	1	101,4	< 0,0001	74,76	< 0,0001
Groupe	5	1,16	0,35	1,60	0,19
Groupe x site	5	3,59	0,01	2,93	0,03
Lot(groupe)	26	5,09	<0,0001	3,43	0,0012
Site x lot(groupe)	26	7,79	<0,0001	6,71	<0,0001
erreur	5939				

Tableau 10 : Analyses statistiques du rendement dans les 2 sites de testages sur estran.

Source	ddl	F	P
Site	1	5.49	0.0230
Groupe	5	12.12	<.0001
Groupe x site	5	2.61	0.0354
Rendement initial	1	96.05	<.0001
erreur	63		

Figure 10 : Rendement final par groupe avec le rendement initial en covariable.

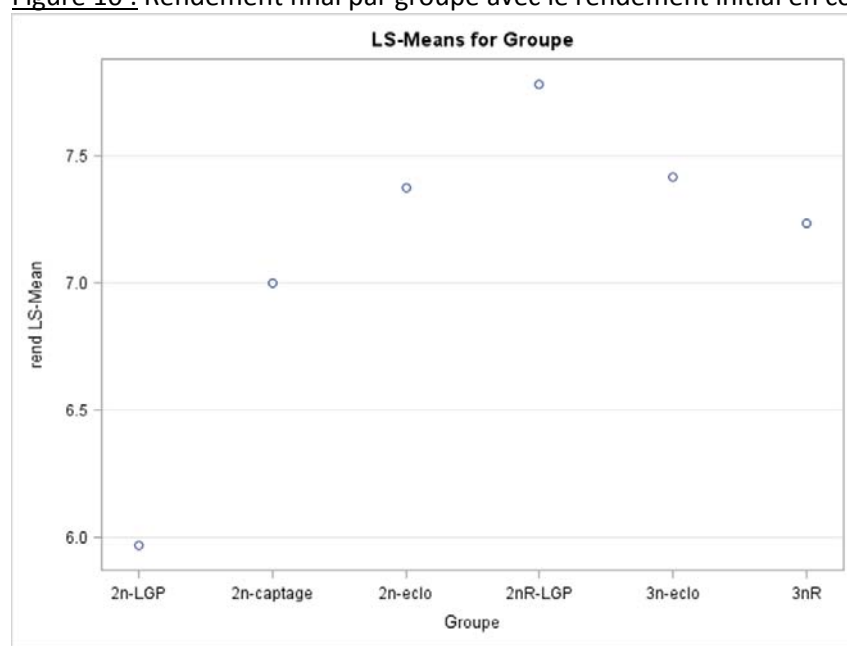


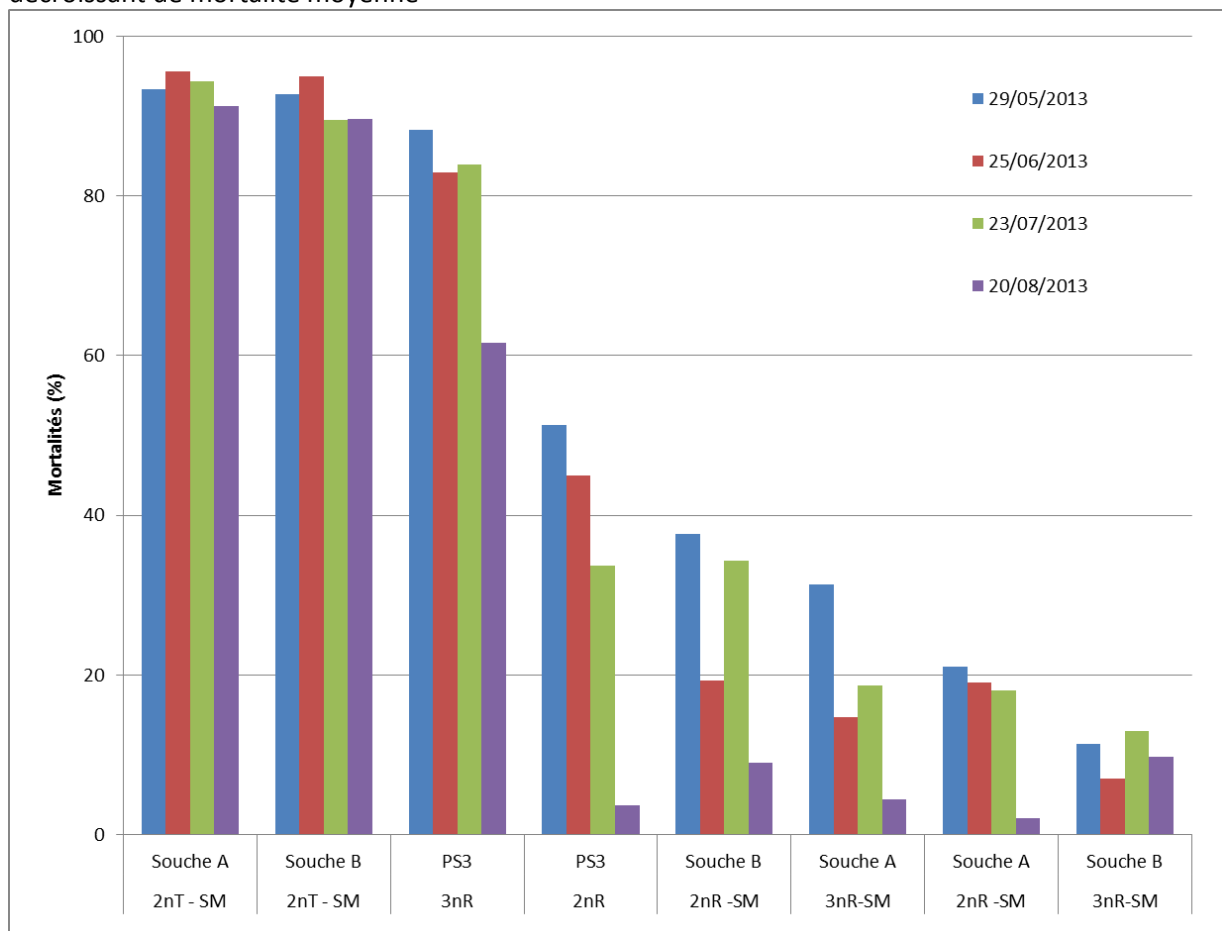
Tableau 11 : Tests de significativité sur le rendement final entre groupes avec le rendement initial en covariable (en gras, la comparaison du groupe 3nR-Eclo avec les autres groupes).

Groupe	2n-LGP	2n-Captage	2n-Eclo	2nR-LGP	3n-Eclo	3nR-Eclo
2n-LGP		0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<b>&lt;.0001</b>
2n-Captage			0.1065	0.0043	0.0821	<b>0.2763</b>
2n-Eclo				0.0737	0.8152	<b>0.3760</b>
2nR-LGP					0.1120	<b>0.0099</b>
3n-Eclo						<b>0.2558</b>

### 3.6. Testage de nouvelles lignées sélectionnées pour leur résistance aux mortalités sur estran et comparaison avec les 2nR et 3nR du PS3

En octobre 2013, les mortalités moyennes des 4 séries de mises à l'eau des lots 2nR et 3nR utilisant le même fond génétique que ceux du PS3 étaient respectivement de 33 et 79%. Concernant les 2 nouvelles souches, les mortalités ont été élevées pour les 2nT avec 94 et 92% pour les souches A et B respectivement. Au contraire, les mortalités ont été inférieures à 25% pour les 2nR et 3nR des deux souches. Les mortalités par lot et date de mise à l'eau sont reportées en figure 11. La recherche d'agent infectieux révèle des quantités d'ADN viral très importantes ( $> 10^{+6}$  copie d'ADN d'OsHV-1 par mg de tissu d'huître), et l'absence de détection de *V. aestuarianus* lors de l'épisode de mortalités pendant lequel l'échantillonnage a été réalisé.

Figure 11 : Taux de mortalité final par lot et par date de mise à l'eau à d'Agnas, classé par ordre décroissant de mortalité moyenne



### **3.7. Suite des suivis des mortalités des animaux des PS1 et PS2**

En mai 2013, les comptages des mortalités depuis octobre 2012 des différents groupes du PS1 indiquent une mortalité moyenne de 8%, variant de 5% pour le groupe 3n-Eclo à 13% pour le groupe 2n-Captage.

Des résultats similaires ont également été observés pour les huîtres du PS2 avec une mortalité moyenne d'octobre 2012 à août 2013 de 6%, variant de 2% pour le groupe 2n-LGP à 12% pour le groupe 2nR-LGP. La recherche d'agent infectieux sur 4 huîtres moribondes échantillonnées en août 2013 ne montre pas de détection pour OshV-1 alors que la bactérie *V. aestuariaunus* a été détectée en grande quantité ( $>10^5$  copie d'ADN bactérien par mg de tissu d'huître) pour 2 des huîtres analysées.

## 4. Discussion

### 4.1. Vérification du pedigree des huîtres du PS3

Même si le génotypage a porté sur des apparentés et non sur les véritables géniteurs, 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 et *V. aestuarianus* dans les huîtres du PS3

A la réception des lots, la fréquence de détection du virus OsHV-1 était très faible (1%). Comme attendu, les lots produits par le LGPMM, dont le parcours zootechnique permet de les protéger des épisodes de mortalités en relation avec des agents pathogènes, peuvent être considérés comme naïf par rapport à cet agent infectieux. Même s'il faut rappeler que le nombre d'individu testés pour chaque lot 2nR-LGP et 2n-LGP était faible (10) et qu'il ne permet pas de caractériser un statut indemne en théorie, plus d'un millier d'individus ayant ce parcours zootechnique ont été à ce jour analysés entre 2010 et 2013 sans que le virus OsHV-1 n'est jamais été détecté. Pour les autres groupes, l'absence de détection ne permet pas de considérer les lots comme naïfs en l'absence de leur parcours de vie avant leur réception au LGPMM. Il est tout à fait possible que certains lots soient naïfs ou porteurs asymptomatiques.

La détection de l'ADN viral avec de fortes quantités dans les animaux morts ou moribonds dans l'ensemble des lots laisse suspecter l'infection virale comme une cause majeure des mortalités observées. En effet, la fréquence de détection pour des animaux moribonds était de 76% en laboratoire et supérieure à 89% sur estran pour un total de 157 individus analysés (Tableau 6). Les quantités d'ADN viral sont également élevées, supérieures à  $10^{+4}$  copies, suggérant qu'OsHV-1 est un facteur causal des mortalités.



Les résultats d'ADN viral après les épisodes de mortalité permettent de souligner une tendance vers une moindre détection du virus, avec une fréquence de détection inférieure à 25% dans les 2 sites sur estran.

La recherche de *Vibrio aestuarianus* sur les animaux moribonds prélevés en juin sur estran lors de la phase aiguë de mortalité révèle des fréquences de détection faibles avec en moyenne 3% et 9% à La Floride et à d'Agnas respectivement. Cependant, pour tous les échantillons positifs, la quantité d'ADN bactérien était élevée, supérieure à  $10^{+5}$  copie, suggérant une implication de cet agent pathogène dans les mortalités observées. Ce constat est encore plus vraisemblable pour les mortalités en laboratoire, avec 82% des huîtres analysées reportées positives, et à des quantités élevées d'ADN bactérien (Tableau 7).

#### **4.3. Mortalité des huîtres du PS3**

Il faut d'abord rappeler l'importance de disposer de l'historique zootechnique complet des lots testés. Excepté pour les lots produits par le LGPMM, considérés comme matériel biologique naïf, des mortalités ont pu déjà toucher certains lots entre la ponte et leur réception par le LGPMM, ce qui pourrait alors biaiser l'interprétation des résultats obtenus de ce plan de sauvegarde.

L'apparition des mortalités associées au virus OsHV-1 sur estran et en laboratoire coïncide avec une température de l'eau proche de 16°C confirmant les résultats observés entre 2009 et 2012 sur estran (Dégremont, 2013), tout en sachant qu'il a également été montré que le virus OsHV-1 était capable d'induire une infection associée à des mortalités à 16°C en conditions expérimentales. Concernant *Vibrio aestuarianus*, les récents testages montrent que des mortalités de naissains, juvéniles et d'adultes de *C. gigas* peuvent être induites à de basses températures.

A la fin du suivi en septembre 2013, les mortalités étaient les plus faibles pour le groupe 2nR-LGP, et les comparaisons entre groupes pris deux-à-deux montrent un avantage significatif et systématique du groupe 2nR-LGP qui, calculé sur les moyennes entre sites, apporte un gain de survie sur estran de 25 à 55% par rapport aux autres groupes (Figure 8). A l'inverse du PS2, le groupe 3nR-Eclo ne

présente pas un taux de mortalité significativement réduit par rapport aux autres groupes, excepté par rapport au groupe 2n-LGP, qui utilise des lots non sélectionnés et n'ayant jamais présenté d'épisodes de mortalité. On remarque tout de même que le groupe 3nR-Eclo présente un léger gain de survie d'environ 12% sur estran par rapport au groupe 2n-captage, ce qui est comparable aux résultats du PS1. Cependant, la mortalité moyenne sur estran du groupe 3nR-Eclo du PS3 (62%) était plus importante que celle du PS2 (52%) (Figure 8) (Chavanne et al., 2012), alors qu'il était attendu un gain de survie d'environ 50-60% selon les testages expérimentaux réalisés en 2011, 2012 et 2013 (Benabdelmouna et al. 2012 ; Dégremon et al. soumis). On peut donc alors s'interroger sur ces résultats étant donné que le progrès génétique des géniteurs 2nR et 4nR du PS3 étaient en partie plus important que celui du PS2.

**Une des hypothèses** avancée concerne un progrès génétique pour la survie des groupes 2n-Eclo et 3n-Eclo plus important pour le PS3 par rapport aux mêmes groupes du PS2. On constate en effet que la mortalité moyenne sur estran des huîtres des groupes 2n-Eclo et 3n-Eclo était respectivement de 89% et 78% pour le PS2 contre 56% et 59% pour le PS3, soit un gain de survie de plus de 30 % pour les diploïdes et de 20 % pour les triploïdes. Ce gain pourrait révéler l'effort réalisé par les éclosiers privées, mais également par l'Ifremer, pour l'amélioration de la survie par la sélection de géniteurs 2n et 4n présentant une meilleure résistance à OsHV-1.

**La seconde hypothèse** évoque une cause de mortalité différente du caractère sélectionné (considérée comme une meilleure résistance à OsHV-1), correspondant ainsi à un autre caractère, lequel pourrait être éventuellement sélectionnable. Pour les testages en mer, même si la première phase de mortalité en juin est typique de mortalités liées à l'infection à OsHV-1, il est possible que les mortalités chroniques observées de juillet à septembre puissent résulter de l'implication d'autres agents pathogènes, associés ou non à OsHV-1. Depuis 2012, la bactérie *V. aestuarianus* est détectée dans des épisodes de mortalités touchant principalement les huîtres adultes, mais également le naissain (Repamo, 2013). Cependant, le manque d'échantillons analysés pendant la seconde phase de mortalités ne permet pas d'affirmer cette hypothèse, mais *V. aestuarianus* a été détecté dans les

adultes moribonds du PS2 échantillonnées sur estran en août 2013, et le naissain en juin 2013. Un effort supplémentaire d'échantillonnages d'huîtres mortes ou moribondes pendant tout le suivi devra donc être réalisé en 2014 pour le PS4 afin d'infirmer ou confirmer cette hypothèse. Enfin, la détection d'OsHV-1 et de *V. aestuarianus* pour des animaux moribonds lors des épisodes de mortalité en laboratoire, ainsi que la co-détection des 2 agents pathogènes pour 61% des animaux analysés, pourrait expliquer les forts taux de mortalités pour l'ensemble des groupes testés en laboratoire qui variaient entre 79% et 97% (Figure 4). La présence des deux agents pathogènes montre clairement une exacerbation des mortalités par rapport à celles enregistrées sur estran pour l'ensemble des groupes (Figure 8), et annihile le gain de survie du caractère sélectionné du plan de sauvegarde. Des résultats similaires ont également été observés en laboratoire lors d'expériences de co-infection expérimentales à OsHV-1 et *V. aestuarianus*, alors qu'en infection expérimentale uniquement par OsHV-1, des lots 2nR présentent des mortalités nettement inférieures à des lots témoins non sélectionnés (Azema and co, données non publiées). Ces résultats suggèrent qu'une moindre sensibilité à l'infection à OsHV-1 n'entraîne pas nécessairement une plus grande résistance vis-à-vis de l'infection à *V. aestuarianus*.

On voit également que les mortalités sont incohérentes avec la taille des animaux car il a été montré que la résistance accrue à l'infection à OsHV-1 augmente avec la taille, et dans une moindre mesure, avec l'âge des animaux (Burge et al., 2006 & 2007 ; Pernet et al., 2012 ; Dégremon, 2013). Ce constat avait été clairement observé dans le cadre du PS2, avec des corrélations négatives et significatives entre les mortalités et le poids des animaux lors du testage ( $r \approx -0,45$  en inter-site), mais il est moins évident pour les mortalités entre juin et septembre du PS3 ( $r \approx -0,26$  en inter-site). A contrario, les mortalités étaient proportionnelles à la taille des animaux pour les mortalités relevées entre septembre et novembre 2013 à La Floride, tout en sachant que *V. aestuarianus* est fortement suspecté comme facteur causal des mortalités. Il est supposé que les comptages des mortalités en septembre auraient pu provoquer un stress qui aurait été favorable au développement de cet agent pathogène. Ce constat est également relevé par des professionnels, et le même phénomène a été

observé pour tous les lots de recherches produits par le LGPMM pour lesquels des mortalités associées à *V. aestuarianus* ont été observées en 2013 après des manipulations importantes des huîtres. Tous ces résultats suggèreraient une implication de *Vibrio aestuarianus*, dans une certaine mesure, dans les épisodes de mortalités observées dans ce plan de sauvegarde.

Malgré ce nouveau facteur, il faut tout de même souligner que des souches développées au LGPMM depuis 2009 ont montré des mortalités faibles en 2013 sur estran aux stades naissains, juvéniles, et adultes. Les suivis des mortalités des lots du PS1 et PS2 le confirment également. Il est donc possible que le parcours de vie des lots du plan de sauvegarde ait influencé les mortalités relevées en 2013, notamment à cause des comptages réguliers lors du suivi. Cependant, les souches sélectionnées 2nR-LGP, notamment celles produites en 2013 dans le cadre de ce plan de sauvegarde, mais également toutes celles produites en 2013 en dehors du plan (environ une vingtaine de lots), ont toutes montré des mortalités beaucoup plus faibles que les autres groupes (Figures 5 & 6).

**La troisième hypothèse** concerne le progrès génétique des 2nR vers les 4nR qui reste à poursuivre pour optimiser la survie au stade naissain et donc augmenter la résistance à l'infection à OsHV-1. Selon l'annexe 2, les 4nR utilisés pour le PS3 proviennent directement de la meilleure famille 2n MOREST. Cependant, cette famille avait été polluée génétiquement au cours des générations de reproduction par des animaux n'appartenant pas à la famille. Des purges ont donc été réalisées par sélection massale pendant deux générations (G2A). Les 4nR utilisés pour le PS3 possédaient donc 50% de leur génome en G0A et 50% de leur génome en G2A. Afin d'obtenir une souche 4nR 100% G2A, il faudrait continuer à introgresser du fond génétique 2n G2A pendant plusieurs générations ceci d'autant plus qu'à chaque génération cette souche diploïde est elle-même améliorée par des tests successifs aux agents pathogènes. Les fortes mortalités des 3nR du PS3 de la figure 11 par rapport aux 2nR illustrent ce constat, qui aurait pu être exacerbé par le faible nombre de géniteurs 4nR utilisés pour produire un lot 3nR. En effet, dans ces conditions, la dérive génétique pourrait alors entraîner une diminution du gain de survie pour une meilleure résistance à OsHV-1. Il faut tout de même rappeler que les résultats de testages expérimentaux réalisés par le LGPMM en 2012 ont

montré qu'avec la souche 4nR utilisée pour le PS3, les gains de survies des 3nR étaient importants par rapport à des huîtres non sélectionnées (+60-70%), mais à condition que le facteur causal des mortalités ait été uniquement l'infection à OsHV-1 (Dégremont et al., soumis). De tels résultats, mettent en évidence l'intérêt de mettre au point des souches présentant des résistances accrues à plusieurs agents pathogènes pour réduire significativement les mortalités massives observées depuis 2012 du stade naissain au stade adulte.

#### **4.4. Performances de croissance sur estran des huîtres du PS3**

Comme pour le PS2, les huîtres ont présenté une meilleure croissance dans le site de La Floride. Comme attendu, il n'a pas été observé de différences de croissance entre les groupes en cette première année d'élevage. Au contraire, le rendement, qui combine survie et croissance, était différent entre les groupes. L'absence de différence de croissance entre les groupes renforce la conclusion que les différences de rendement entre les groupes sont le résultat des différences de survie. A titre d'exemple, le groupe 2nR-LGP avait le meilleur rendement grâce à sa meilleure survie alors que le groupe 2n-LGP avait le rendement le plus faible à cause des mortalités importantes (Figures 8 et 10).

## **5. Conclusion**

Le plan de sauvegarde PS3, dont les lots ont été produits en 2012 et testés en 2013, montre, pour les testages sur estran, que le groupe 3nR a présenté un gain de survie limité par rapport aux huîtres du groupe 2n-captage (+12%) et 2n-LGP (+23%). Cependant, aucun gain de survie n'a été observé entre les 3nR-Eclo et les productions classiques des écloséries. En outre du progrès génétique pour une meilleure résistance à OsHV-1 également réalisé par les programmes de sélection développés par les écloséries, il semblerait qu'une partie non négligeable des mortalités pourrait être attribuée à une infection à *V. aestuarianus*. Il s'agit d'un caractère différent de celui sélectionné, et les premiers

résultats expérimentaux révèlent que les huîtres sélectionnées pour une meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 ne confèrent pas une résistance accrue à l'infection de *V. aestuarianus*, ni d'ailleurs, une sensibilité accrue. Il faudrait toutefois pondérer les résultats du groupe 3nR du PS3 par la quantité d'huîtres produites par éclosérie. En effet, les lots 3nR ayant eu les mortalités les plus importantes ne représentaient que quelques millions d'individus, alors qu'il s'agissait de plusieurs dizaines de millions d'individus pour les lots 3nR ayant eu les meilleures survies. Ainsi, le taux de mortalité moyen du groupe 3nR aurait donc été inférieur à 62% en pondérant par la quantité d'huîtres produites par lot 3nR.

On notera que le caractère de résistance persiste pour les lots 2nR-LGP testés sur estran en présence d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*, notamment pour les lots Y29 et Y30 avec des mortalités inférieures à 20% (Figures 5 & 6), mais également pour les nouvelles souches développées au LGPMM (Figure 11). Il est cependant prudent d'attendre des testages supplémentaires jusqu'à la taille commerciale, étant donné que cette classe de taille présente des mortalités importantes par *V. aestuarianus* en France depuis 2012.

## 6. Références

Benabdelmouna A, Chavanne H, Dégremont L, Yonneau C, Maurouard E, Heroïn D, Ledu C, Brizard R (2012). Plan de sauvegarde année 2011, résultats et perspectives pour l'année 2012. Journées Conchylicoles Ifremer, 23-24 janvier 2013, Roscoff.

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00136/24692/22742.pdf>

Burge C, Griffin F, Friedman C (2006). Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Organ.* 72, 31–43.

Burge CA, Judah L, Conquest L, Griffin F, Cheney D, Suhrbier A, Vadopalas B, Olin P, Renault T, Friedman C (2007). Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26, 163–172.

Chavanne H, Maurouard E, Yonneau C, Heroïn D, Ledu C, Dégremont L, Benabdelmouna A (2013). Plan de sauvegarde 2011 : synthèse de résultats 2011-2012.

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00143/25412/>

Dégremont L (2013). Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 416, 129-134. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00157/26799/>

Dégremont L, Ledu C, Maurouard E, Nourry M, Benabdelmouna A. Effect of ploidy on the mortality of *Crassostrea gigas* spat caused by OsHV-1 in France using unselected and selected OsHV-1 resistant oysters. Soumis.

Repamo (2013). Bilan au 30/11/13 des analyses réalisées pour la recherche d'organismes pathogènes dans le cadre de l'étude des hausses de mortalités de coquillages. Bulletin mortalités, IFREMER-LGPMM, 14p.

## Annexe 1 : Historique des lots diploïdes « R »

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 fortement touchés par des mortalités 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),



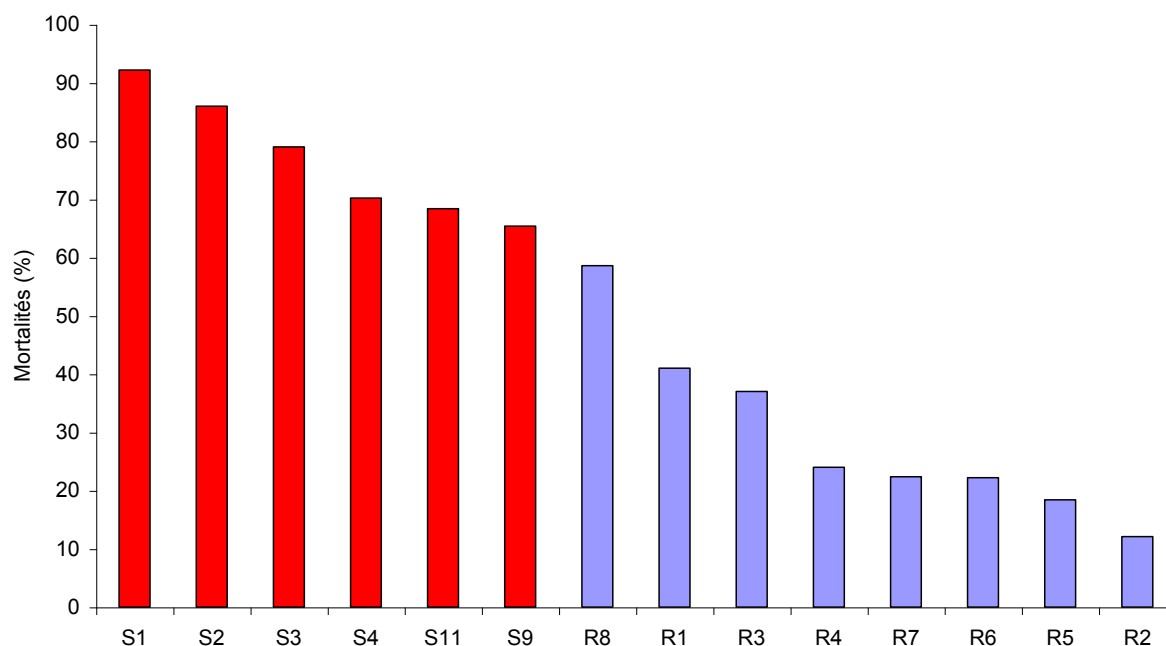
par l'absence de testage en Rivière d'Auray et par la disparition de plusieurs lots sélectionnés sensibles ainsi que les témoins à cause de fortes mortalités en micronurserie à La Tremblade (*Vibrio mytilii*) et en nurserie à Bouin (OsHV-1) en août et octobre 2007 respectivement. En conséquence, la comparaison 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 (%  $\pm$  écart-type) des lignées sélectionnées de la G5 pour des huîtres âgées de 17 mois.**

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

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 quelle que 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’augmentation de la résistance à OshV-1 avec la taille et l’âge des animaux (Dégremont et al., 2010 ; Dégremont 2013). De plus, il a été démontré pour la première fois que les huîtres R présentaient une meilleure résistance à l’infection par OshV-1 avec des quantités d’ADN viral 1000 fois plus faibles que des lots sensibles à l’infection par OshV-1 (Dégremont, 2011).

**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 éclosérie en même temps que les huîtres sélectionnées.

La génération suivante produite est la G7 issue d'un croisement réalisé entre mars et avril 2010 à partir des lots G6-R1 et G6-R5 survivants des mortalités 2009 causés par OsHV-1.. Trois nouveaux lots ont été constitués, deux lots consanguins et un non consanguin formant la G1A pour première génération d'amélioration de la survie face à OsHV-1(tableau 4).

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

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

Enfin, des pontes réalisées en août 2010 et février 2011 à partir des lots de la G7 ont produits la G2A pour seconde génération d'amélioration de la survie face à OsHV-1. Les testages réalisés pour ces animaux ont montré que les huîtres R-G2A avaient des survies meilleures que des huîtres non

sélectionnées dans l'ensemble des bassins de productions ostréicoles français (Tableau 5) (Dégremont et al., 2011).

**Tableau 5 : Bilan des mortalités (%) au 5 décembre 2011 du lot témoin et du lot R-G2A**

Région	Suivi effectué par	Site	Témoin	R-G2A
Languedoc Roussillon	Ifremer	Marseillan	96	54
	Ceptralmar	Bouzigues	96	60
Aquitaine	Ifremer	Hossegor	92	10
	Ifremer	Tes	79	14
Poitou Charentes	Ifremer	La Floride	94	14
	Ifremer	Agnas	94	27
	CREAA	Marais	92	64
	CREAA	Filière-Saumonards	85	21
	CREAA	Chevallier	90	19
	CREAA	Viandet	91	19
	CREAA	Boyard	90	15
Pays de Loire	SMIDAP	Moutiers	94	3
	SMIDAP	Paillard	93	4
Bretagne	Ifremer	Pénerf	76	4
	Ifremer	Rade de Brest	80	10
Basse Normandie	SMEL	Blainville 1	87	14
	SMEL/Ifremer	Blainville 2	63	11
	Ifremer	Grandcamp	62	3
<i>Moyenne</i>			86	20

## Annexe 2 : Caractéristiques des huîtres utilisées pour le plan de sauvegarde 2012 (PS3)

### Huîtres diploïdes 2nR

- Le lot diploïde 2nR fourni par l'IFREMER aux éclosiers est constitué des huîtres survivantes des lots de la G8-G2A (huitième, génération de reproduction, et seconde génération d'amélioration de la survie pour des épisodes de mortalités associées à OsHV-1). Ces huîtres ont été produites dans l'écloserie IFREMER du LGPMM en 2010 et 2011, puis élevées sur estran jusqu'à distribution des survivantes aux éclosiers en janvier 2012 (Tableau 1).
- Les lots diploïdes R de la G8-G2A ont pour fond génétique les lots R1 et R5.
- Sécurité zoosanitaire (herpès, vibrios, Maladies à Déclarations Obligatoire) : La recherche d'agent infectieux sur le lot 2nR a été réalisée à plusieurs reprises en 2011. Aucun agent pathogène à déclaration obligatoire n'a été observé pour les lots analysés. Cependant, il a été détecté à de nombreuses reprises de l'herpès virus ainsi que des *Vibrio* sp.

**Tableau 1 : Effectif du lot 2nR distribués aux éclosiers.**

Ecloserie	Effectif
Vendée Naissain	5160
France Turbot	4085
Satmar	3440
Sodabo	1505
Vendée Ecloserie	430
Kerné	430
Labadie	430
Ponant	430

## Huitres tétraploïdes 4nR

- Historique et génétique:

Les TETRA R utilisés dans le cadre du PS3 et qui ont été proposés pour l'année 2012, ont été obtenus, à partir du BREVET, suite à une induction réalisée en 2010 à partir de géniteurs obtenus en 2009.

Dès 2009, une induction directe a été entreprise à partir de la meilleure famille diploïde sélectionnée disponible : la famille R5 de la cinquième génération de reproduction (G5) pour produire la première famille de tétraploïdes R (Tetra R-5).

En 2010, vu le nombre restreint de **Tetra R-5** et vu l'obtention de la famille diploïde améliorée **G2A** (famille R5 G7, famille ayant subi deux challenges successifs en 2009 et 2010, cf. géniteurs diploïdes), les Tetra R-5 obtenus en 2009 ont été améliorés via l'injection de sang neuf (méthode « Ronçoise ») provenant de cette famille élite améliorée G2A et ceci afin d'obtenir une nouvelle famille appelée **G1-Tetra R-55**.

Enfin, fin 2011, des géniteurs mâles et femelles G1-Tetra R-55 dont le statut a été vérifié par cytométrie en flux ont été utilisés afin d'obtenir (par fécondation naturelle) la deuxième génération des Tetra R-55 (appelée **G2-Tetra R-55**).

Pour la campagne 2012 du plan de sauvegarde, vu la taille insuffisante des huitres G2-Tetra R55, la première ponte 3nR réalisée aux mois de mai 2012 par les écloséries commerciales a été réalisée en utilisant des géniteurs tétraploïdes appartenant à la **G1-Tetra R55** alors que les pontes suivantes, réalisées de juin à septembre 2012, l'ont été en utilisant des géniteurs tétraploïdes issus de la **G2-Tetra R55**.

- Mesures de bio-sécurité :

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. 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 géniteur tétraploïde mâle livré est marquée avec une puce électronique collée sur sa valve supérieure.

- Conditions de maintien et d'utilisation :

- à IFREMER

Les différents lots tétraploïdes obtenus ont toujours été maintenus au sein de l'écloserie LGP alimentée en eau de mer traitée aux UV et ont toujours été indemnes des épisodes de mortalité depuis l'année 2009. Dès le mois de mars - avril, l'Ifremer conditionnera des lots de futurs géniteurs tétraploïdes à la maturation de façon séquentielle dans les installations de la station Ifremer de La Tremblade. Une fois livrés, ces géniteurs tétraploïdes mâles seront utilisés selon un nombre adapté en fonction de la taille potentielle de la ponte chez l'Écloser (nombre de femelles). Avant chaque livraison, les géniteurs tétraploïdes mâles sont au préalable sexés, vérifiés au niveau de leur ploïdie, et enfin biopsiés dans un but de vérification et de traçabilité du pedigree.