Défi MOREST

Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas.*

Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

Synthèse du thème IVA

Etude des bases génétiques de la mortalité estivale du naissain et des possibilités d'amélioration de la survie par sélection.

(La Rochelle 14-15 mars 2006)

Projet cofinancé par :

Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

Synthèse du thème IVA

Etude des bases génétiques de la mortalité estivale du naissain et des possibilités d'amélioration de la survie par sélection.

2000 - 2005

Pierre Boudry

Principaux contributeurs : **Lionel Dégremont, Bruno Ernande, Edouard Bédier, Patrick Soletchnik, Michel Ropert, Adeline Fortin, Stéphanie Grouhel.**

Coordinateur du programme

J.F. Samain

Projet cofinancé par :

Organisation du thème :

1. Introduction : contexte et objectifs 1

2. Première génération : Estimation de la base génétique de la survie du naissain sur estran en première période estivale 2

2.1. Matériel et méthodes 2

2.1.1. Echantillonnage des géniteurs G0 et production des familles G1 2

2.1.2. Suivi sur estran 3

2.1.3. Analyse des données 4

2.2. Résultats obtenus en première génération 4

2.2.1. Survie 4

2.2.2. Croissance 4

2.2.3. Paramètres génétiques 5

3. Seconde génération : sélection divergente pour une faible ou une forte survie du naissain sur estran en première période estivale 5

3.1. Matériel et méthodes 5

3.1.1. Choix des familles G1 et production des lots G2 5

3.2. Résultats 6

3.2.1. Survie de la G2 6

3.2.2. Croissance de la G2 7

3.2.3. Paramètres génétiques 7

4. Troisième génération : répétabilité de la réponse à sélection divergente pour une faible ou une forte survie du naissain en première période estivale et expression du caractère chez les triploïdes. 8

4.1. Production des lots G3 8

4.2. Résultats des suivis sur estran 8

4.2.1. Survie et croissance 8

4.2.2. Paramètres génétiques 9

5. Quatrième génération : Répétabilité de la réponse à la sélection 10

5.1. Production des lots G4 10

5.2. Suivi des lots G4 11

6. Etude des performances de survie en seconde période estivale sur estran 12

6.1. Survie des lots ayant passé deux étés sur estran. 13

6.2. Survie des lots ayant passé le premier été en nurserie et le second sur estran. 13

7. Etude des performances de survie du naissain au laboratoire et corrélations avec les données obtenues sur estran 13

7.1. Résultats des suivis en laboratoire 14

7.2. Comparaisons entre les mortalités sur estran et au laboratoire 15

8. Discussion et perspectives 16

8.1. Base génétique ou transmission verticale d'un agent pathogène ? 16

8.2. Pourquoi une telle variabilité génétique pour la résistance aux mortalités estivales dans les populations naturelles ? 17

8.3. Perspectives 17

9. Bibliographie 18

10. Annexe : Liste récapitulative des lots étudiés 19

1. Introduction : contexte et objectifs

Malgré l'importance économique de la production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en France et dans le monde, cette espèce n'a encore que peu bénéficié des améliorations observées chez la quasi-totalité des espèces d'intérêt agricole et un nombre croissant d'espèces d'intérêt aquacole. Le principal apport de la génétique à l'amélioration de la production de cette espèce consiste en la production d'individus triploïdes (pour revue voir Nell, 2002). Chez les huîtres, les principaux objectifs des programmes de sélection ont été classés par Mahon (1983) en quatre groupes principaux par caractères d'intérêts : (a) caractères liés à la ponte et au développement larvaire ; (b) amélioration de la survie et de la croissance de la fixation à la taille commerciale ; (c) résistance à des facteurs environnementaux défavorables ; et (d) morphométrie de l'huître. Parmi ces quatre groupes, le second est le plus fréquemment cité par les scientifiques et les professionnels même si les objectifs peuvent différer entre les pays, entre les espèces et éventuellement entre différentes régions d'un pays. De nos jours, la survie et la croissance sont toujours les deux caractères prioritaires étudiés dans les programmes de sélection (Lymbery, 2000).

Les huîtres sont *a priori* de très bons candidats pour des programmes de sélection compte tenu de leur importance économique, du contrôle du cycle biologique, de la grande variabilité génétique et d'une fécondité importante (Gosling, 2003). En Australie, plusieurs programmes de sélection ont débuté dans les années 1990 visant à améliorer la croissance chez *Saccostrea commercialis*. A partir de 1990, un programme de sélection massale a été initié par le NSW Fisheries. Les résultats acquis après deux générations de sélection étaient encourageants (Nell et al., 1996 ; Nell et al., 1999). Pour *C. gigas*, un programme de sélection a débuté dans ce pays en 1996. Les principaux objectifs de ce programme visent à améliorer la croissance, la qualité de la chair et la forme de la coquille par l'intermédiaire de plusieurs stratégies de sélection (sélection individuelle et/ou familiale, croisements consanguins). Les premiers résultats indiquent un gain de performance pour tous les caractères étudiés avec les meilleurs résultats via la sélection familiale (CSIRO, 2002). Aux USA, le « MBP » (http://www.hmsc.orst.edu/projects/mbp), programme de sélection ayant pour objectif d'améliorer le rendement en culture, a été initié en collaboration avec les écloseries américaines sur la côte ouest. Les résultats de ce programme, basé sur un nombre important de familles (>400), montrent un gain génétique significatif pour ce caractère (Langdon et al., 2003).

L'estimation de l'héritabilité et des corrélations génétiques entre caractères d'intérêt apparaît un préalable indispensable au lancement d'un programme de sélection de ces caractères. Chez les bivalves, un nombre relativement important d'estimations d'héritabilité pour divers caractères est rapporté dans la littérature, mais la grande majorité de ces études concerne la croissance et très peu la survie. En effet, ce caractère est considéré comme étant très difficile à améliorer par l'intermédiaire de la sélection génétique (Gjedrem, 1985), alors que la croissance est généralement considérée comme étant un caractère présentant une héritabilité faible à modérée (Toro et Newkirk, 1990).

Aux USA, les travaux menés chez *C. gigas* dans les années 1970-1980, suite aux problèmes de mortalités estivales survenues dès les années 1960, ont montré que ces mortalités affectaient différentiellement des familles bi-parentales (Beattie et al., 1980). Un schéma de sélection, basé sur (1) des « challenges » thermiques appliqués aux géniteurs et (2) la sélection des meilleures familles issues de ces géniteurs fut alors proposée (Beattie et al., 1980). Les résultats obtenus en troisième génération ont montré une diminution significative des mortalités (Hershberger et al., 1984) mais le schéma de croisement et de sélection utilisée n'ont apparemment pas permis de calculer l'héritabilité du caractère ni de poursuivre à plus long terme ce programme. De la même manière, des différences significatives en terme de survie entre familles bi-parentales ont été mises en évidence en France (Pajot et al., 1998 ; Le Borgne, com. pers.). Les différences observées entre familles ne sont pas forcément d'origine génétique du fait (1) des biais possibles liés à la confusion entre effet « famille » et effet « environnement précoce» et (2) à la possible transmission verticale ou pseudo-verticale d'agents pathogènes (notamment le virus de type herpès).

Les travaux plus récents réalisés dans le cadre de la thèse de Bruno Ernande montraient des résultats intéressants, notamment sur la survie (Ernande, 2001). Les bases génétiques de la croissance, la survie et l'effort reproducteur ; ainsi que leur plasticité ; ont été étudiées en se basant

sur un plan de croisements de type hiérarchique (15 familles de plein-frères constituant 5 familles de demi-frères) (Ernande et al., 2004). Les résultats obtenus en milieu contrôlé et milieu naturel ont montré des différences significatives entre familles pour l'ensemble des caractères étudiés. Parmi les 3 caractères étudiés, la survie présente la plus forte héritabilité (0,28 ± 0,18). Pour ce qui concerne la plasticité de ces caractères, l'effort reproducteur présente une forte héritabilité (0,58 ± 0,33). L'étude des corrélations génétiques et phénotypiques (en milieu contrôlé) entre les caractères de croissance, effort reproductif et survie est particulièrement intéressante. Les corrélations phénotypiques entre (1) croissance et survie et (2) croissance et effort reproductif sont négatives. A l'inverse, la corrélation phénotypique entre croissance et effort reproductif est positive. Le signe des corrélations génétiques entre ces caractères change en fonction des environnements dans lesquels les huîtres sont élevées. De plus, une forte corrélation génétique positive entre survie et plasticité de l'effort reproducteur a également été montrée. Ces résultats démontrent la grande flexibilité des « mécanismes » physiologiques sous-jacents et l'importance des interactions animal-environnement dans les études génétiques chez les huîtres.

Dans ce contexte et dans le cadre du projet Morest, les travaux synthétisés ici visaient à déterminer si la survie du naissain de *C. gigas* en période estivale est héritable, et donc sélectionnable. Les principales questions amenées par cette problématique sont :

- Existe-t-il une base génétique de la survie du naissain en période estivale ?
- Quelle est l'importance de cette base génétique si elle existe ?
- Quelle est la réponse à la sélection lorsque la survie est sélectionnée ?
- Quelle est la nature des corrélations entre la survie du naissain et d'autres caractères d'intérêt (survie et croissance ultérieures) ?

Afin de répondre à ces questions, un protocole expérimental de génétique quantitative a été mis en œuvre sur plusieurs générations afin de répondre à ces questions. Ces travaux permettent de déterminer si la survie du naissain de l'huître creuse en période estivale est héritable et donc sélectionnable. Ils fournissent également les connaissances nécessaires à la définition d'une stratégie de sélection génétique pour améliorer la survie et à sa mise en œuvre.

2. Première génération : Estimation de la base génétique de la survie du naissain sur estran en première période estivale

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Echantillonnage des géniteurs G0 et production des familles G1

300 huîtres, issues de captage naturel de Seudre, ont été échantillonnées en novembre 2000 dans le bassin de Marennes-Oléron. Ces huîtres on été maturées selon les conditions standards d'écloserie et reproduites aux cours de 3 séries successives de croisements. L'écloserie de La Tremblade disposant d'une unité homogène de 24 bacs d'élevage larvaire de 30 litres, 3 séries de croisements successifs ont été réalisées les 02 février 2001, 02 mars 2001 et 18 avril 2001 respectivement pour les séries 1, 2 et 3. Pour chaque série, 6 mâles ont été utilisés et chaque mâle a été croisé avec quatre femelles afin d'obtenir 6 familles de demi-frères et 24 familles de plein-frères (figure 1) (les mâles et les femelles étant choisis aléatoirement dans la population G0). Ce type de plan de croisements permet de calculer les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations) et de distinguer la variance génétique additive (Va). La variance phénotypique est alors séparée en composantes d'observations attribuables (Falconer et Mackay, 1996) :

- aux différences entre les enfants des différents mâles (composante inter-mâle : σ^2s)
- aux différences entre les enfants des femelles accouplées au même mâle (composante inter-femelle et intra-mâle : σ^2d)
- aux différences entre les enfants d'une même femelle (composante intra-femelle : σ^2w)

Pour chaque série de croisements, un témoin d'écloserie nommé 'pool' a été produit avec les géniteurs ayant servi à l'élaboration des 24 familles de la série correspondante.

Série 1

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
F1	F1-1					
F2	F1-2					
F3	F1-3					
F4	F1-4					
F5		F2-5				
F6		F2-6				
F7		F2-7				
F8		F2-8				
F9			F3-9			
F10			F3-10			
F11			F3-11			
F12			F3-12			
F13				F4-13		
F14				F4-14		
F15				F4-15		
F16				F4-16		
F17					F5-17	
F18					F5-18	
F19					F5-19	
F20					F5-20	
F21						F6-21
F22						F6-22
F23						F6-23
F24						F6-24

Série 2

	M7	M8	M9	M10	M11	M12
F25	F7-25					
F26	F7-26					
F27	F7-27					
F28	F7-28					
F29		F8-29				
F30		F8-30				
F31		F8-31				
F32		F8-32				
F33			F9-33			
F34			F9-34			
F35			F9-35			
F36			F9-36			
F37				F10-37		
F38				F10-38		
F39				F10-39		
F40				F10-40		
F41					F11-41	
F42					F11-42	
F43					F11-43	
F44					F11-44	
F45						F12-45
F46						F12-46
F47						F12-47
F48						F12-48

Série 3

	M13	M14	M15	M16	M17	M18
F49	F13-49					
F50	F13-50					
F51	F13-51					
F52	F13-52					
F53		F14-53				
F54		F14-54				
F55		F14-55				
F56		F14-56				
F57			F15-57			
F58			F15-58			
F59			F15-59			
F60			F15-60			
F61				F16-61		
F62				F16-62		
F63				F16-63		
F64				F16-64		
F65					F17-65	
F66					F17-66	
F67					F17-67	
F68					F17-68	
F69						F18-69
F70						F18-70
F71						F18-71
F72						F18-72

Figure 1 : Plan de croisement hiérarchisé par les mâles des 3 séries pour la constitution des familles de première génération.

A l'issue de la période d'élevage larvaire, chaque famille a été fixée sur micro-brisure de coquille d'huître. Les naissains d'une taille d'environ 2 mm, ont ensuite été transférés à la nurserie de Bouin pour grossissement. A J129, J115 et J102 respectivement pour les séries 1, 2 et 3, chaque lot a été tamisé sur une grille de 8 mm pour éliminer les (rares) individus ayant une taille inférieure à la maille, et conserver les individus retenus par la maille pour la mise en élevage sur estran. La Figure 2 résume le calendrier de ces opérations. A la fin de la période de micro-nursage, 14, 18 et 18 familles respectivement pour les séries 1, 2 et 3 présentaient des effectifs suffisants pour le protocole envisagé. Il a donc été décidé de ne conserver que 15 familles bi-parentales pour les séries 2 et 3 pour l'expérience de la caractérisation sur estran des cheptels (soit un total de 44 familles).

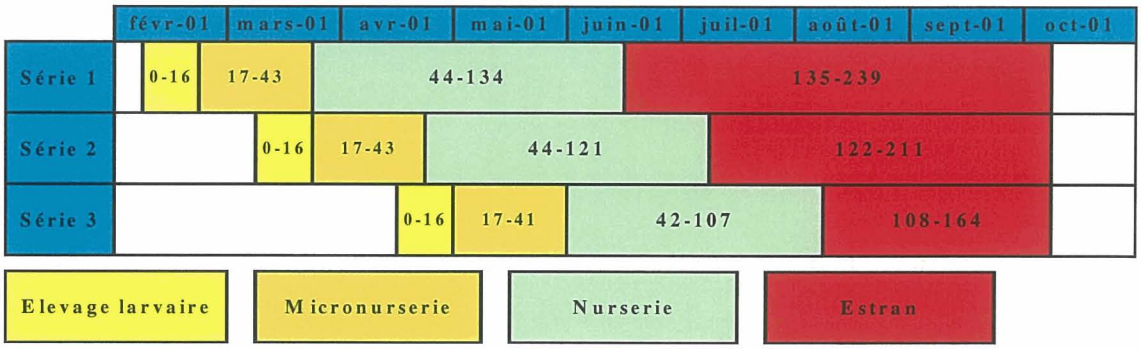

Figure 2 : Calendrier de production des trois séries de la première génération de l'élevage larvaire à la fin du suivi in situ (les chiffres indiquent l'âge en jours des huîtres).

2.1.2. Suivi sur estran

La caractérisation sur estran des familles a été réalisée dans un dispositif multi-sites composé de 3 sites ateliers : Ronce Perquis (« Ronce » dans le Bassin de Marennes-Oléron), Rivière d'Auray (« RA » en Bretagne sud) et Baie des Veys (« BDV » en Normandie). Ronce et RA sont des sites présentant habituellement les plus fortes mortalités de juvéniles entre juin et septembre, alors que BDV présente des mortalités estivales moins importantes à ce stade (Fleury et al., 2001).

Les lots ont été disposés sur site à raison de 9 demi-poches par famille et par site (maille de 7 mm, 27 cm x 100 cm) contenant chacune 150 individus, et une poche de réserve contenant environ 1000 individus. Le poids total des 150 individus a été mesuré pour chaque poche lors de la mise sur site (P0), et une pesée individuelle de 200 individus par famille a été réalisée.

Pour chaque site, 3 prélèvements de 3 demi-poches ont été effectués avec une périodicité de deux semaines (P1) et un mois (P2) après la mise sur site, et un point final (P3) qui a eu lieu début octobre 2001. Au final, le naissain a été élevé sur estran 104, 89 et 56 jours pour les séries 1, 2 et 3 respectivement. Les huîtres vivantes et mortes ont été comptées lors des 3 prélèvements, et une pesée totale du naissain vivant a été effectuée pour toutes les demi-poches. En supplément à ce suivi, des pesées individuelles de 30 à 90 individus par lot en fonction des sites ont été réalisées lors du second et du dernier prélèvement.

2.1.3. Analyse des données

L'analyse des données (significativité des effets ou des différences, estimation des paramètres génétiques...) avec le logiciel SAS (proc GLIMIX et proc GLM). Les méthodes et modèles utilisés ne sont pas détaillés ici (voir Dégremont, 2003, Ernande et al., 2004, Dégremont et al., 2005).

2.2. Résultats obtenus en première génération

2.2.1. Survie

Les mortalités entre la mise sur site et octobre ont été de 6, 16 et 25% sur les sites BDV, Ronce et RA respectivement. Les familles de demi-frères ont montré des mortalités moyennes de 2 à 34% en BDV, de 3 à 69% à Ronce et de 8 à 82% à RA (Figure 3). Tous les facteurs testés sont significatifs sauf l'effet série et l'interaction site x femelle (Tableau 1). La famille de demi-frère issue du mâle 14 a montré des fortes mortalités dans les 3 sites. Les familles de demi-frère issues des mâles 4, 7 et 8 ont montré de fortes mortalités (38 à 63%) à Ronce et RA. Inversement, les familles de demi-frère issues des mâles 2, 9, 10, 11, 15 et 18 ont montré des faibles pourcentages de mortalité (moins de 7% à Ronce, 12% à RA et 6% à BDV).

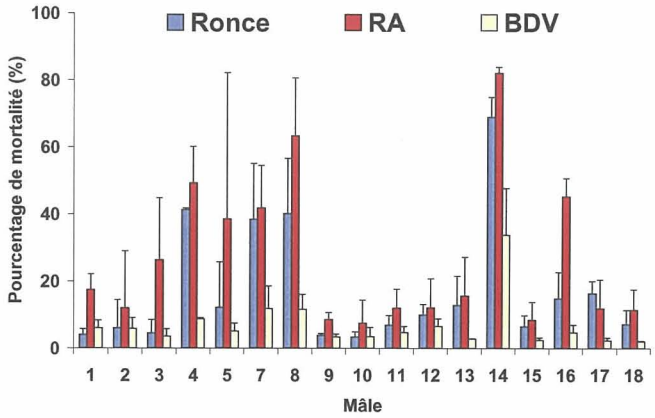

Figure 3 : Pourcentages moyens de mortalité et écart-types des 17 familles de demi-frères relevés dans les 3 sites le 02 octobre 2001.

2.2.2. Croissance

Les moyennes et écart-types des poids totaux individuels intra- et inter-séries lors de la mise en élevage sur site à Bouin, et sur les 3 sites expérimentaux sont présentés dans le tableau 1. Les croissances journalières entre familles de demi-frères ont varié de 0.0085 à 0.0124 *log*(g).j^{-1} à Ronce, de 0.0067 à 0.0096 *log*(g).j^{-1} à RA et de 0.0092 à 0.0151 *log*(g).j^{-1} en BDV. Des différences significatives ont été observées entre mâles et entre sites (Tableau 2), le site présentant les meilleures croissance étant BDV (0.0116) et le moins bon RA (0.0083). Dans tous les sites, les descendants du male 4 ont montré la moins bonne croissance journalière et celle du male 18 la meilleure. L'interaction male x site n'est pas significative alors que l'interaction femelle x site l'est. L'effet série est significatif, la série 3 présentant les meilleures croissances journalières.

Tableau 1 : Moyennes (g) et écart-types du poids total individuel en intra- et inter-séries lors de la mise en élevage sur site à Bouin (P0), et sur les 3 sites expérimentaux en octobre 2001 (P3). Les résultats des tests statistiques sont indiqués avec pour sitea x série : effet de la famille de plein-frères ; sites x inter-séries : effet de la série; inter-sites x sérieb : effet du site; et inter-sites x inter-séries : effets respectifs du site et de la série.

Site	P	Série 1	Série 2	Série 3	Inter-séries
Bouin	P0	1,67 ± 0,47 **	1,70 ± 0,28 **	1,65 ± 0,35 **	1,67 ± 0,36 ns
Ronce	P3	16,11 ± 2,32 **	13,44 ± 1,73 **	6,67 ± 1,07 **	11,98 ± 4,37 **
RA	P3	11,17 ± 2,09 **	9,22 ± 1,15 **	5,07 ± 0,80 **	8,42 ± 2,93 **
BDV	P3	19,63 ± 3,07 **	16,31 ± 1,18 ns	9,47 ± 1,41 **	15,03 ± 4,71 **
Inter-site	P3	15,64 ± 4,29 **	12,99 ± 3,24 **	7,07 ± 2,14 **	11,81 ± 4,87 ** / **

*(** : p<0,01 ; * : p<0,05 ; ns : non significatif)*

2.2.3. Paramètres génétiques

Les estimations d'héritabilité de la survie et de la croissance sont présentées dans le tableau 2. Toutes les valeurs d'héritabilité au sens strict sont significativement différentes de zéro. L'héritabilité de la survie est très élevée à Ronce (1.04 ± 0.34) et à RA (1.26 ± 0.41) et modérée en BDV (0.44 ± 0.17). Pour la croissance, des valeurs d'héritabilité plus faibles ont été obtenues (0.15 à 0.07 selon les sites) et aucune d'entre elles n'est significativement différente de 0.

Les corrélations génétiques entre survie et croissance sont faibles et négatives. Elles sont seulement significativement différentes de 0 seulement à Ronce (Tableau 3). Les corrélations génétiques de la survie entre sites sont toutes positives et très élevées, mais pas significativement différentes de 0 entre RA et BDV.

Tableau 2 : Héritabilités au sens strict (h^2 ± erreur standard) pour la survie et la croissance et corrélations génétiques (ρa ± erreur standard) entre les deux caractères dans les trois sites.

	Ronce	Rivière d'Auray	Baie des Veys
Survie	1.05 ± 0.44*	0.86 ± 0.38*	0.46 ± 0.20**
Croissance	0.15 ± 0.08	0.07 ± 0.07	0.10 ± 0.06
ρ_a	0.24 ± 0.11*	-0.01 ± 0.09	0.17 ± 0.11

*: p<0.05; **: p<0.01

Tableau 3 : corrélations génétiques (± erreur standard) pour la survie et la croissance entre les sites.

	Ronce vs. RA	RA vs. BDV	Ronce vs. BDV
Survie	1.26 ± 0.46*	0.92 ± 0.30*	1.13 ± 0.37*
Croissance	0.05 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.03

*: p<0.05

3. Seconde génération : sélection divergente pour une faible ou une forte survie du naissain sur estran en première période estivale

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Choix des familles G1 et production des lots G2

Suite aux résultats obtenus en 2001, la meilleure et la plus mauvaise famille de demi-frères pour chaque série a été retenue pour une expérience de sélection divergente sur la survie au stade naissain. Dans la suite de ce chapitre, les familles sélectionnées n'ayant pas ou peu subi les mortalités estivales de 2001 ont été dénommées familles « résistantes», ou 'R', et les familles sélectionnées comme ayant présentées des mortalités importantes en 2001 ont été appelées familles « sensibles » ou 'S'.

Pour chaque famille G1 sélectionnées, 500 individus ont été conservés à la nurserie de Bouin pour grossissement intensif afin d'obtenir des animaux aptes à se reproduire dès l'âge de 9 mois. Ces animaux, indemnes de toute mortalité, ont été mis en élevage sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron de fin septembre à mi-janvier. Début janvier 2002, aucune mortalité n'ayant été

constatée 60 individus par lot ont été conditionnés pour reproduction selon le plan de croisement présenté dans les tableaux 4 et 5, générant les familles « G2R » et « G2S ». Chaque famille a été obtenue par le croisement d'une moyenne de 25 mâles et 25 femelles de chaque famille G1 sélectionnée afin de représenter au mieux leur valeur génétique. Des lots témoins diploïdes (G2t2n) ont été réalisés à partir des pools de la G1 (croisements inter-série de manière à éviter toute consanguinité). Un lot triploïde (G2t3n) a également été constitué à partir d'un croisement entre de femelles des pools 1, 2 et 3 avec trois mâles tétraploïdes.

D'autre part, ces mêmes familles G1 ont été reproduites en consanguinité (intra famille de plein-frères et de demi-frères) (tableaux 6 et 7). Pour les lots G2, les protocoles d'élevage larvaire, de micronurserie et de nurserie utilisés pour G1 ont été appliqués à l'identique. Le protocole de suivi sur estran a été identique à celui pratiqué pour la G1 et s'est achevé le 8 octobre 2002. Les familles G2c n'ont été suivies sur estran que sur le site de Ronce.

Tableau 4 : Plan de croisement pour l'obtention de la sélection divergente « basse » (=G2S)

Mâle		7		14	
	Famille	F7-25	F7-26	F14-54	F14-55
4	F4-15		W	B	C
	F4-16	Z	AB	F	G
7	F7-25			J	L
	F7-26			M	P

Tableau 5 : Plan de croisement pour l'obtention de la sélection divergente « haute » (G2R)

Mâle		9		15	
	Famille	F9-35	F9-36	F15-57	F15-58
2	F2-5	A	D	I	K
	F2-8	E	H	7	N
9	F9-35			O	R
	F9-36			S	V

Tableau 6 : Plan de croisement pour l'obtention de la lignée consanguine « haute » (= G2cR).

Mâle			2		9		15	
	Famille G1		F2-5	F2-8	F9-35	F9-36	F15-57	F15-58
		Sexe	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle
2	F2-5	Femelle	A2	C2				
	F2-8	Femelle	F2	G2				
9	F9-35	Femelle			J2	K2		
	F9-36	Femelle			N2	O2		
15	F15-57	Femelle					R2	S2
	F15-58	Femelle					V2	W2

Tableau 7 : Plan de croisement pour l'obtention de la lignée consanguine basse (G2cS)

Mâle			4		7		14	
	Famille G1		F4-15	F4-16	F7-25	F7-26	F14-54	F14-55
		Sexe	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle
4	F4-15	Femelle	/	Y2				
	F4-16	Femelle	15	D2				
7	F7-25	Femelle			E2	H2		
	F7-26	Femelle			I2	L2		
14	F14-54	Femelle					M2	P2
	F14-55	Femelle					Q2	/

3.2. Résultats

3.2.1. Survie de la G2

Les données de survie de la G2 sont résumées dans le tableau 8. Les mortalités moyennes ont été de 13,8%, 24,1% et 11,5% à Ronce, RA et BDV respectivement. Les mortalités moyennes ont été de 5,1%, 6,1%, 12,4%, et 29,9% respectivement pour les lots G2t3n, G2R, G2t2n et G2S. La survie moyenne des lots G2R et G2t3n est significativement supérieure à celle des lots G2t2n et G2S. L'interaction entre la survie des lots et les sites est significative. Des différences significatives ont été observées entre les sites pour la survie des G2R, G2S et G2t2n, mais pas pour les G2t3n.

Pour ce qui concerne les lots G2c, la mortalité moyenne sur le site Ronce a été de 19,6%. Les lots G2cS ont montré une mortalité significativement inférieure (3,8 %) aux G2cS (43,3%) mais similaire au témoin (G2cT).

3.2.2. Croissance de la G2

Les données de croissance de la G2 sont résumées dans le tableau 8. A l'issue de la période de suivi, les poids individuels moyens étaient de 7.7 ± 0.6g à Ronce, 8.9 ± 1.1 à RA, et de 14.2 ± 2.6g en BVD, ces différences de poids entre sites étant significatives. Par contre, aucune différence entre les lots n'est significative. Les résultats sont différents pour ce qui concerne la croissance des lots consanguins et leur témoin. Les poids initiaux en sortie de la nurserie de Bouin sont significativement différents entre lots (G2cS > G2cR > G2cT). La croissance pondérale à l'issue de la période de suivi à Ronce est significativement supérieure pour le témoin G2cT que pour les lots G2cR, lui-même supérieur aux G2cS.

Tableau 8 : Mortalités moyennes (%) et poids individuels moyens (± écart-types) des lots G2.

	Mortalité				Poids individuels		
Lot	Ronce	RA	BDV	Bouin $_{\text{sortie nurserie}}$	Ronce	RA	BDV
G2R	5,0 ± 3,7	7,2 ± 3,2	7,2 ± 2,6	1.1 ± 0.2	8,0 ± 0,7	9,2 ± 0,7	13,2 ± 1,6
G2S	33,1 ± 17,4	43,3 ± 12,0	19,0 ± 14,9	1.1 ± 0.2	7,5 ± 0,6	8,3 ± 1,0	14,1 ± 2,3
G2t2n	7,9 ± 6,5	23,7 ± 6,6	5,5 ± 1,9	1.0 ± 0.1	7,5 ± 1,1	8,9 ± 0,7	14,9 ± 3,5
G2t3n	2,0 ± 1,2	7,3 ± 6,3	6,0 ± 3,3	1.3 ± 0.6	7,9 ± 3,0	11,4 ± 2,5	20,3 ± 6,3
G2cR	3,8 ± 3,6	/	/		5,0 ± 0,8	/	/
G2cS	43,4 ± 29,5	/	/		5,0 ± 0,8	/	/
G2ct	3,7 ± 0,9	/	/		4,5 ± 0,1	/	/

3.2.3. Paramètres génétiques

Du fait de la distribution observée en G1, de La pression de sélection pour diminuer la survie (c.a.d. l'écart à la moyenne de l'ensemble des familles) a été plus forte pour diminuer la survie (lots G2sS) que pour l'augmenter (lots G2R) (Figure 4). Pour les G2S, la réponse à la sélection a été de 12 à 26% et les estimations d'héritabilité réalisée varient de 0.51 en RA à 1.12 en BDV, mais seule l'estimation obtenue à Ronce est significative (Tableau 9) (Figure 4). Des résultats similaires ont été obtenus pour la sélection « haute » (voir Tableau 9). En combinant les résultats obtenus en sélection « haute » et basse », les estimations d'héritabilité réalisées sont significatives dans les trois sites avec 0,64 à Ronce, 0,65 à RA et 0,82 en BDV.

Tableau 9 : Estimations d'héritabilité réalisée pour la survie du naissain estimée en seconde génération.

	G2R		G2S		G2R + G2S	
Site	h^2	n^A	h^2	n^A	h^2	n^A
Ronce	0.14 ± 0.32	12	0.92 ± 0.32*	12	0.64 ± 0.09***	24
RA	0.88 ± 0.15***	9	0.51 ± 0.29	10	0.65 ± 0.08***	19
BDV	-0.99 ± 0.55	9	1.12 ± 0.50	9	0.82 ± 0.24**	18

$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.0001$, ^{A}n : nombre de lots.

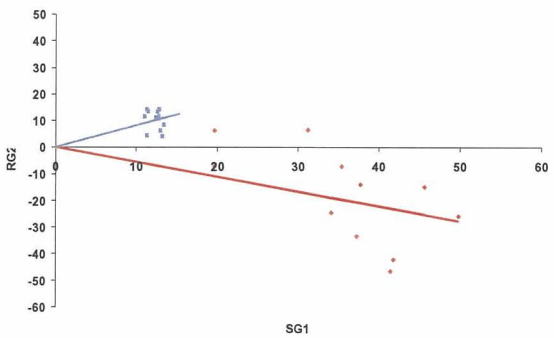

Figure 4 : Régression parent-enfant des lignées haute et basse à Ronce. SG1 : écart à la sélection, RG2 : réponse à la sélection. Les lots de la lignée haute sont représentés en bleu, et les lots de la lignée basse en rouge. L'axe des abscisses est en valeur absolue car SG1 est négatif pour tous les lots de la lignée basse.

4. Troisième génération : répétabilité de la réponse à sélection divergente pour une faible ou une forte survie du naissain en première période estivale et expression du caractère chez les triploïdes.

Afin de tester la répétabilité de la réponse à la sélection et les estimations des paramètres génétiques observées en seconde génération, une troisième génération a été produite en 2003.

4.1. Production des lots G3

De manière similaire aux générations précédentes, 500 huîtres par lot G2 ont été gardées hors de toute mortalité dans la nurserie de la Station de Bouin puis transférées sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron en Octobre 2002. Soixante huîtres par lot ont été conditionnées pour leur reproduction. Trois types de croisements ont été réalisés.

Les lots G3S et G3R, exempts de consanguinité, ont été obtenus par croisement des G2cR et G2cS (comme présenté dans les tableaux 10 et 11). Chaque croisement a été réalisé dans les deux sens possibles (mâles x femelles et femelles x mâles) avec une moyenne de 23 mâles et 23 femelles par lot parental G2c. L'ensemble des femelles utilisées pour produire les lots G3S et G3R ont également été croisées avec 3 mâles tétraploïdes, générant respectivement les lots triploïdes G3S3n et G3R3n. Des témoins triploïdes et diploïdes ont également été générés en croisant des femelles diploïdes sauvages avec les 3 mâles tétraploïdes (lot G3t3n) ou des mâles diploïdes sauvages (lot G3t2n).

Tableau 10 : Plan de croisement pour l'obtention des lots G3R

Mâle G0		2		9		15	
	Lot G2cR	*A2*	*G2*	*J2*	*O2*	*R2*	*W2*
2	*A2*			AJ2	AO2	AR2	AW2
	G2			GJ2	GO2	GR2	GW2
9	*J2*					JR2	JW2
	O2					OR2	OW2

Tableau 11 : Plan de croisement pour l'obtention des lots G3S

Mâle G0		4		7		14	
	Lot G2cS	*B2*	*D2*	*E2*	*L2*	*M2*	*P2*
4	*B2*			BE2	BL2	BM2	BP2
	D2			DE2	DL2	DM2	DP2
7	*E2*					EM2	EP2
	L2					LM2	LP2

Des croisement intra-lots (donc générant de la consanguinité) ont également été réalisés. Une moyenne de 12 mâles et 12 femelles a été utilisée pour chaque lot G2R, G2S, G2cR et G2cS, générant respectivement les lots consanguins G3cR, G3cS, G3c^{2}R et G3c^{2}S. Des huîtres sauvages ont été utilisées pour produire les lots témoins respectifs G3ct et G3c^{2}t.

4.2. Résultats des suivis sur estran

4.2.1. Survie et croissance

Les mortalités moyennes des lots G3 sont présentées dans le tableau 12. Sur le Site RA, la mortalité des lots G3R (27.1%) a été significativement plus faible que celle des lots G3S (72.5%), le témoin diploïdes étant intermédiaire avec 47,8%. La mortalité du lot triploïde G3R3n (35,5%) a été significativement inférieure à celle du lot G3S3n (58,2%) et à celle du témoin triploïde (50,4%).

Sur le Site de Ronce, la mortalité des lots G3c^{2}R (34.6%) a été significativement inférieure à celle des G3c^{2}S (73.1%). Ces deux valeurs sont significativement différentes du témoin diploïde (61,6%). Pour les lots G3c, les lots G3cR et G3ct ont montré des mortalités équivalentes d'environ 25% alors que les lots G3cS ont présenté des mortalités significativement supérieures (60,4%).

L'examen plus détaillé des mortalités des G3cR et G3cS montre que les lots issus du mâle 15 (G0), qui avait montré des faibles mortalités dans les générations précédentes, présentent cette fois une bonne survie que le témoin (G3ct) alors que l'inverse est observé pour les lots issus du mâle 7 (figure 5).

Les poids moyens individuels de chaque type de lot sont présentés dans le tableau 12. Aucune différence significative n'a été observée entre les lots à la sortie de nurserie ou à l'issue du suivi sur estran.

Tableau 12 : Mortalités moyennes (%) et poids individuels moyens (± écart-types) des lots G3.

Lot	Site de testage	Mortalité (%)	Poids individuels (g)
G3R	RA	27,1 ± 13,1	12,9 ± 1,4
G3S	RA	72,5 ± 13,4	14,7 ± 1,5
G3t2n	RA	47,8 ± 7,9	15,7 ± 8,0
G3t3n	RA	50,4 ± 6,1	18,2 ± 5,9
G3R3n	RA	35,6 ± 7,7	16,6 ± 5,5
G3S3n	RA	58,2 ± 4	19,4 ± 6,1
G3c^{2}R	Ronce	34,6 ± 25,9	10,0 ± 1,5
G3c^{2}S	Ronce	73,1 ± 18,5	10,2 ± 2,0
G3c^{2}t	Ronce	61,6 ± 16,0	8,3 ± 0,6
G3cR	Ronce	29,6 ± 7,7	6,9 ± 0,4
G3cS	Ronce	60,4 ± 10,7	7,1 ± 0,5
G3ct	Ronce	24,0 ± 5,2	8,3 ± 1,0

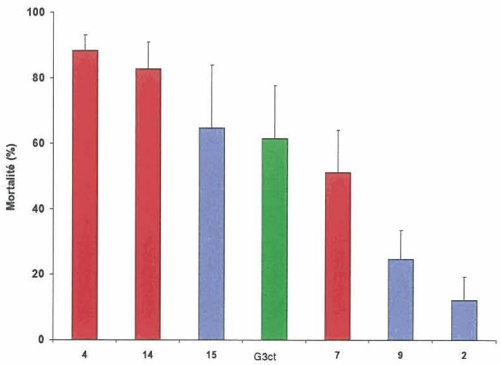

Figure 5. Moyennes par mâle de la génération «0» des mortalités des lots G3cR et G3cS

4.2.2. Paramètres génétiques

Pour les lots G3R et G3S, les pressions de sélection ont été respectivement de 17 et 30%. La réponse à la sélection a été de 21 et 25 % respectivement. Les estimations d'héritabilité et leur significativité sont présentées dans le tableau 13. Les valeurs sont élevées et significativement différentes de zéro. Les résultats sont similaires pour les lots G3c et G3c^2 (pour lesquels les analyses ont été réalisées conjointement).

Tableau 13 : Estimations d'héritabilité réalisée pour la survie du naissain estimée en troisième génération.

	site	R		S		R + S	
G3	RA	1.62 ± 0.58*	13	0.74 ± 0.09***	13	0.93 ± 0.07***	26
G2-IL	Ronce	0.21 ± 0.32	13	1.02 ± 0.45*	11	0.85 ± 0.14***	24
G3c + G3c2	Ronce	1.69 ± 0.91	24	0.43 ± 0.10***	24	0.70 ± 0.09***	48

5. Quatrième génération : Répétabilité de la réponse à la sélection

De manière à la troisième génération (2003), une nouvelle génération a été produite en 2005 et testée sur estran. Cette génération avait également pour but de « conserver » les lignées consanguines afin de pouvoir continuer de produire des lots R et S pour des expérimentations futures.

5.1. Production des lots G4

De manière similaire aux générations précédentes, 500 huîtres par lot G3c^2 ont été gardées hors de toute mortalité dans la nurserie de la Station de Bouin puis transférées sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron en Octobre 2003. Soixante huîtres par lot ont été conditionnées pour leur reproduction en mars 2005. Deux types de lots ont été produits. Les croisements inter-lignées G3c^2 ont générés des lots non consanguins G4R et G4S selon le schéma de croisement présenté dans les tableaux 14 et 15. Une moyenne de 10 males et 16 femelles ont été utilisées pour chaque lot parental et les croisements ont été réalisés dans les deux sens possibles (mâles x femelles et femelles x mâles). Contrairement aux générations précédentes, ces lots n'ont pas été produits séparément mais seulement en « pool ». De plus, les femelles R et les femelles S des lots G3c^2 ont été croisées avec des mâles tétraploïdes afin de générer des lots G4R3n, G4S3n. Des huîtres sauvages diploïdes ont été utilisées pour les témoins diploïdes (G4t2n) et triploïdes (G4t3n).

Tableau 14 : Plan de croisement pour l'obtention du pool G4R

			Mâle G0	9		15	
			Famille G1	F9-35	F9-36	F15-57	F15-58
			G2C1	J2	O2	R2	W2
Mâle G0	Famille G1	G2C1	G3C1	JJ2	OO2	RR2	WW2
2	F2-5	A2	AA2	AAJJ2	AAOO2	AARR2	AAWW2
	F2-8	C2	CC2	CCJJ2	CCOO2	CCRR2	CCWW2
9	F9-35	J2	JJ2			JJRR2	JJWW2
	F9-36	O2	OO2			OORR2	OOWW2

Tableau 15 : Plan de croisement pour l'obtention du pool G4S

			Mâle G0	7		14	
			Famille G1	F7-25	F7-26	F14-54	F14-54/F14-55
			G2C1	E2	L2	M2	P2
Mâle G0	Famille G1	G2C1	G3C1	EE2	LL2	MM2	PP2
4	F4-16/F4-15	B2	BB2	BBEE2	BBLL2	BBMM2	BBPP2
	F4-15/F4-16	Y2	YY2	YYEE2	YYLL2	YYMM2	YYPP2
7	F7-25	E2	EE2			EEMM2	EEPP2
	F7-26	L2	LL2			LLMM2	LLPP2

Une nouvelle génération de consanguinité (G4c) a également été réalisée par croisement intra-lots G3c^2 selon les tableaux 16 et 17.

Tableau 16 : Plan de croisement pour l'obtention des lots G4cR

				Mâles G0	2		9		15	
				Famille G1	F2-5	F2-8/F2-5	F9-35	F9-36	F15-57	F15-58
				G2c	A2	C2	J2	O2	R2	W2
			G3c[2]		Mâles					
Male G0	Famille G1	G2c			AA2	CC2	JJ2	OO2	RR2	WW2
2	F2-5	A2	Femelles	AA2	CR1	CR2				
	F2-8/F2-5	C2		CC2	CR3	CR4				
9	F9-35	J2		JJ2			CR5	CR6		
	F9-36	O2		OO2			CR7	CR8		
15	F15-57	R2		RR2					CR9	CR10
	F15-58	W2		WW2					CR11	CR12

Tableau 17 : Plan de croisement pour l'obtention des lots G4cS

				Mâles G0	4		7		14	
				Famille G1	F4-16/F4-15	F4-15/F4-16	F7-25	F7-26	F14-54	F14-54/F14-55
				G2c	B2	Y2	E2	L2	M2	P2
			G3c[2]		Mâles					
Mâle G0	Famille G1	G2c			BB2	YY2	EE2	LL2	MM2	PP2
4	F4-16/F4-15	B2	Femelles	BB2	CS1	CS2				
	F4-15/F4-16	Y2		YY2	CS3	CS4				
7	F7-25	E2		EE2			CS5	CS6		
	F7-26	L2		LL2			CS7	CS8		
14	F14-54	M2		MM2					CS9	CS10
	F14-54/F14-55	P2		PP2					CS11	CS12

5.2. Suivi des lots G4

Les lot G4 non consanguins ont été suivis sur le site de Fort Espagnol suivant la procédure habituelle (3 demi poche par lot). Les résultats de survie (du 5/07 au 16/11/2005) et les poids individuels moyens sont présentés dans le tableau 18. Comme pour les générations précédentes, le naissain « R » présente des mortalités nettement inférieures au naissain « S », le témoin étant intermédiaire. Contrairement aux résultats obtenus en G3, aucune différence n'apparaît entre les lots triploïdes, qui présentent très peu de mortalité.

Tableau 17 : Mortalité et poids moyens individuels des lots G4 suivis à RA

Lot	Mortalité ± écart type (%)	Poids individuel moyen (g)
G4R	18,5 ± 17,2	12,6
G4S	70,2 ± 4,0	16,6
G4t2n	57,8 ± 10,4	15,1
G4R3n	5,2 ± 3,3	14,9
G4S3n	9,0 ± 2,3	15,9
G4t3n	3,8 ± 2,0	15,4

Les lots G4c ont été suivis à Ronce du 6 juillet au 4 octobre 2005. La figure 6 présente les mortalités moyennes par lot. La moyenne des mortalités des G4cR a été de 8% contre 42% pour les G4cS et 24% pour le témoin. De manière similaire à ce qui avait été observé dans la G3c, on remarque que les lots CS5, CS8 et CS7, issus du mâle 7 de la G0 présent les meilleures survies parmi les lots G4cS. Au contraire, les lots CR11, CR12 et CR7, issus du mâle 15, présentent les moins bonnes survies parmi les lots G4cR.

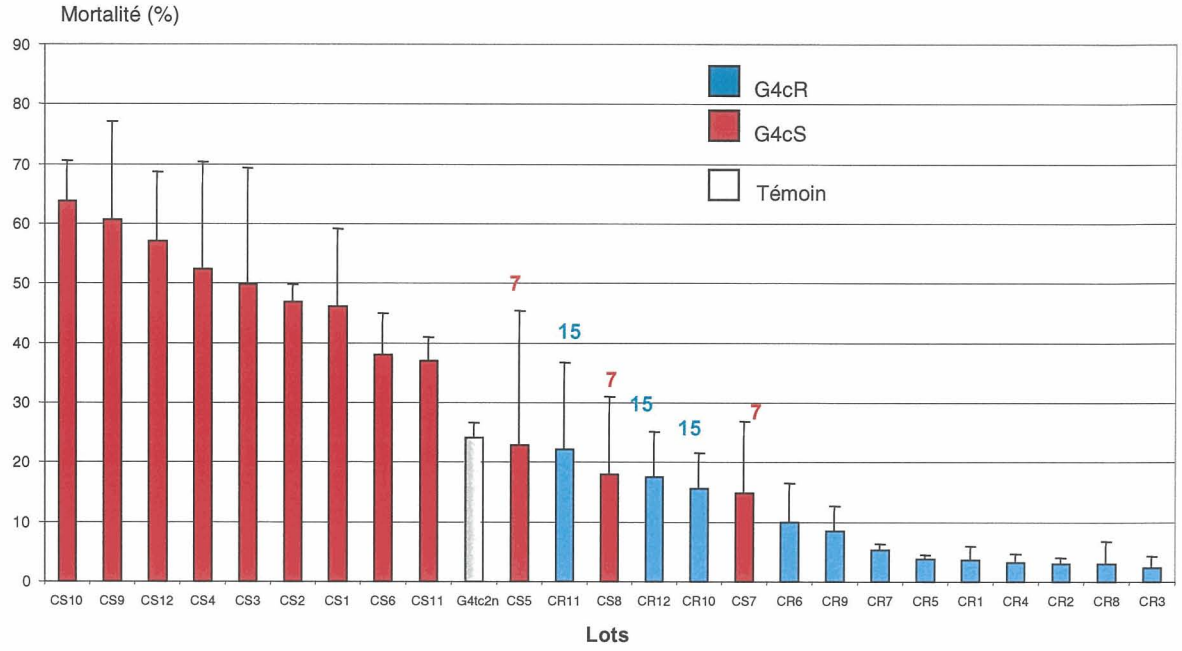

Figure 6 : Mortalités moyennes et écarts types des G4cR et G4cS avec mention des lots issus des mâles G0 7 et 15

6. Etude des performances de survie en seconde période estivale sur estran

Des expérimentations ont été réalisées afin de déterminer si les différences de survies au cours de la première période estivale, observées entre les différents lots, se maintenaient au cours de la seconde période estivale. En d'autre terme, est-ce que les lots qui présentent de faibles mortalités au cours du premier été présentent également de bonnes performances durant de second, ou, au contraire, reportent le phénomène de mortalité d'une année à l'autre.

Afin de répondre à ces interrogations, deux types de suivis ont été réalisés :

- le suivi, en seconde année, d'huîtres ayant été testées sur estran durant leur première période estivale (Type 1 dans le tableau 18)
- le suivi, en seconde année, d'huîtres maintenues dans la nurserie à Bouin et n'ayant pas subies de mortalité durant la première période estivale (Type 2 dans le tableau 18).

Le tableau 18 résume l'ensemble des suivis qui ont été réalisés de 2001 à 2004 sur les générations G1 (uniquement les familles extrêmes sélectionnées pour produire la G2), G2 et G3.

Tableau 18 : Ensemble des suivis réalisés pour l'étude de la survie lors du deuxième été

Type d'expérience	Génération	Lots étudiées	Site	Mise sur site	Fin de suivi
1	G1	R-S	RA	Juin à août 2001	Octobre 2001 et 2002
1	G1	R	BDV	Juin à août 2001	Octobre 2001 et 2002
1	G1	R	Ronce	Juin à août 2001	Octobre 2001 et 2002
1	G2	R-S	RA	Juillet 2002	Octobre 2002 et 2003
1	G3	R-S	RA	Juin 2003	Octobre 2003
1	G3	R-S	BDV	Juin 2003	Octobre 2003 et 2004
2	G1	R-S	RA	Mars 2002	Octobre 2002
2	G2	R-S	RA	Mars 2003	Octobre 2003
2	G3	R-S	RA	Mars 2004	Octobre 2004
2	G3	R-S	BDV	Mars 2004	Octobre 2004

6.1. Survie des lots ayant passé deux étés sur estran.

Du fait des mortalités importantes observées sur certaines familles G1 au cours de leur premier été à Ronce et à RA, les suivis durant deux étés successifs n'ont pu être réalisés sur les familles sélectionnées pour produire les G2S que dans le site de BDV. Les familles « R » de la G1 suivies deux étés successifs ont montré de faibles mortalités à Ronce (4,0±3,6% en 2001, 4,7±1,9% en 2002) et à RA (6,7±3.9% en 2001, 8,0±3,4% en 2002). Pour ces deux sites, la différence de mortalité entre premier et second été n'est pas significative. En BDV, cette différence est significative, avec 3,3±2,1 % en 2001 et 23,9±10,3% en 2002.

La survie moyenne de familles R et S, groupées en « pools », a été suivie en RA sur 2 étés sur 3 générations. Comme présenté précédemment, la mortalité au cours du premier été a été de 7, 6 et 38% pour le groupe R et de 52, 48 et 83 % pour le groupe S en G1, G2 et G3 respectivement. En seconde année, les mortalités ont été faibles (6 à 8%) et non significativement différentes entre les deux groupes.

Les groupes R et S de la G3 ont également été suivis deux été successifs en BDV. La situation y est différente : les mortalités ont été faibles au cours du premier été (2% pour les R, 6 % pour les S) mais plus fortes le second (20% pour les R, 42 % pour les S). Ces différences entre groupes sont significatives pour les deux années.

6.2. Survie des lots ayant passé le premier été en nurserie et le second sur estran.

Des groupes de familles R et S de la G1, G2 et G3 ont été préservés des mortalités estivales en premier été en nurserie à Bouin, puis testés sur site à RA et BDV.

Pour ce qui concerne les G1 et G2 testés en seconde année sur le site RA, les mortalités ont été faibles pour le groupe R (G1 : 4% en 2002 ; G2 : 6% en 2003) et un peu plus fortes pour le groupe S (G1 : 14% en 2002 ; G2 : 14% en 2003). Ces différences entre R et S sont significatives pour les deux générations.

Les groupes R et S de la G3 ont été testés en seconde année (2004) à RA et en BDV. Les mortalités à RA ont été similaires pour les deux groupes (R : 22%, S : 27%). Elles sont par contre significativement différentes en BDV (R : 12%, S : 33%).

7. Etude des performances de survie du naissain au laboratoire et corrélations avec les données obtenues sur estran.

En complément des suivis sur estran, plusieurs suivis ont été réalisés au laboratoire (bassins extérieurs et raceways intérieurs). Ceux-ci avaient initialement pour principal objectif d'identifier de manière précoce (c.a.d. avant les périodes de mortalité sur estran) des lots présentant des performances contrastées. L'ensemble des suivis réalisés est présenté dans le tableau 19. Pour les expériences L1 et L8 des chocs chaud (2h à 40°C en étuve) ont été appliqués aux huîtres. Pour les expériences L3 et L4, contrairement à toutes les autres, le naissain a séjourné sur estran à Ronce entre la période de nursage à Bouin et les suivis en laboratoire.

Les corrélations entre la survie au cours de ces suivis au laboratoire et les survies sur estran ont pu être examinées à partir des données présentées précédemment.

Tableau 19 : Ensemble des suivis réalisés pour l'étude de la survie en laboratoire

lots	Expérience	Croisement	Transfert en nurserie (Bouin)	Transfert sur estran	Début du suivi au laboratoire	Fin du suivi au laboratoire	Nombre de lots R testés	Nombre de lots S testés	Nombre de témoins 2n testés	Nombre de témoins 3n testés
G2	L1	18/03	2/04	/	13/06	2/07	9	9	4	1
G2	L2	18/03	2/04	/	4/07	5/08	6	5	4	1
G2	L3	18/03	2/04	11/07	22/08	4/09	11	11	4	
G2c	L4	29/04	18/06	8/08	4 /09	17/09	10	8	3	
G3	L5	17/02	10/04	/	25/06	4/09	12	12	1	3
G3c²	L6	24/03	15/05	/	9/07	04/09	12	11	1	
G3c	L7	28/04	11/06	/	24/07	04/09	12	12	1	
G4c	L8			/	19/07	20/09	3	3	1	

7.1. Résultats des suivis en laboratoire

Dans l'expérience L1, menée sur du naissain de 3 mois des lots G2R et G2S, le choc thermique a été appliqué une semaine après le début du suivi et a induit des premières mortalités dès le jour suivant, se concentrant sur une durée de moins d'une semaine. Après 2 semaines, les mortalités moyenne des lots étaient de 17 à 34% pour les lots R, 23 à 70% pour les lots S,14 à 50% pour les lots témoins diploïdes et 44% pour le témoin triploïde. Les différences observées entre R, S et témoins sont significatives.

Dans l'expérience L2, les premières mortalités sont apparues 10 jours après le début du suivi (sans qu'un choc thermique ne soit réalisé). La moyenne des mortalités des lots R a été de 18%, celle des lots S de 49%, les témoins diploïdes et triploïdes étant intermédiaires avec 44 et 20% respectivement. Les survies des lots G2R et G2t3n sont significativement différentes de celle des lots G2S et G2t2n.

Dans l'expérience L3, les huîtres ont séjournées durant 6 semaines sur estran avant d'être amenées au laboratoire. Durant cette période sur estran les mortalités ont été relativement faibles et pas significativement différentes entre groupes (R : 3%, S : 12 %, témoin 2n : 1%). Les mortalités ont commencé 4 jours après transfert au laboratoire et ont atteint 26% en moyenne pour les R, 53% pour les S et 25% pour le témoin 2n. L'expérience L4 a donné des résultats similaires, cette fois sur la G2c, présentés en figure 7.

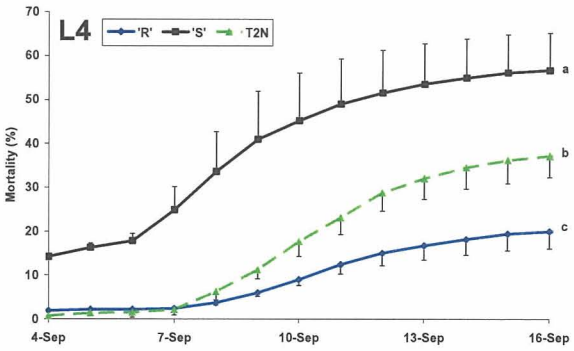

Figure 7 : Mortalités cumulées au cours de l'expérience L4 de suivi des mortalités en laboratoire des lots G2.

Ces expérimentations se sont poursuivies en 2003 sur les lots G3, G3c et G3c².

Dans l'expérience L5, le naissain G3 âgé de 4 mois a été testé en laboratoire à partir du 25 juin. Les mortalités ont eu lieu durant une semaine à partir du 23 août. Les mortalités des lots R ont

variées de 19 à 42%, celles de lots S de 42 à 67% (témoin 2n : 52%). Les expérience L6 et L7 ont présenté des résultats similaires. Les différences entre lots R et S étant toujours significatives.

Enfin en 2005, 3 lots R et 3 lots S de la G4c ont été testés en laboratoire à partir du 22 juillet avec un choc thermique. Cette fois, les mortalités n'ont pas dépassée 10,5% et aucune différence significative entre groupe n'a été observée.

7.2. Comparaisons entre les mortalités sur estran et au laboratoire

Les mortalités des lots testés dans les expériences en laboratoire L1 à L8 ont été corrélées à celle observées sur estran.

En 2002, les données de mortalités observées sur un total de 23 lots de l'expérience L1 donnent une corrélation presque significative ($r = 0.43$, $p = 0.06$) avec les données de mortalité à RA. Les données des deux autres sites de suivi sur estran ne sont pas significativement corrélées. Les résultats sont similaires pour l'expérience L2, pour laquelle la corrélation avec les données de mortalité à RA sont cette fois significatives ($r = 0,58$, $p = 0,02$) et pour L3 ou les corrélations sont significatives pour RA ($r = 0.63$, $p < 0.01$) et Ronce ($r = 0.47$, $p = 0.01$). Les données de l'expérience L4 (G2c) peuvent être comparées aux mortalités de ces mêmes lots (uniquement) à Ronce. La corrélation est très bonne et hautement significative ($r=0.94$, $p<0.0001$).

En 2003, toutes les corrélations entre mortalité au laboratoire et sur estran sont significatives :

- L5 / Ra (G3) : $r = 0,85$, $p < 0,0001$
- L6 / Ronce ($G3c^2$) : $r = 0.84$, $p < 0.0001$ (figure 8)
- L7 / Ronce (G3c) : $r = 0,94$, $p <0.0001$

En 2005, l'expérience L8 n'ayant pas été discriminante, aucune corrélation significative n'est observée avec les mortalités des G4c à Ronce.

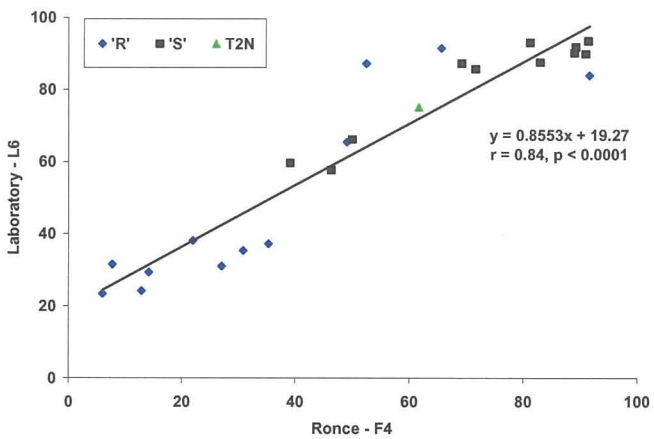

Figure 8 : Corrélation entre les mortalités cumulées au cours de l'expérience L4 et les mortalités à Ronce sur estran des lots $G3c^2$.

8. Discussion et perspectives

L'ensemble des résultats obtenus supporte l'hypothèse de l'existence d'une base génétique importante aux variations observées pour la résistance aux mortalités estivales : 46% de la variabilité totale observée dans la G1 (Dégremont et al., 2005). Les résultats obtenus dans le cadre du programme de sélection « MBP » sont très semblables (Evans & Langdon, pers. com.). Nos estimations de l'héritabilité du caractère obtenues en G1, les estimations d'héritabilité réalisée pour améliorer ou, au contraire, diminuer la survie estivale du naissain sont le plus souvent très élevées. Ces résultats peuvent apparaître surprenants, les caractères fortement liés à la fitness présentant généralement une héritabilité faible ou nulle. La répétition en G3 et G4 des résultats obtenus en G2 pour la réponse à la sélection et la cohérence de nos résultats (entre sites, entre années, entre lots consanguins ou non consanguins et entre niveaux de ploïdie) sont cependant à souligner. Ces résultats corroborent ceux précédemment observés aux USA (Beattie et al., 1980 ; Hershberger et al., 1984) et en France (Ernande et al., 2004). La plus forte héritabilité du caractère dans nos expérimentations par rapport à ces travaux peut être liée au fait que ceux-ci concernent des huîtres plus âgées (un an est plus). Si des mortalités ont lieu avant la période de mesure du caractère (ce qui est souvent le cas) et qu'il existe une base génétique à ces mortalités, la conséquence est une perte de la diversité génétique (par effet de la sélection) et donc des estimations d'héritabilité plus faibles. De plus, les conditions d'élevage n'étant jamais strictement homogènes entre les individus, plus le caractère est étudié tardivement, plus il peut être affecté par ces variations, sous estimant ainsi sa base génétique. Dans nos résultats, la survie au cours du second été apparaît plus forte qu'en premier été, sauf sur le site de BDV. Dans ce site, la réponse, en second été, à la sélection sur la survie en premier été apparaît assez bonne, confirmant une corrélation positive entre ces deux caractères.

La variabilité génétique, mise en évidence en G1 et sélectionnée dans les générations suivantes, apparaît nettement additive. Ainsi, la réponse à la sélection pour augmenter la survie est très semblable à celle pour la diminuer. De plus, les écarts de mortalité observées en 2003 entre les lots G3S3n, G3R3n et G3t3n apparaissent plus réduits qu'entre les lots diploïdes correspondant. En effet la nature «R» ou «S» de ces lots ne porte que sur un tiers de leur patrimoine génétique (les deux tiers étant approtés par le mâle tétraploïde). Il faut cependant remarquer que ces résultats n'ont pas été reproduits en 2005. D'autre part, la consanguinité ne semble pas affecter de manière significative la survie du naissain aux mortalités estivales. Les suivis de lots consanguins et non consanguins effectués à Ronce en G2 montrent des mortalités similaires (tableau 8). Ces résultats sont en concordance avec ceux publiés par Evans et al. (2004), qui montrent que la survie au stade adulte est relativement peu affectée par un niveau de consanguinité modéré. En G3 les comparaisons sont moins directes car les lots consanguins ont été testés à Ronce et les non consanguins à RA), mais les lots G3R et G3S ont dés mortalités similaires aux lots G3c^{2}R et G3c^{2}S (alors que les mortalités des témoins diploïdes sauvages étant de 48% à RA et 62% à Ronce). On peut cependant remarquer que les lots consanguins G2cR et G3cR présentent des mortalités non significativement supérieures aux témoins (G2ct et G3ct respectivement) non sélectionnés mais non consanguins. Ces résultats pourraient être interprétés comme le masquage de la réponse à la sélection (observée dans les lots R et S non consanguins) par une « légère » dépression de consanguinité.

8.1. Base génétique ou transmission verticale d'un agent pathogène ?

L'hypothèse d'un transmission verticale d'un agent pathogène été évoquée comme explication alternative aux résultats obtenus dans le cadre de nos expérimentions, biaisant l'interprétation génétique de nos résultats. L'ensemble de données présentées ici montre clairement la nature quantitative de la variabilité observée pour le caractère étudié. L'hypothèse d'une transmission d'un agent pathogène supposerait donc que l'effet de cet agent se transmet d'une génération à l'autre de manière aussi quantitative que les (supposés) gènes impliqués dans la variabilité (présumée) génétique observée, impliquant donc une composante horizontale faible à nulle de la transmission de cet agent et la transmission réellement quantitative du niveau de portage et de l'expression de la maladie d'une génération à l'autre. Cette expression devrait être à la fois fortement modulée par l'environnement (le niveau de mortalité des lots « S » étant variable d'un site à l'autre) mais parfois très bien corrélée entre expériences en milieu relativement confiné au laboratoire et sur estran. Ces hypothèses nous apparaissent peu vraisemblables à ce stade. Ceci n'exclut en rien l'implication

d'agents pathogènes dans les facteurs impliqués dans les mortalités estivales, mais ne permet pas d'expliquer les variations de résistance/sensibilité aux mortalités estivales du naissain observées dans nos expérimentions. L'hypothèse d'une variabilité d'origine génétique reste donc privilégiée pour l'interprétation de nos résultats.

8.2. Pourquoi une telle variabilité génétique pour la résistance aux mortalités estivales dans les populations naturelles ?

Parmi les différents facteurs permettant le maintien de variabilité génétique pour des caractères directement à la fitness, nous favorisons celle proposée par Ernande et al. (2004) : l'existence « trade-offs » (effets de compensation) entre la survie et la reproduction. L'absence de réponse corrélative entre survie et croissance observée dans nos expérimentations et les études de la reproduction entre lots R et S (voir thème 5b) supportent cette hypothèse. L'investissement dans la reproduction est connu pour être très important chez l'huître adulte mais l'effort de reproduction chez le naissain a été moins étudié. De plus, la bonne résistance des triploïdes aux mortalités estivales vient également conforter cette hypothèse. Cette hypothèse ne sous-entend pas forcément un lien physiologique direct entre coût de la reproduction et survie, l'intervention d'agents pathogènes comme agent causal des mortalités restant (évidemment) possible.

La résistance aux mortalités estivales n'en reste pas moins un caractère très plastique car très dépendant des conditions environnementales qui induisent (ou non) les mortalités. Cette importance de l'environnement sur l'expression du caractère peut contribuer au maintien de variabilité génétique du fait des variations, dans l'espace et dans le temps, des pressions de sélection. De plus, le signe des corrélations génétiques entre survie et effort de reproduction apparaissent variables en fonction des conditions environnementales (Ernande et al., 2004).

Une autre hypothèse qui viendrait renforcer l'importance des conditions environnementales dans l'expression de la variabilité génétique est liée aux conditions de production du naissain dans nos expérimentations. Dans la très grande majorité des cas, les lots ont été produits en fin d'hiver ou au printemps, c'est-à-dire plus tôt que dans le cycle naturel de reproduction de l'espèce en France (juillet – août). Ce décalage du cycle de vie « expose » du naissain de quelques mois à des conditions environnementales propices à la gamétogenèse alors que dans un cycle naturel, le naissain ne rencontre ces conditions qu'après un an. Ceci pourrait expliquer que notre cycle d'élevage d'écloserie révèlerait une variabilité génétique qui serait beaucoup plus neutre dans les populations suivant le cycle naturel de reproduction. Cette hypothèse n'est pas supportée par les données obtenues en 2005 à partir de lots R et S produits durant l'été 2004 à l'écloserie d'Argenton, nursés à Bouin de manière extensive puis testés sur estran à RA en 2005. En effet, même dans un cycle de production le plus proche possible du cycle naturel, le pool S a montré des mortalités deux fois supérieures au pool R (30,5% contre 60,8% au 20 juin 2005).

8.3. Perspectives

Les perspectives liées aux résultats présentés ici sont nombreuses. La caractérisation phénotypique des huîtres R et S (en terme de reproduction, bilan énergétique, capacités de défense, réponse au stress et aux agents pathogènes, aneuploïdie, expression de gènes...) est présentée dans la synthèse du thème 5b.

Une des retombées directe du travail présenté ici sera la mise en place en France d'un programme collectif de sélection. Ce programme, discuté avec de nombreux acteurs de la filière de production ostréicole (ou leurs représentants), est présenté dans le document joint « Gigas+ : Amélioration de la survie estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* par la sélection ». L'objectif principal de ce programme sera d'améliorer la survie mais d'autres caractères seront également suivis (croissance, morphologie).

D'autre part, la recherche de marqueurs génétiques liés à la résistance aux mortalités estivales du naissain par approche QTL (Quantitative trait Loci) a été initiée dès l'été 2004 par la production de familles F1 « hybrides » entre lots R et S. Les familles F2 seront produites et testée sur estran en 2006. La carte génétique publiée par Hubert et Hedgecock (2004) servira de base à cette recherche de QTL et cette carte sera enrichie par des SNP (Single Nuclotide Polymorphism) et des AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism). Ces travaux sont réalisés dans le cadre du projet européen « Aquafirst » et constituent le sujet de thèse de Christopher Sauvage.

9. Bibliographie

Beattie, J., Chew, K. & Hershberger, W., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific Oysters (Crassostrea gigas) during summer mortality. Proc. Nat. Shellfish. Ass., 70, 184-189.

CSIRO, 2002. Australians select best Pacifics collaborative breeding programme. Fish Farming International, 29(10), 34-35.

Dégremont, L., 2003. Etude des bases génétiques des mortalités estivales et relatoin avec la croissance chez les juvéniles de Crassostrea gigas. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen, France. 333 pp.

Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.P. & Boudry, P., 2005. Relative importance of family, site and field placement timing on survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). Aquaculture 249, 213-229.

Ernande, B., 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle : 274 p.

Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., & Haure, J. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. I. Spatial variation in food abundance. J. Evol. Biol., 16, 399-414.

Evans, F., Matson, S., Brake, J., & Langdon, C. 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (Crassostrea gigas). Aquaculture 230, 89-98.

Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition, Harlow, England, Longman (Ed.), XV. 464 p.

Fleury, P.G., Cornette, F., Claude, S., Palvadeau, H., Robert, S., D'Amico, F., Le Gall, P. & Vercelli, C., 2001. REMORA, Résultats des stations nationales : année 2000. Rapport interne Ifremer, DRV/RA/RST/01-02. 48 p.

Gosling, E., 2003. Genetics in aquaculture. In : Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books, Oxford, Blackwell, pp 333-369.

Gjedrem, T., 1985. Improvement of productivity through breeding schemes. *Geojournal,* 10, 233-241.

Hershberger, W.K., Perdue, J.A. & Beattie, J.H., 1984. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. Aquaculture, 39, 237-245.

Hubert, S. & Hedgecock, D. 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster Crassostrea gigas. Genetics 168, 351-362.

Langdon, C., Evans, F., Jacobson, D. & Blouin, M., 2003. Yields of cultured Pacific oysters Crassostrea gigas Thunberg improved after one generation of selection. Aquaculture, 220, 227-244.

Lymbery, A., 2000. Genetic improvement in the Australian aquaculture industry. Aquacult. Res., 31,145-149.

Mahon, G.A.T., 1983. Selection goals in oyster breeding. Aquaculture, 33, 141-148.

Nell, J. A., 2002. Farming Triploid Oysters. Aquaculture 210, 69-88.

Nell, J.A., Sheridan, A.K. & Smith, I. R., 1996. Progress in a Sydney rock oyster, Saccostrea commercialis (Iredale and Roughley), breeding program. Aquaculture, 144, 295-302.

Nell, J.A., Smith, I. R. & Sheridan, A.K., 1999. Third generation evaluation of Sydney rock oyster Saccostrea commercialis (Iredale and Roughley) breeding lines. Aquaculture, 170, 195-203.

Pajot, R., Hennequart, F., Trintignac, P. & Glize, P., 1998. Etude de familles de naissains pour la compréhension de mortalités « anormales » chez l'huître creuse Crassostrea gigas. Rapport SMIDAP, Nantes, France : 36 p.

Toro, J.E. & Newkirk, G.F., 1990. Divergent selection for growth rate in the European oyster Ostrea edulis: response to selection and estimation of genetic parameters. Mar. Ecol. Prog. Ser., 62, 219-227.

10. Annexe : Liste récapitulative des lots étudiés

Intitulé	année de production	Origine	Ploïdie	Descriptif
G0	/	captage naturel de Seudre	2n	Huîtres sauvages utilisées comme parents pour la production de G1
G1	2001	G0 x G0	2n	3 séries de 24 familles bi parentales dont un total de 44 ont été testées
pool G1	2001	G0 x G0	2n	mélange des 24 familles bi-parentales G1 pour chaque série
G2R	2002	G1 x G1	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements inter-familles G1 sélectionnées pour leur résistance
G2S	2002	G1 x G1	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements intra-familles G1 sélectionnées pour leur sensibilité
G2t2n	2002	pool G1 x pool G1	2n	témoin diploïde
G2t3n	2002	Pool G1 x mâles 4n	3n	témoin triploïde
G2cR	2002	G1 x G1	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements inter-familles G1 sélectionnées pour leur résistance
G2cS	2002	G1 x G1	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements intra-familles G1 sélectionnées pour leur sensibilité
G3R	2003	G2cR x G2cR	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements inter-familles G2cR
G3S	2003	G2cS x G2cS	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements inter-familles G2cS
G3cR	2003	G2R x G2R	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements intra-familles G2R
G3cS	2003	G2S x G2S	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements intra-familles G2S
G3R3n	2003	G2R x mâles 4n	3n	Pool issu du croisement entre des femelles G2R et des mâles tétraploïdes
G3S3n	2003	G2S x mâles 4n	3n	Pool issu du croisement entre des femelles G2S et des mâles tétraploïdes
G3t3n	2003	sauvages x mâles 4n	3n	pool issu du croisement entre des femelles sauvages et des mâles tétraploïdes
$G3c^2R$	2003	G2cR x G2cR	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements intra-familles G2cR
$G3c^2S$	2003	G2cS x G2cS	2n	12 familles consanguines multi-parentales issue de croisements intra-familles G2cS
G3ct	2003	sauvages x sauvages	2n	témoin diploïde issu de la reproduction d'huîtres sauvages
$G3c^2t$	2003	sauvages x 4n	3n	témoin diploïde issu du croisement d'huîtres sauvages avec des huîtres tétraploïdes
G4R	2005	$G3c^2R$ x $G3c^2R$	2n	pool de familles multi-parentales issue de croisements inter familles G3c2R
G4S	2005	$G3c^2$ S x $G3c^2S$	2n	pool de familles multi-parentales issue de croisements inter familles G3c2S
G4R3n	2005	$G3c^2R$ x mâles 4n	3n	pool issu du croisement entre des femelles G3c2R et des mâles tétraploïdes
G4S3n	2005	$G3c^2S$ x mâles 4n	3n	pool issu du croisement entre des femelles G3c2S et des mâles tétraploïdes
G4t2n	2005	sauvages x sauvages	2n	témoin diploïde issu de la reproduction d'huîtres sauvages
G4t3n	2005	sauvages x 4n	3n	témoin diploïde issu du croisement d'huîtres sauvages avec des huîtres tétraploïdes
G4cR	2005	$G3c^2R$ x $G3c^2R$	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements intra-familles G3c2R
G4cS	2005	$G3c^2S$ x $G3c^2S$	2n	12 familles multi-parentales issue de croisements intra-familles G3c2S

Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53