

Double résistance aux infections dues aux organismes pathogènes *Vibrio aestuarianus* et OsHV-1 chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* – DORE



**Double résistance aux infections dues
aux organismes pathogènes *Vibrio
aestuarianus* et OsHV-1 chez l’huître
creuse *Crassostrea gigas* – DORE**

**Rapport scientifique final de l’étude DORE,
convention DPMA-Ifremer 2016**

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Sylvie Lapègue Adresse électronique : sylvie.lapegue@ifremer.fr		date de publication : 2017 nombre de pages : 70 bibliographie : oui illustration(s) : 35 figures et 23 tableaux langue du rapport : français
Titre de l'article		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal(aux) : Lionel DEGREMONT Elise MAUROUARD Yohann GODFRIN Marie-Agnès TRAVERS Benjamin MORGA Jean-Baptiste LAMY Abdellah BENABDELMOUNA	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins	
Contributeur(s) : Jean-Christophe BILLY Christophe LEDU Pascal PHELIPOT Stéphane BODIN Delphine TOURBIEZ Pascal PHELIPOT	Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins	
Encadrement(s) :		
Cadre de la recherche : Action : A070226 – DORE		
Destinataire : DPMA, Ifremer		



sommaire

Résumé

Depuis 2012, le nombre de cas de mortalités d'huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*) rapportés dans le cadre des réseaux de surveillance de l'Ifremer, et dans lesquels la bactérie *Vibrio aestuarianus* a été isolée, a fortement augmenté.

Les objectifs de cette étude étaient (1) d'étudier la sensibilité des huîtres *C. gigas* à une infection à *V. aestuarianus* pour des lots diploïdes et triploïdes et (2) déterminer la réponse à la sélection pour une meilleure résistance à *V. aestuarianus* pour des huîtres *C. gigas*.

Neuf stocks ont été utilisés, répartis en trois niveaux de sélection, chacun étant donc répliqué par trois pontes. Pour chaque stock, un lot diploïde (2n), un lot triploïde (3n_chim) produit par la rétention d'un globule polaire, et trois lots triploïdes (3n_nat) produits par croisements à partir de trois stocks d'huîtres tétraploïdes (4n) ont été produits en février 2015. Ces lots ont été testés à partir de juin 2015 sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron où *V. aestuarianus* et OsHV-1 sont régulièrement détectés. Ces animaux ont également été testés expérimentalement en laboratoire pour tester leur sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* en 2016.

La comparaison de la sensibilité des huîtres 2n et 3n_chim a permis de vérifier que **les huîtres diploïdes et triploïdes présentaient une sensibilité similaire à l'infection par OsHV-1. Les animaux survivants ont cependant montré une plus grande sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* pour des huîtres triploïdes**, même si les deux niveaux de ploïdies connaissent des mortalités importantes dans les conditions de testages en laboratoire.

L'importance du fond génétique pour la résistance à chaque agent pathogène a été confirmée pour des huîtres 2n, mais aussi pour la première fois pour *V. aestuarianus* chez des huîtres 4n. Ainsi, les huîtres triploïdes produites à partir du stock 4nC ont présenté des mortalités significativement plus faibles par OsHV-1 et des temps de survies plus importants pour *V. aestuarianus* que celles produites à partir des deux autres stocks 4n.

Concernant la sélection pour l'amélioration de la résistance à *V. aestuarianus* chez des huîtres diploïdes, les animaux survivants à des infections expérimentales ont été reproduits avec succès en 2016, et l'évaluation de la réponse à la sélection est en cours. Il faudra attendre la fin 2017 pour acquérir les derniers résultats.

Les nombreux testages récents visant à l'obtention d'huîtres sélectionnées pour une double résistance à OsHV-1 et *V. aestuarianus* ont montré que certaines familles présentaient cette caractéristique. Ces familles sont toujours en cours d'évaluation, et la prochaine étape consistera à les reproduire pour confirmer leur potentiel de résistance.

Mots-clés - *Vibrio aestuarianus*, OsHV-1, sélection, résistance, triploïdes, huître creuse, *Crassostrea gigas*,

Words keys - *Vibrio aestuarianus*, OsHV-1, selective breeding, disease resistance Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, , triploids



Sommaire

Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
1. Introduction.....	13
1.1. Contexte	13
1.2. Objectifs.....	14
2. Matériels et méthodes	15
2.1. Rôle de la ploïdie chez <i>C. gigas</i> dans la sensibilité aux infections à <i>V. aestuarianus</i> et à OsHV-1	15
2.1.1. Stocks utilisés.....	15
2.1.2. Production	15
2.1.3. Vérification du niveau de la ploïdie	17
2.1.4. Testage	18
2.1.4.1. Testage en mer.....	18
2.1.4.2. Infection expérimentale par <i>V. aestuarianus</i>	18
2.1.4.3. Testage en laboratoire.....	19
2.1.4.4. Prélèvements	19
2.1.4.5. Recherche d'agents infectieux.....	20
2.1.4.6. Statistiques	20
2.2. Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance aux infections dues à <i>V. aestuarianus</i> et OsHV1	20
2.2.1. Huîtres survivantes à une triple exposition à <i>V. aestuarianus</i> pour deux stocks présentant chacun des niveaux de résistance contrastés à une infection à OsHV-1	21
2.2.2. Vers l'obtention de lignées d'huîtres présentant une double résistance accrue aux infections par OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	22
2.2.3. Analyses transcriptomiques lors d'une infection expérimentales par <i>V. aestuarianus</i> 23	
3. Résultats – Objectif 1 : Rôle de la ploïdie chez <i>C. gigas</i> dans la sensibilité aux infections à <i>V. aestuarianus</i> et à OsHV-1	24
3.1. Vérification du niveau de la ploïdie.....	24
3.2. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en mer	24
3.2.1. Testage en 2015	24
3.2.2. Testage en 2016	27
3.2.2.1. Comparaison entre les 5 groupes.....	27
3.2.2.2. Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) 28	
3.2.2.3. Recherche d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	29
3.2.3. Testage sur le cycle d'élevage 2015/2016.....	29
3.2.3.1. Mortalités cumulées de juin 2015 à septembre 2016	29
3.2.3.2. Poids individuel en septembre 2016	31
3.2.3.3. Rendement d'élevage en septembre 2016	33
3.3. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en infection expérimentale par <i>V. aestuarianus</i>	35
3.3.1. Mortalités.....	35
3.3.1.1. Comparaison entre les 5 groupes.....	35
3.3.1.2. Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) 36	
3.3.1.3. Comparaison entre les stocks	37
3.3.2. Recherche d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	37
3.4. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en laboratoire.	39
3.4.1. Testage 1 : Origine Agnas d'octobre 2015 à septembre 2016	39
3.4.1.1. Mortalités	39
3.4.1.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	41
3.4.2. Testage 2 : Origine La Guillotine d'octobre 2015 à septembre 2016	42
3.4.2.1. Mortalités	42



sommaire

3.4.2.2.	Recherche d'ADN d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	44
3.4.3.	Testage 3 : Origine Agnas de juin 2016 à octobre 2016.....	44
3.4.3.1.	Mortalités	44
3.4.3.2.	Recherche d'ADN d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	47
3.4.4.	Testage 4 : Origine La Guillotine de septembre 2016 à février 2017	47
3.4.4.1.	Mortalités	47
3.4.4.2.	Recherche d'ADN d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	49
3.4.5.	Testage 5 : Origine Agnas de septembre 2016 à février 2017	50
3.4.5.1.	Mortalités	50
3.4.5.2.	Recherche d'ADN d'OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	52
3.5.	Analyse globale de la sensibilité à l'infection à <i>V. aestuarianus</i> des lots diploïdes et triploïdes en infection expérimentale et des testages en laboratoire.....	53
3.5.1.	Comparaison entre les 5 groupes	53
3.5.2.	Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique).....	55
3.5.3.	Comparaison entre les stocks.....	55

4. Résultats – Objectif n°2 : Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à une infection à *V. aestuarianus* 57

4.1.	Huîtres survivantes à une triple exposition à <i>V. aestuarianus</i> pour deux stocks présentant chacun des niveaux contrastés de résistance à une infection à OsHV-1.....	57
4.1.1.	Testage en mer	57
4.1.2.	Testage en laboratoire	57
4.2.	Vers l'obtention de lignées d'huîtres présentant une double résistance accrue aux infections par OsHV-1 et <i>V. aestuarianus</i>	58
4.2.1.	Testage en mer	58
4.2.2.	Testage en laboratoire	58
4.2.2.1.	Série C2	58
4.2.2.2.	Série P	58
4.3.	Analyses transcriptomiques lors d'une infection expérimentale par <i>V. aestuarianus</i>	59

5. Discussion 61

5.1.	Objectif 1 : Rôle de la ploïdie chez <i>C. gigas</i> dans la sensibilité aux infections à <i>V. aestuarianus</i> et à OsHV-1	61
5.1.1.	Testages 2015 (première année d'élevage) : sensibilité à l'infection par OsHV-161	61
5.1.2.	Testages 2016 (seconde année d'élevage) : résistance à l'infection par <i>V. aestuarianus</i>	62
5.1.3.	Bilan mortalité, croissance et rendement d'élevage pour le testage en mer	64
5.2.	Objectif n°2 : Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à une infection à <i>V. aestuarianus</i>	65

6. Conclusions générales 66

7. Valorisation 67

8. Références bibliographiques 69



Liste des figures

Figure 1 : Cytogrammes monopramétriques de larves issues d'un croisement de géniteurs diploïde (a), d'un croisement impliquant des tétraploïdes et des diploïdes (b) et d'une induction chimique à la triploïdie (c). Les pics diploïdes (2n) et triploïdes (3n) sont indiqués. Le TRBC (Trout Red Blood Cells) est utilisé comme témoin interne.....	25
Figure 2 : Mortalités cumulées observées en 2015 pour des diploïdes (2n) et leur équivalent triploïdes (3n_chim). La mortalité totalise les mortalités observées en nurserie avec celles observées sur estran. S-OsHV-1 pour sélectionné pour une meilleure résistance face à OsHV-1, S-V.aestu pour sélectionné pour une moindre sensibilité face à V. aestuarianus.....	26
Figure 3 : Mortalités cumulées observées en 2015 pour des triploïdes produits à partir de trois stocks (4nA, 4nB et 4nC) d'huîtres mâles tétraploïdes. La mortalité totalise les mortalités observées en nurserie avec celles observées sur estran. S-OsHV-1 pour sélectionné pour une meilleure résistance face à OsHV-1, S-V.aestu pour sélectionné pour une moindre sensibilité face à V. aestuarianus. Les femelles 2n étaient identiques à celles utilisées pour produire les lots 2n et 3n_chim. Attention, il n'y avait pas d'huîtres triploïdes à tester pour le lot S-V. aestu1.....	27
Figure 4 : Mortalité 2016 (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés à d'Agnas et La Guillotine d'octobre 2015 à septembre 2016.....	28
Figure 5 : Mortalité cumulée finale (moyenne % ± écart-type intra-lot) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer de juin 2015 à septembre 2016.....	30
Figure 6 : Mortalité cumulée finale (moyenne % ± écart-type inter-stocks) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer de juin 2015 à septembre 2016.....	30
Figure 7 : Mortalité cumulée finale (moyenne % ± écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer de juin 2015 à septembre 2016 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par V. aestuarianus, et en noir, stocks sauvages).....	31
Figure 8 : Poids individuel (g) (moyenne ± écart-type intra-lot) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer en septembre 2016.....	32
Figure 9 : Poids individuel (g) (moyenne ± écart-type inter-stock) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer en septembre 2016.....	32
Figure 10 : Poids individuel moyen (moyenne % ± écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer en septembre 2016 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par V. aestuarianus, et en noir, stocks sauvages).....	33
Figure 11 : Rendement d'élevage (kg) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissains mis en élevage en juin 2015.....	34
Figure 12 : Rendement d'élevage (kg) (moyenne ± écart-type inter-stock) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissains mis en élevage en juin 2015.....	34
Figure 13 : Rendement d'élevage (moyenne % ± écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissain mis en élevage en juin 2015 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par V. aestuarianus, et en noir, stocks sauvages).....	35
Figure 14 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en infection expérimentale au 17 octobre 2016.....	36
Figure 15 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes testés en infection expérimentale du 22 septembre au 17 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour post-infection.....	36
Figure 16 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour le lot S-V.aestu 3 testé en infection expérimentale du 22 septembre au 17 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour post-infection.....	37
Figure 17 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 1 au 7 septembre 2016.....	39
Figure 18 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 1 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.....	40
Figure 19 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lots S-V.aestu 3 (gauche) et S-OsHV-1 3(droite) du testage 1 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.....	40
Figure 20 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 1 au 7 septembre 2016.....	42

Figure 21 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 2 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.	43
Figure 22 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lot S-V.aestu 1 (gauche) et S-V.aestu 3 (droite) du testage 2 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.	43
Figure 23 : Mortalité finale (moyenne % \pm écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 3 au 27 octobre 2016.	45
Figure 24 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 3 en laboratoire du 8 juin 2016 au 27 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 8 juin 2016.	45
Figure 25 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lot S-V.aestu 1 (gauche) et S-OsHV-1 3 (droite) du testage 3 en laboratoire du 8 juin 2016 au 27 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 8 juin 2016.	46
Figure 26 : Mortalité finale (moyenne % \pm écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 4 au 17 février 2017.	48
Figure 27 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 4 en laboratoire du 15 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 15 septembre 2016.	48
Figure 28 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour le lot S-V.aestu 3 pour le testage 4 en laboratoire du 15 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 15 septembre 2016.	49
Figure 29 : Mortalité finale (moyenne % \pm écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 5 au 17 février 2017.	50
Figure 30 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 5 en laboratoire du 21 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 21 septembre 2016.	51
Figure 31 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lots S-OsHV-1 3 (gauche) et S-V.aestu 3 (droite) du testage 5 en laboratoire du 21 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 21 septembre 2016.	52
Figure 32 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n, 3n_chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C des 5 testages en laboratoire et en infection expérimentale. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du début des expériences.	54
Figure 33 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n (en bleu) et 3n_chim (en rouge) des 5 testages en laboratoire et en infection expérimentale. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du début des expériences. En haut : lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 ; au milieu : lots sélectionnés pour leur moindre sensibilité à V. aestuarianus ; en bas : lots sauvages. De gauche à droite, lots 1 à 3.	55
Figure 34 : Mortalités (%) en mer et en laboratoire des lots de la série P.	59
Figure 35 : Heatmap des gènes différentiellement exprimés pour la famille H40 infectée par la bactérie Vibrio aestuarianus après 1, 4 et 8 jours. (Supérieur à 2 ou -2 et ayant une p value <0,05)	60



Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Plan de croisement utilisant trois stocks d'huîtres sauvages diploïdes et trois stocks d'huîtres tétraploïdes</i>	16
<i>Tableau 2 : Plan de croisement utilisant trois stocks diploïdes d'huîtres sélectionnées pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 et trois stocks d'huîtres tétraploïdes</i>	17
<i>Tableau 3 : Plan de croisement utilisant trois stocks diploïdes d'huîtres sélectionnées pour leur moindre sensibilité à l'infection à V. aestuarianus et trois stocks d'huîtres tétraploïdes</i>	17
<i>Tableau 4 : Testages en laboratoire des lots diploïdes et triploïdes</i>	19
<i>Tableau 5 : Testages en laboratoire des lots produits en 2014 et 2015</i>	22
<i>Tableau 6 : Mortalités finales en septembre 2016 pour les stocks testés à d'Agnas</i>	29
<i>Tableau 7 : Mortalités finales en septembre 2016 pour les stocks testés à La Guillotine</i>	29
<i>Tableau 8 : Mortalités finales au 17 octobre 2016 pour les stocks testés en infection expérimentale</i>	37
<i>Tableau 9 : Détection d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 (nombre de positifs/nombre analysés) pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors de l'infection expérimentale en septembre/octobre 2016</i>	38
<i>Tableau 10: Quantification d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors de l'infection expérimentale en septembre/octobre 2016 (quantités moyennes pour les échantillons positifs)</i>	38
<i>Tableau 11 : Mortalités finales au 7 septembre 2016 pour les stocks lors du testage 1 au laboratoire</i>	41
<i>Tableau 12 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) et quantification d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 1 en laboratoire</i>	41
<i>Tableau 13 : Mortalités finales au 7 septembre 2016 pour les stocks lors du testage 2 au laboratoire</i>	44
<i>Tableau 14 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) et quantification d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 2 en laboratoire</i>	44
<i>Tableau 15 : Mortalités finales au 27 octobre 2016 pour les stocks lors du testage 3 au laboratoire</i>	46
<i>Tableau 16 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 3 en laboratoire</i>	47
<i>Tableau 17 : Quantification d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 3 en laboratoire (quantités moyennes pour les échantillons positifs)</i>	47
<i>Tableau 18 : Mortalités finales au 17 février 2017 pour les stocks lors du testage 4 au laboratoire</i>	50
<i>Tableau 19 : Mortalités finales au 17 février 2017 pour les stocks lors du testage 5 au laboratoire</i>	52
<i>Tableau 20 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 5 en laboratoire</i>	53
<i>Tableau 21: Quantification d'ADN de V. aestuarianus et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 5 en laboratoire (quantités moyennes pour les échantillons positifs)</i>	53
<i>Tableau 22: Comparaison par paire des fonctions de survie des 5 groupes</i>	54
<i>Tableau 23 : Mortalités globales des testages en laboratoire et en infection expérimentale.</i>	56

1. Introduction

1.1. Contexte

Depuis 2012, le nombre de cas de mortalités d'huîtres adultes rapportés dans le cadre du réseau Repamo a considérablement augmenté (de 2,5 en moyenne en 2008-2011 à 16 en 2012 et 12 en 2013). Pour l'ensemble des lots analysés, *V. aestuarianus* a été détecté systématiquement dans toutes les huîtres moribondes prélevées sur plusieurs sites alors que le virus OsHV-1 était absent ou présent en très faibles quantités. De plus, des observations en histologie ont montré la présence de lésions caractéristiques d'une infection bactérienne (recrutement et lésions hémocytaires, et atrophie de l'épithélium au niveau des diverticules digestives).

Vibrio aestuarianus est une bactérie marine qui a été isolée en Amérique du Nord, en Asie où elle provoque en particulier des mortalités dans des élevages de poissons et en Europe dans le cadre de mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dès 2001 (Garnier et al., 2008; Zhang et al., 2011).

Face à ces observations, plusieurs hypothèses pouvant expliquer la (ré) émergence de cet agent infectieux ont été formulées dès 2012. Les premiers résultats obtenus dans le cadre des projets AESTU/AESTU2/AESTU3 - réalisés en 2013, 2014 et 2015 respectivement et avec un co-financement de la DPMA - indiquent que:

1- l'émergence d'un nouveau génotype bactérien est peu probable. En effet, la comparaison de différents isolats par des essais de pathologie expérimentale en conditions contrôlées n'a pas permis de mettre en évidence de différence de virulence des souches en fonction de leur année d'isolement (avant 2008 versus après 2012). Cependant, nous avons pu mettre en évidence **deux lignées apparentées *V. aestuarianus* contenant des souches virulentes isolées différentes années** par l'analyse des séquences génomiques de 14 souches de *V. aestuarianus* (Goudenège et al., 2015).

2- mise en évidence de l'importance du fond génétique des huîtres *C. gigas* et des paramètres **âges/tailles**. Dans les conditions expérimentales, le stade naissain paraît le moins sensible à l'infection par *V. aestuarianus*. **Au contraire, les juvéniles et les adultes sont particulièrement touchés par l'infection bactérienne.**

3- existence d'une composante génétique dans la sensibilité à l'infection bactérienne, avec une héritabilité faible à modérée pour ce caractère.

4- l'absence de corrélations génétiques de la sensibilité à l'infection par le virus OsHV-1 et à l'infection par la bactérie *V. aestuarianus*. Il sera donc possible de sélectionner des huîtres ayant la capacité d'une double résistance à l'infection virale et bactérienne.



Il apparaissait important de **confirmer ce dernier résultat en identifiant des lots d'huîtres présentant cette caractéristique de double résistance accrue à l'infection par *V. aestuarianus* et OsHV-1.**

Lors des précédentes éditions de l'action AESTU, la sensibilité de *C. gigas* à l'infection à *V. aestuarianus* a été principalement étudiée chez des huîtres diploïdes. A ce jour les connaissances restent encore limitées pour des huîtres triploïdes.

L'action DORE présente les dernières investigations comparant la sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* pour des huîtres diploïdes et triploïdes, mais aussi les résultats concernant l'obtention de souches d'huîtres présentant une résistance accrue à l'infection à *V. aestuarianus* et à l'infection à OsHV-1.

1.2. Objectifs

Deux objectifs principaux étaient :

Objectif n° 1 : Rôle de la ploïdie chez *C. gigas* dans la résistance à une infection à *V. aestuarianus* et une infection à OsHV-1

Afin d'étudier l'impact du niveau de la ploïdie chez *C. gigas* pour la résistance à une infection à *V. aestuarianus*, des lots diploïdes et triploïdes ont été produits en 2015 soit par induction de triploïdes par un traitement chimique, soit par croisements entre des huîtres diploïdes et tétraploïdes. Ces lots ont été testés à partir de 2015 sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron où *V. aestuarianus* et OsHV-1 sont régulièrement détectés. Ces animaux ont également été testés expérimentalement en laboratoire pour tester leur sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* en 2016.

Objectif n°2 : Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance aux infections dues à *V. aestuarianus* et OsHV-1.

A partir d'animaux ayant survécu à une ou plusieurs expositions à *V. aestuarianus*, des descendants ont été produits afin d'évaluer la réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à l'infection par *V. aestuarianus*. En parallèle, et à partir d'animaux issus de lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1, des familles ont été produites de 2014 à 2015. Dans un premier temps, ces familles ont été testées en condition d'élevage professionnel pour évaluer leur résistance à l'infection à OsHV-1. Dans un second temps, ces familles ont été testées en laboratoire pour évaluer leur résistance à l'infection à *V. aestuarianus* afin d'identifier des familles présentant une résistance accrue aux deux infections majeures touchant la production ostréicole française.



2. Matériels et méthodes

2.1. Rôle de la ploïdie chez *C. gigas* dans la sensibilité aux infections à *V. aestuarianus* et à OsHV-1

Pour cette étude, il était nécessaire de dissocier les facteurs ploïdie et origine parentale par la réplification de pontes.

2.1.1. Stocks utilisés

Neuf stocks d'huîtres diploïdes et trois stocks d'huîtres tétraploïdes ont été utilisés.

Pour les stocks diploïdes, il s'agit de trois populations sauvages du bassin de Marennes-Oléron échantillonnées en 2014, trois lots sélectionnés pour leur résistance accrue à l'infection par OsHV-1 et trois lots sélectionnés pour leur sensibilité moindre à l'infection par *V. aestuarianus*.

Concernant les trois stocks d'huîtres tétraploïdes, ils possèdent des niveaux de résistances contrastées au stade naissain vis-à-vis d'infections à OsHV-1

- un lot non sélectionné appelé **4nA** initialement produit à partir d'une base génétique diploïde sauvage non sélectionnée, ce lot étant celui étant distribué aux écloséries,
- un lot amélioré appelé **4nB** initialement produit à partir d'une base génétique diploïde présentant de bonnes performances de survie au stade naissain, ce lot ayant servi aux plans de sauvegardes réalisés de 2011 à 2014,
- un lot amélioré appelé **4nC** produit à partir du stock 4nB, lequel a été amélioré par l'utilisation d'un lot diploïde issu d'un programme de sélection massale visant à améliorer la résistance à l'infection par OsHV-1 comme décrit par Dégremont et al. (2015).

2.1.2. Production

Les différents lots de futurs géniteurs ont été conditionnés à la maturation selon le protocole standard utilisé dans l'écloserie expérimentale du LGPMM. Pour produire chacun des différents lots diploïdes et leurs triploïdes correspondants, les ovocytes issus d'une trentaine ou dizaine d'huîtres femelles diploïdes d'un stock sauvage ou sélectionné, respectivement, ont ainsi été groupés et ensuite subdivisés en cinq groupes. Chaque groupe est ensuite fécondé par :

- le sperme produit par une dizaine de mâles du même stock diploïde produisant ainsi le lot diploïde,

- le sperme produit par la même dizaine de mâles du même stock diploïde avec en plus la rétention du second globule polaire, réalisée 20 min post-fécondation avec 0.5 mg/l de cytochalasine B pendant 10 minutes, produisant ainsi le lot triploïde «chimique» correspondant,

- le sperme issu d'une dizaine de mâles tétraploïdes du stock 4nA,
- le sperme issu d'une dizaine de mâles tétraploïdes du stock 4nB,
- le sperme issu d'une dizaine de mâles tétraploïdes du stock 4nC.

Ces trois derniers croisements ont produit les lots dits triploïdes «naturels».

Pour résumer, pour chaque stock, un lot diploïde (2n) a été produit, ainsi qu'un lot triploïde « chimique » ($3n_{chim}$) en bloquant l'un des globules polaires afin de disposer de 2n et 3n ayant le même fond génétique (Tableau 1 ; Tableau 2 ; Tableau 3). Les mêmes femelles ont également été croisées avec des mâles tétraploïdes provenant de 3 stocks nommées A, B et C afin de produire des lots 100% triploïdes « naturels » ($3n_{nat_A}$, $3n_{nat_B}$ et $3n_{nat_C}$ respectivement). Les croisements ont été réalisés selon un plan factoriel complet entre les neuf stocks d'huîtres diploïdes et les trois stocks d'huîtres tétraploïdes (Tableau 1 ; Tableau 2 ; Tableau 3). Au total, 45 lots ont été produits en février 2015, puis testés en condition d'élevage dans le bassin de Marennes-Oléron depuis 2015 avant d'être ensuite testés en infection expérimentale vis-à-vis de *V. aestuarianus* en 2016.

Toutes les opérations de production des cheptels utilisés (élevage larvaire, micronursage et nursage) sont réalisées avec de l'eau de mer traitée aux UV. Le niveau de ploïdie de chaque lot est contrôlé par cytométrie en flux à tous les stades de vie (géniteurs, larves et naissains). Dans un but de biovigilance, tous les rejets ont systématiquement subi des traitements physiques (filtres) et chimiques (chloration) avant leur évacuation hors des structures sécurisées du LGPMM.

Tableau 1 : Plan de croisement utilisant trois stocks d'huîtres sauvages diploïdes et trois stocks d'huîtres tétraploïdes

	2n ♀ Sauvage 1	2n ♀ Sauvage 2	2n ♀ Sauvage 3
2n ♂ Sauvage 1	2n et $3n_{chim}$		
2n ♂ Sauvage 2		2n et $3n_{chim}$	
2n ♂ Sauvage 3			2n et $3n_{chim}$
4n ♂ stock A	$3n_{nat_A}$	$3n_{nat_A}$	$3n_{nat_A}$
4n ♂ stock B	$3n_{nat_B}$	$3n_{nat_B}$	$3n_{nat_B}$
4n ♂ stock C	$3n_{nat_C}$	$3n_{nat_C}$	$3n_{nat_C}$



Tableau 2 : Plan de croisement utilisant trois stocks diploïdes d’huîtres sélectionnées pour leur meilleure résistance à l’infection à OsHV-1 et trois stocks d’huîtres tétraploïdes

	2n ♀ S-OsHV-1 1	2n ♀ S-OsHV-1 2	2n ♀ S-OsHV-1 3
2n ♂ S-OsHV-1 1	2n et 3n <i>chim</i>		
2n ♂ S-OsHV-1 2		2n et 3n <i>chim</i>	
2n ♂ S-OsHV-1 3			2n et 3n <i>chim</i>
4n ♂ stock A	3n _{nat} _A	3n _{nat} _A	3n _{nat} _A
4n ♂ stock B	3n _{nat} _B	3n _{nat} _B	3n _{nat} _B
4n ♂ stock C	3n _{nat} _C	3n _{nat} _C	3n _{nat} _C

S : sélectionné

Tableau 3 : Plan de croisement utilisant trois stocks diploïdes d’huîtres sélectionnées pour leur moindre sensibilité à l’infection à *V. aestuarianus* et trois stocks d’huîtres tétraploïdes

	2n ♀ S-V.aestu 1	2n ♀ S-V.aestu 2	2n ♀ S-V.aestu 3
2n ♂ S-V.aestu 1	2n et 3n <i>chim</i>		
2n ♂ S-V.aestu 2		2n et 3n <i>chim</i>	
2n ♂ S-V.aestu 3			2n et 3n <i>chim</i>
4n ♂ stock A	3n _{nat} _A	3n _{nat} _A	3n _{nat} _A
4n ♂ stock B	3n _{nat} _B	3n _{nat} _B	3n _{nat} _B
4n ♂ stock C	3n _{nat} _C	3n _{nat} _C	3n _{nat} _C

S : sélectionné

2.1.3. Vérification du niveau de la ploïdie

Les niveaux de ploïdie des larves et des naissains issus des différents croisements ont été caractérisés en utilisant la cytométrie en flux utilisant le marquage DAPI selon le protocole mis au point au LGPMM (Barranger et al., 2014). Pratiquement, chaque échantillon analysé est comparé au témoin interne TRBC (Trout Red Blood Cells) et seules sont prises en comptes les analyses dont le pic TRBC présente un coefficient de variation bas (CV% inférieur à 3%).

L’analyse des différents lots de naissains s’intéresse principalement au critère cytométrique nommé ratio de fluorescence défini comme étant le rapport entre le canal de sortie du pic échantillon par rapport à celui du témoin interne TRBC. La valeur de ce ratio ($\pm 5\%$) est caractéristique de la quantité d’ADN nucléaire, et par voie indirecte d’un niveau de

ploïdie donné. Ce ratio est de $0.42 \pm 5\%$ pour les huîtres diploïdes et de $0.62 \pm 5\%$ pour les triploïdes.

2.1.4. Testage

La méthode de testage choisie consiste à tester les lots sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron pendant plusieurs années d'élevage. Les huîtres sont ainsi exposées aux agents pathogènes naturellement présents dans l'environnement. Ensuite, une partie des huîtres survivantes a été testée au laboratoire pour évaluer leur sensibilité à une infection par *V. aestuarianus*. Deux méthodes ont été testées. La première consiste à une infection expérimentale par cohabitation avec huîtres naïves injectées par *V. aestuarianus*, et la seconde consiste à des testages des lots en les disposant dans des bacs au laboratoire.

2.1.4.1. Testage en mer

En juin 2015, les lots ont été mis en testage dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron, à La Guillotine et à d'Agnes. Pour chaque site et chaque lot, une poche de réserve contenant 1,5 kg d'huîtres et deux filets contenant chacun 50 huîtres ont été mis sur estran. Le poids individuel des huîtres lors de la mise en testage sur estran était de 1g. Les comptages de mortalités en 2015 ont été effectués à partir des filets un mois après la mise en mer et en octobre 2015. A cette date, une poche de 100 huîtres par lot a été créée à partir de la poche de réserve pour les estimations des mortalités en 2016. Cependant, suite aux fortes mortalités pour certains lots, seuls ceux avec un effectif suffisant ont pu être suivis en 2016. Un seul comptage des mortalités a été réalisé pour le suivi en 2016, lequel fut réalisé en septembre. A cette date, le poids individuel des huîtres a été obtenu pour 30 huîtres par lot (sous réserve d'avoir un effectif suffisant), et le rendement d'élevage des lots a été estimé pour 1000 huîtres mises en élevage en juin 2015.

2.1.4.2. Infection expérimentale par *V. aestuarianus*

Une souche hautement virulente de *V. aestuarianus* 02/041 a été utilisée dans cette étude. Conservée à -80°C (dans du Zobell 15% glycérol), les bactéries ont été cultivées après décongélation en milieu Zobell gélosé ou liquide (4 g/l peptone, 1 g/l extrait de levure, 0,1 g/l citrate de fer, 0,5 g/l Tris base en eau de mer artificielle) à 22°C .

Préparation des suspensions bactériennes : des précultures de *V. aestuarianus* sont préparées par ensemencement dans 5 ml de Zobell et incubées à 22°C pendant 24 h sous agitation. Les bactéries sont ensuite lavées en eau de mer artificielle stérile et centrifugées 15 min à 20°C à 3000g. Puis, la charge bactérienne est ajustée à 10^6 UFC/ml. La quantité de bactéries contenues dans les suspensions bactériennes est vérifiée par étalement sur milieu gélosé.



Injection des huîtres sources : Après mise à sec pendant une nuit, les animaux sont « anesthésiés » dans une solution de chlorure de magnésium 50 g/l pendant 3 à 4h. Les bactéries (100 µl d'une suspension bactérienne ajustée à 10⁶ bactéries/ml) sont injectées dans le muscle adducteur. Après injection, les animaux sont répartis dans des bacs de 50 l d'eau de mer oxygénés à 22°C pendant 24h.

Cohabitation : Les lots diploïdes et triploïdes ont été échantillonnés en mer sur le parc d'Agnas le 21 septembre 2016. Ils ont été transférés en salle d'infection expérimentale le 22 septembre. Pour chaque lot, 10 huîtres ont été testées en disposant tous les lots dans un même bac (150 l). Cette condition a été répliquée trois fois (3 bacs utilisés). Des animaux sources moribonds obtenus 24 h après l'injection intramusculaire ont été mis en contact avec les lots à tester pendant 48 heures, à raison de 5 g d'huîtres infectées moribondes pour 100 g d'huîtres à infecter, puis retirés des bacs. Un bac témoin a été ajouté contenant uniquement les lots à tester, mais sans les huîtres sources. Le suivi de mortalité a été effectué jusqu'au 17 octobre. La température de l'eau de mer était comprise entre 17 et 20°C, et trois renouvellements de l'eau de mer ont été effectués au cours du suivi. Faute d'effectif suffisant suite aux fortes mortalités enregistrées en première année d'élevage, certains lots n'ont pas pu être testés en infection expérimentale.

2.1.4.3. Testage en laboratoire

Ce testage consiste à disposer les lots diploïdes et triploïdes échantillonnés en mer dans des bacs en laboratoire, lesquels sont alimentés en eau de mer filtrée et traitée UV (renouvellement horaire de 800l). Cinq testages ont été réalisés, lesquels sont résumés dans le Tableau 4. Faute d'effectif suffisant suite aux fortes mortalités enregistrées en première année d'élevage, certains lots n'ont pas pu être testés en laboratoire.

Tableau 4 : Testages en laboratoire des lots diploïdes et triploïdes

Testage	Origine terrain	Date début	Date fin	Nb bac	Effectif par lot par bac
1	Agnas	25/10/15	07/09/16	1	30
2	La Guillotine	25/10/15	07/09/16	1	30
3	Agnas	08/06/16	27/10/16	2	30
4	La Guillotine	15/09/16	17/02/17	2	25
5	Agnas	21/09/16	17/02/17	3	10

2.1.4.4. Prélèvements

Pour le testage en mer en 2016, seules trois huîtres moribondes (incapables de se refermer) ont pu être prélevées pour la détection d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*. Pour les testages en laboratoire et l'infection expérimentale, des huîtres moribondes ont été prélevées régulièrement pour les lots diploïdes, triploïdes chimiques, et les lots triploïdes A, B et C. Pour l'infection expérimentale et le testage 5 en laboratoire, 6 huîtres moribondes par bac et par groupe (2n, 3n_chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C) ont été analysées, soit 180 huîtres. Pour les testages 1 et 2, 35 et 31 huîtres ont été analysées, respectivement. Pour le

testage 3, 63 et 37 huîtres moribondes ont été échantillonnées dans les deux bacs. Pour le testage 4, 30 et 22 huîtres moribondes ont été échantillonnées dans les deux bacs. Les tissus ont été stockés en éthanol 100%.

2.1.4.5. Recherche d'agents infectieux

A partir d'ADN extraits sur des mélanges de tissus (branchie + manteau) en utilisant le kit Qiagen DNA QiaAmp, la présence d'ADN de l'herpès virus OsHV-1 et de la bactérie *V. aestuarianus* a été recherchée par PCR en temps réel (Pépin et al., 2008; Saulnier et al., 2009).

2.1.4.6. Statistiques

L'ensemble des analyses et des graphiques ont été produits à l'aide du logiciel SAS[®], version 9.4 pour Windows.

L'analyse des mortalités en mer en 2016 (un seul comptage entre octobre 2015 et septembre 2016) a été réalisée par la procédure GLIMMIX en faisant le choix d'une distribution binomiale avec Logit comme fonction de liaison et en appliquant le modèle linéaire généralisé suivant :

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

avec T_m étant le taux de mortalités, les facteurs groupe (2n, 3n_chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C) et site (Agnas et La Guillotine) en effets fixes et le facteur stock en effet aléatoire, lequel est hiérarchisé par le groupe.

Afin de comparer les mortalités entre des huîtres de même fond génétique, impliquant le groupe 2n et 3n_chim, un modèle simplifié a été utilisé en comparant chaque stock dans chaque site.

Les analyses des mortalités pour le testage en infection expérimentale et les 5 testages en laboratoire (nombreux points de comptages des mortalités pour chaque expérience) ont été réalisées par la procédure LIFETEST pour chaque expérience ainsi qu'en regroupant toutes les expériences. Cette procédure compare les fonctions de survie des groupes au cours du temps. Deux analyses ont été réalisées, la première comparant les fonctions des survies des 5 groupes (2n, 3n_chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C) quels que soient les stocks testés, et la seconde comparant les groupes 2n et 3n_chim pour chaque stock.

2.2. Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance aux infections dues à *V. aestuarianus* et OsHV1



2.2.1. Huîtres survivantes à une triple exposition à *V. aestuarianus* pour deux stocks présentant chacun des niveaux de résistance contrastés à une infection à OsHV-1

A partir de deux lignées sélectionnées pour une meilleure survie au stade naissain, laquelle est associée à une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 (Dégremont et al., 2015), des infections expérimentales par *V. aestuarianus* ont été réalisées en 2013 et 2014. Les résultats sont synthétisés dans les rapports AESTU de 2014 et 2015 (Travers et al., 2015; Travers et al., 2014) puis publiés (Azéma et al., 2015). Brièvement, les lots testés sont issus de deux stocks d'huîtres sauvages, nommés A et B, ayant pour origine le bassin de Marennes-Oléron, lesquels ont été échantillonnés en décembre 2008. Une sélection massale pour l'amélioration de la survie sur estran au stade naissain, et donc pour l'amélioration de la résistance à l'infection par OsHV-1, a été réalisée chaque année de 2009 à 2011 pour chaque stock. Un lot témoin par stock a également été produit afin d'évaluer la réponse à la sélection des lots sélectionnés, laquelle peut varier suite au changement des conditions environnementales. Il existe donc deux niveaux de sélection, nommés S pour sélectionné, et C pour le témoin.

Ces animaux, AS et AC pour le stock A, BS et BC pour le stock B, ont été exposés à trois reprises lors d'infections expérimentales successives à la bactérie *V. aestuarianus*. Les mortalités cumulées ont atteint 84% à 100% pour les lots testés (Azéma et al., 2015). Les échecs des pontes pour reproduire ces animaux en 2014 et 2015 ont conduit à la perte du groupe AC et les effectifs des autres lots se sont retrouvés fortement diminués. Pour compenser, des animaux des mêmes lots mais survivants d'une primo-infection par *V. aestuarianus* ont également été reproduits en février 2016 à l'écloserie de la station Ifremer de La Tremblade. Enfin un lot témoin, utilisant comme parents des huîtres sauvages échantillonnées dans le bassin de Marennes-Oléron en 2015, a également été produit.

Les lots ont été mis en mer le 21 juin 2016 à d'Agnas et La Guillotine (une poche de 100 huîtres pour les comptages de mortalités en 2016 et une poche de 1,5 kg pour les testages 2016/2017), puis une estimation des mortalités a été réalisée le 17 août 2016. Douze et trois huîtres moribondes ont pu être échantillonnées le 08 juillet 2016 et le 17 août 2016 à d'Agnas et La Guillotine, respectivement. En septembre 2016, 50 huîtres par lot ont été transférées de La Guillotine au laboratoire, puis disposées dans deux bacs (25 huîtres par bac) afin d'effectuer le premier testage de la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*. Des comptages mensuels ont été réalisés et le testage est toujours en cours. Les premières huîtres moribondes ont été prélevées pour la recherche ultérieure d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus* (analyses qui seront réalisées en 2017). D'autres testages des lots sont prévus en 2017 à partir des lots testés à d'Agnas.

2.2.2. Vers l'obtention de lignées d'huîtres présentant une double résistance accrue aux infections par OsHV-1 et *V. aestuarianus*

A partir de lots témoins et de lots sélectionnés, des pontes ont été réalisées de 2014 à 2016 avec la production de familles bi-parentales. Les lots sélectionnés ont été identifiés soit pour une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1, soit pour une moindre sensibilité à *V. aestuarianus* ou ayant survécu à de fortes mortalités causées par *V. aestuarianus* (Azéma et al., 2017a; Azéma et al., 2017b; Azéma et al., 2015; Dégremont et al., 2015). Les lots témoins ont été produits à partir d'huîtres sauvages échantillonnées dans le bassin de Marennes-Oléron. Trois séries de croisements ont été testées, les deux premières séries (C1 et C2) ont été produites en février 2014 et juin 2014, respectivement. Les premiers résultats de testages en mer et laboratoire sont présentés dans le rapport 2016 de l'action AESTU (Dégremont et al., 2016a). La troisième série, nommée P, a été produite en juin 2015, et elle est composée de 34 lots d'huîtres creuses.

Tous les lots ont été testés en mer sur le site d'Agnas et/ou La Casse dans le bassin de Marennes-Oléron dès la première année de vie pour tester leur sensibilité à l'infection par OsHV-1. Dans un second temps, une partie des animaux survivants a été transférée au laboratoire pour tester leur sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*. Ce protocole vise à se rapprocher des conditions d'élevages utilisées par les professionnels qui constatent des mortalités d'adultes par *V. aestuarianus* alors que ces animaux sont en général des survivants d'épisodes de mortalités causées par OsHV-1 en première année d'élevage. Au total, 8 testages ont été initiés, lesquels sont résumés dans le Tableau 5, deux étant toujours en cours à la date du 1^{er} mars 2017. Pour chaque testage en laboratoire, des animaux moribonds ont été prélevés pour la recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*. La recherche d'OsHV-1 et *V. aestuarianus* a été effectuée pour les testages en laboratoire pour 193 huîtres moribondes de la série C2 et 145 huîtres moribondes de la série P.

Tableau 5 : Testages en laboratoire des lots produits en 2014 et 2015

Série	Nombre lots testés	Testage	Origine terrain	Date début	Date fin	Nb bac	Effectif par lot par bac
C1	41	C1-1	Agnas	24/03/15	20/11/15	1	30
C1	41	C1-2	La Casse	24/03/15	20/11/15	1	30
C2	45	C2-1	La Casse	18/08/15	25/09/16	2	25
C2	45	C2-2	La Casse	08/03/15	08/09/16	2	25
C2	45	C2-3	La Casse	15/09/16	En cours	2	25
P	34	P1	Agnas	08/06/16	12/09/16	2	25
P	34	P2	La Casse	20/07/16	17/02/17	2	25
P	34	P3	Agnas	02/11/16	En cours	2	25

Enfin, d'autres testages sont prévus à partir d'animaux restés en mer depuis la première année d'élevage. Cette répétition de testages a pour principal objectif de tester des



lots à des âges et des stades physiologiques différents, sachant que la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* chez *C. gigas* augmente avec l'âge et la taille (Azéma et al., 2017a). L'analyse globale des résultats à la fin des testages permettra d'établir le rang des familles pour leur résistance à *V. aestuarianus* et OsHV-1.

2.2.3. Analyses transcriptomiques lors d'une infection expérimentales par *V. aestuarianus*

Ce travail initié en 2015 est en cours d'analyse. Deux familles contrastées pour leur sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* ont été étudiées. Le descriptif de cette expérience est présenté dans la partie 2.1.6 du rapport AESTU 3 (Dégremont et al., 2016a). Brièvement, ces deux familles ont été testées en infection expérimentale par *V. aestuarianus*. Des prélèvements réguliers ont été réalisés pour les quantifications des ADN bactériens et l'expression des gènes de l'hôte par une approche de RNAseq. L'analyse des données de RNAseq a été réalisée pour la famille H40 infectée expérimentalement avec la bactérie *Vibrio aestuarianus* (la seconde famille est en cours d'analyse). Cette famille est celle présentant une sensibilité moindre à l'infection par *V. aestuarianus*. Le traitement des données de séquençage a été réalisé sur la plateforme Galaxy. Tous les reads ont été alignés sur la version 9 du génome de *C. gigas*. Les différentiels d'expression entre les conditions suivantes T0 (début de l'expérience, avant l'infection expérimentale) /J1 (un jour post-infection), T0/J4 et T0/J8 ont été analysés avec Deseq2.



3. Résultats – Objectif 1 : Rôle de la ploïdie chez *C. gigas* dans la sensibilité aux infections à *V. aestuarianus* et à OsHV-1

3.1. Vérification du niveau de la ploïdie

Les niveaux de ploïdie des larves et des naissains issus des différents croisements ont été caractérisés en utilisant la cytométrie en flux.

Trois lots théoriquement triploïdes étaient en réalité diploïdes à cause de l'introduction involontaire de gamètes mâles dans les gamètes femelles bien avant la fécondation pour l'un des lots sélectionnés pour une moindre sensibilité à *V. aestuarianus*. Ces lots ont donc été logiquement éliminés. Tous les autres lots ont présenté le niveau de ploïdie attendu. Ainsi, les huitres diploïdes ont effectivement produit des larves et ensuite des naissains diploïdes (Figure 1A). Les croisements des géniteurs mâles tétraploïdes et femelles diploïdes ont produit des larves et naissains triploïdes (Figure 1B). Enfin, les inductions chimiques à la triploïdie ont produit une large majorité (90%) de larves triploïdes en compagnie d'une minorité (10%) de larves diploïdes (Figure 1C). Exploitant le fait que durant l'élevage larvaire les larves triploïdes croissent beaucoup plus vite que les diploïdes, une série de tamisages successifs éliminant les larves contenues dans la fraction « queue de lot » aboutit en fin d'élevage larvaire à une population larvaire pratiquement exclusivement constituée de larves triploïdes.

3.2. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en mer

3.2.1. Testage en 2015

Des mortalités causées par OsHV-1 ont été observées pour une partie des lots lors de la phase de nursage à Bouin. Les années précédentes, aucune mortalité anormale n'avait été observée en nurserie grâce au système d'adduction d'eau de mer du polder couplé à un temps de résidence de l'eau de mer dans les claires suffisant pour dégrader les particules virales. Malheureusement, **des huitres ont été éparées dans la claire alimentant la nurserie**, et en l'absence de filtration UV, une transmission horizontale du virus a été possible, pouvant expliquer les mortalités observées dans la nurserie. A ce jour, la présence de ces huitres n'est pas expliquée.



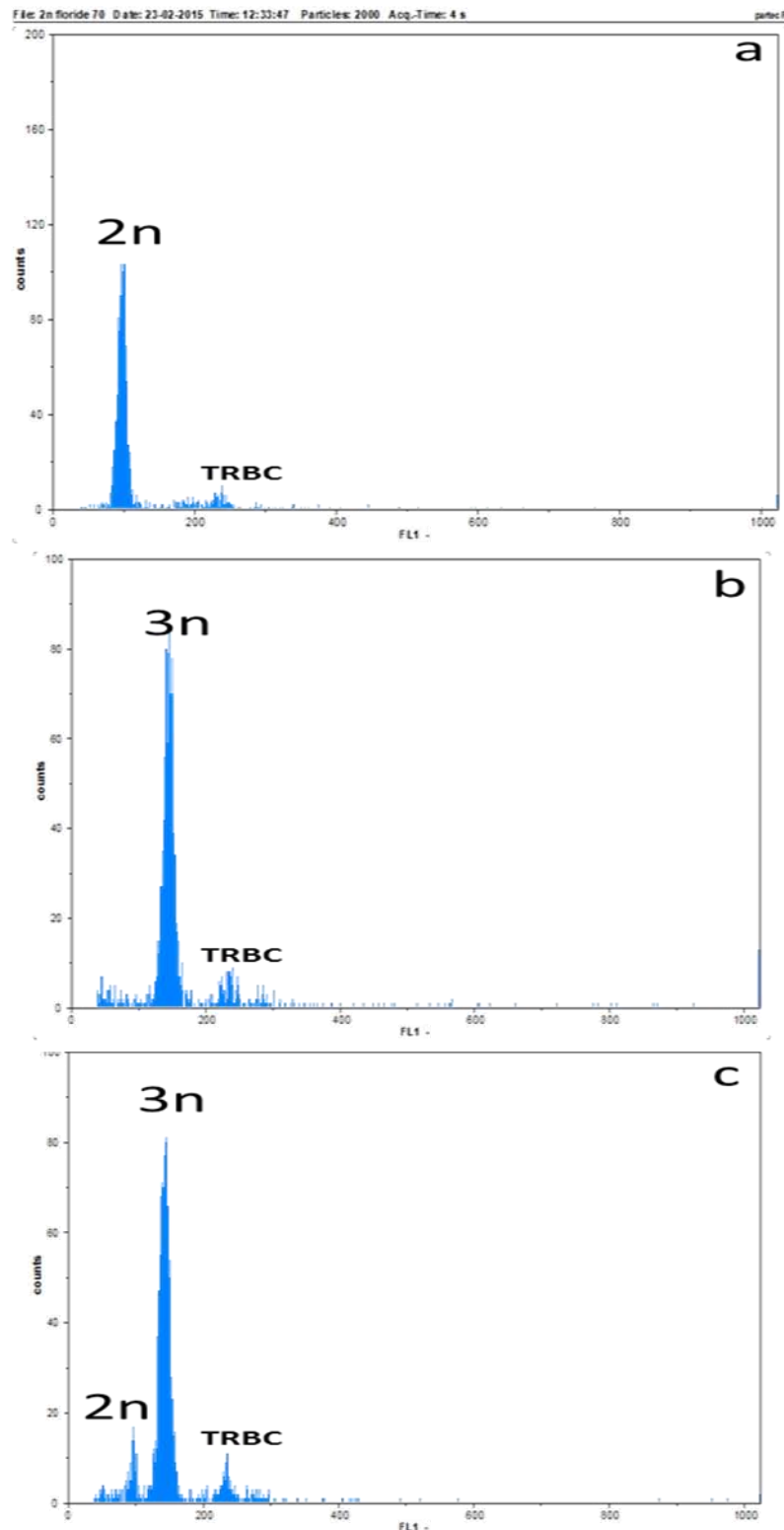


Figure 1 : Cytogrammes monoparamétriques de larves issues d'un croisement de géniteurs diploïde (a), d'un croisement impliquant des tétraploïdes et des diploïdes (b) et d'une induction chimique à la triploïdie (c). Les pics diploïdes (2n) et triploïdes (3n) sont indiqués. Le TRBC (Trout Red Blood Cells) est utilisé comme témoin interne



Les huîtres ont tout de même été mises dans les deux sites de testage. Pour les lots n'ayant pas connu de mortalité en nurserie, des mortalités ont été observées 15 jours après leur transfert, et celles-ci furent terminées en juillet. Les 17 huîtres moribondes prélevées en juillet ont toutes été détectées positives pour la présence d'ADN d'OsHV-1 en fortes quantités ($>10^{+6}$ copies d'ADN viral par mg de tissu). La bactérie *V. aestuarianus* a également été détectée pour trois huîtres (10^{+4} copies d'ADN bactérien par mg de tissu).

En octobre 2015, la mortalité moyenne cumulée à Bouin et sur estran était de 51% à La Guillotine et 49% à Agnas. Pour l'ensemble des lots, les mortalités étaient identiques entre les sites.

Les lots 2n et 3n_chim produits à partir d'huîtres sauvages ont présenté des mortalités comprises entre 72% et 86% (Figure 2). Concernant les lots sélectionnés pour leur résistance accrue à l'infection par OsHV-1, les mortalités étaient comprises entre 9% et 17%, entre 15 et 97% pour les lots sélectionnés pour leur moindre sensibilité à *V. aestuarianus* et entre 67 et 86% pour les lots sauvages (Figure 2). La mortalité moyenne a été la plus élevée (75%) pour les huîtres sauvages, intermédiaire pour les lots sélectionnés pour leur moindre sensibilité à *V. aestuarianus* (45%) et les plus faibles pour les lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 (13%). Les résultats observés pour les lots sélectionnés sont cohérents à ceux attendus. En effet, parmi les 6 lots sélectionnés, 5 sont des familles qui ont été testées à plusieurs reprises en infections expérimentales vis-à-vis du virus et de la bactérie. Il avait été également identifié que le lot S-V.aestu 2 était particulièrement sensible à l'infection à OsHV-1. Ces données, associées aux résultats des analyses pathologiques, renforcent l'implication forte d'OsHV-1 pour les mortalités observées en 2015.

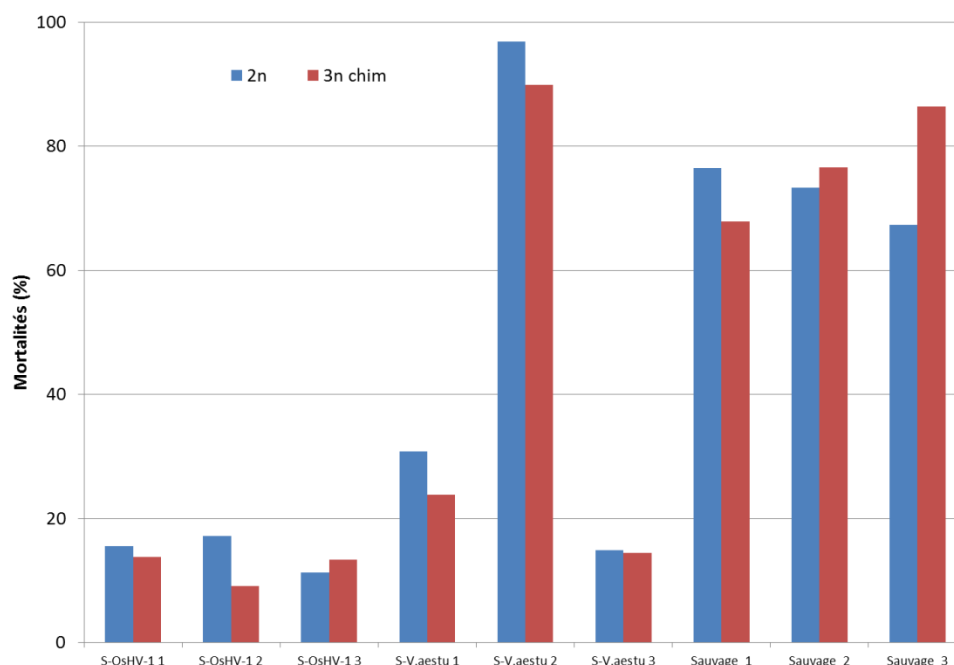


Figure 2 : Mortalités cumulées observées en 2015 pour des diploïdes (2n) et leur équivalent triploïdes (3n_chim). La mortalité totalise les mortalités observées en nurserie avec celles observées sur estran. S-OsHV-1 pour sélectionné pour une meilleure résistance face à OsHV-1, S-V.aestu pour sélectionné pour une moindre sensibilité face à *V. aestuarianus*.



Il n'a pas été observé d'effet du niveau de la ploïdie pour les mortalités associée à OsHV-1 lors de la première année d'élevage entre des 2n (45%) et des 3n_chim (44%), confirmant une étude similaire réalisée en 2011 et 2013 (Dégremont et al., 2016b)

Des tendances similaires ont été obtenues pour les lots triploïdes obtenus par croisement entre les mêmes femelles diploïdes et des mâles tétraploïdes issus de trois stocks présentant des niveaux de sélection différents (Figure 3). Cependant, un effet «stock tétraploïde» est mis en évidence et des différences de mortalités sont observées entre les groupes 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C. Ainsi, les huîtres triploïdes produites avec le stock d'huîtres tétraploïdes C présentent les mortalités les plus faibles (38%) que celles produites avec les stocks B (65%) et A (69%).

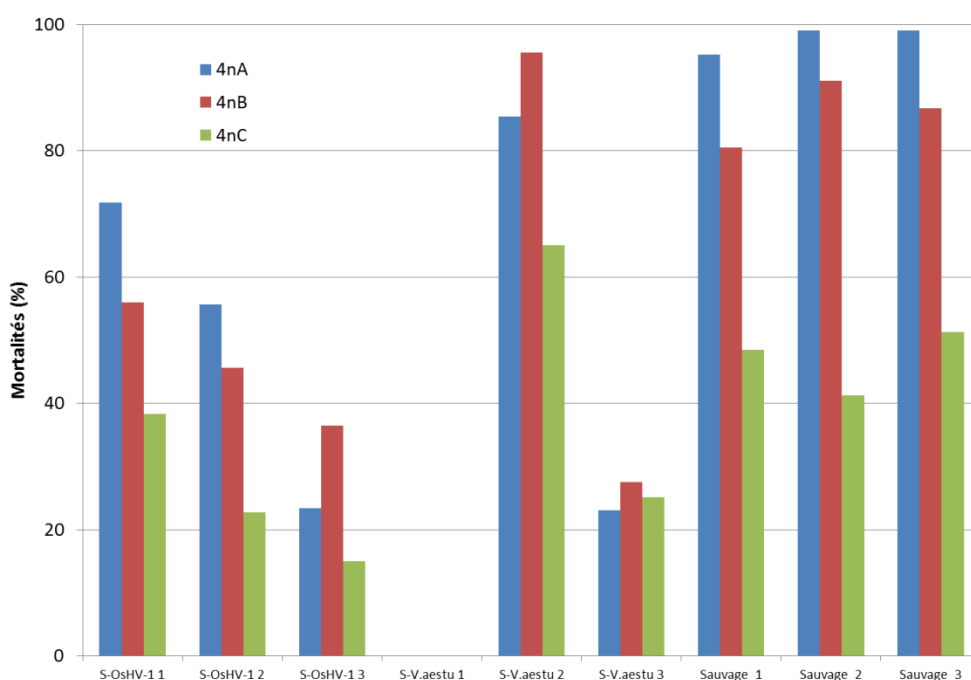


Figure 3 : Mortalités cumulées observées en 2015 pour des triploïdes produits à partir de trois stocks (4nA, 4nB et 4nC) d'huîtres mâles tétraploïdes. La mortalité totalise les mortalités observées en nurserie avec celles observées sur estran. S-OsHV-1 pour sélectionné pour une meilleure résistance face à OsHV-1, S-V.aestu pour sélectionné pour une moindre sensibilité face à *V. aestuarianus*. Les femelles 2n étaient identiques à celles utilisées pour produire les lots 2n et 3n_chim. *Attention, il n'y avait pas d'huîtres triploïdes à tester pour le lot S-V.aestu1.*

3.2.2. Testage en 2016

3.2.2.1. Comparaison entre les 5 groupes

L'interaction entre les sites et les groupes était non significative ($p=0,64$). Les mortalités ont été significativement plus importantes sur le site de La Guillotine (21%) qu'à d'Agnas (17%) ($p=0,03$). Il n'a pas été observé de différences significatives de mortalités entre les groupes ($p=0,18$). Néanmoins, le groupe 2n présentait les mortalités les plus faibles



avec 15% pour chaque site, et les mortalités les plus élevées ont été observées également dans les deux sites pour le groupe 3n_nat_B avec 21% et 29% à d’Agnas et La Guillotine, respectivement. Cependant, tous les lots n’ont pu être testés dans les deux sites rendant difficile l’interprétation des résultats.

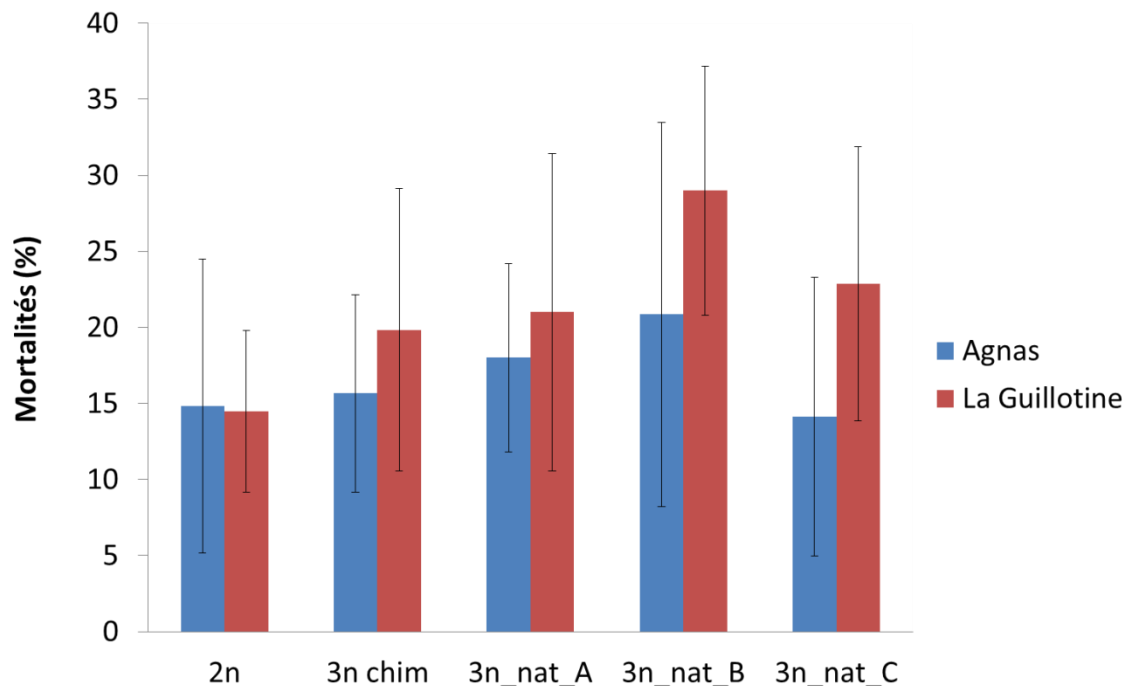


Figure 4 : Mortalité 2016 (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés à d’Agnas et La Guillotine d’octobre 2015 à septembre 2016.

3.2.2.2. Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

Les mortalités pour chaque groupe et chaque stock sont reportés dans les Tableau 6 et Tableau 7. La comparaison des mortalités entre les groupes 2n et 3n_chim a pu être réalisée pour 8 stocks à d’Agnas et 4 stocks à La Guillotine. Il n’a pas été observé de différence de mortalités entre ces deux groupes pour les stocks S-OsHV-1 2 et 3 à d’Agnas et La Guillotine, et S-V.aestu 1 et Sauvage 3 à d’Agnas. Le groupe 2n présentait des mortalités significativement plus faibles que le groupe 3n_chim pour les stocks S-OsHV-1 à d’Agnas, Sauvage 1 à La Guillotine, et S. V. aestu 3 dans les deux sites. Enfin, les mortalités étaient significativement plus faibles pour le groupe 3n_chim pour les stocks S. V. aestu 2 et Sauvage 3 à d’Agnas.



Tableau 6 : Mortalités finales en septembre 2016 pour les stocks testés à d'Agnas

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1	6	17	15	14	10	12
S-OsHV-1 2	17	16	21	15	9	16
S-OsHV-1 3	10	16	8	9	5	10
S-V.aestu 1	25	17				21
S-V.aestu 2	28	10	17	47	28	26
S-V.aestu 3	5	13	21	11	9	11
Sauvage_1	13	9	26	30	20	20
Sauvage_2		31		16	6	18
Sauvage_3	24	12		25	26	22
Total général	15	16	18	21	15	17

Tableau 7 : Mortalités finales en septembre 2016 pour les stocks testés à La Guillotine

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1		9			19	14
S-OsHV-1 2	15	17	14	38	24	20
S-OsHV-1 3	24	18	33	22		24
S-V.aestu 1		24				24
S-V.aestu 2			16		20	18
S-V.aestu 3	13	15			9	12
Sauvage_1	9	36		27	26	25
Sauvage_2					39	39
Sauvage_3					23	23
Total général	15	20	21	29	23	21

3.2.2.3. Recherche d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

Pour les trois huîtres moribondes prélevées en mer, l'ADN de *V. aestuarianus* a été détectée pour chaque individu à de fortes quantités (10^{+7} copies d'ADN bactérien par mg de tissu), alors qu'il n'a pas été détecté d'ADN d'OsHV-1.

3.2.3. Testage sur le cycle d'élevage 2015/2016

3.2.3.1. Mortalités cumulées de juin 2015 à septembre 2016

La mortalité cumulée finale moyenne était de 60% en septembre 2016, et elle variait entre les lots de 21% pour le lot 2n S-OsHV-1 à 100% pour les lots 3n_nat_A Sauvage-2 & 3 (Figure 5).

Les groupes 3n_nat_C, 2n et 3n_chim présentaient des mortalités similaires avec 48, 53 et 54% respectivement, alors que les deux autres groupes présentaient des mortalités plus importantes avec 71% pour le groupe 3n_nat_B et 75% pour le groupe 3n_nat_A (Figure 6).



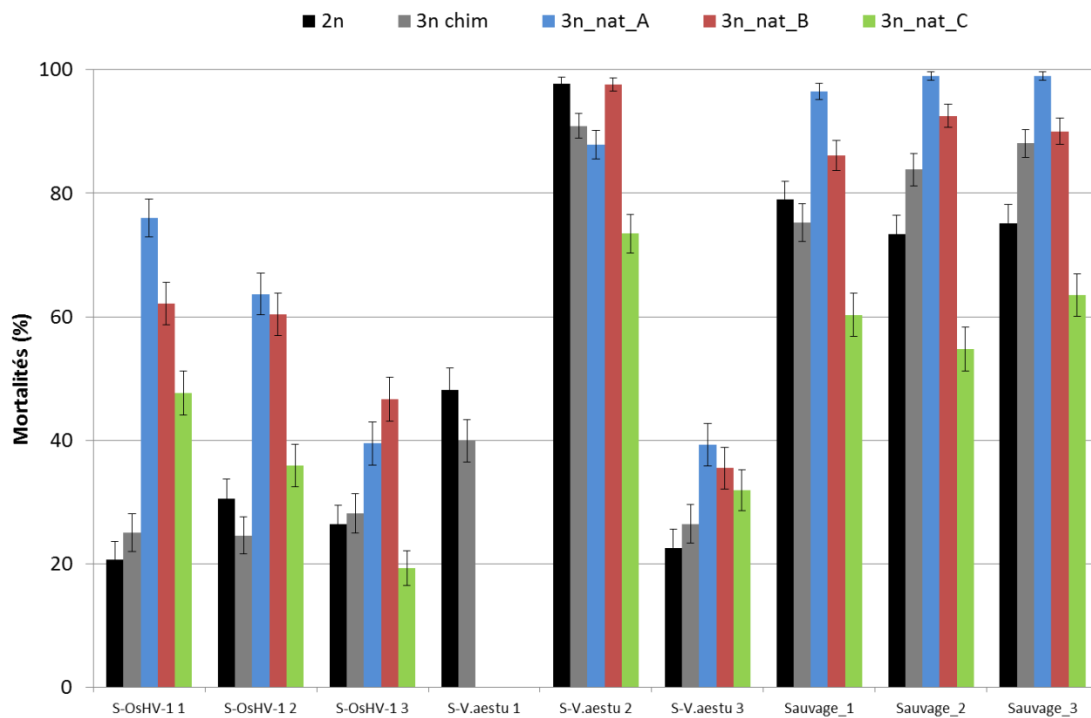


Figure 5 : Mortalité cumulée finale (moyenne % \pm écart-type intra-lot) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer de juin 2015 à septembre 2016.

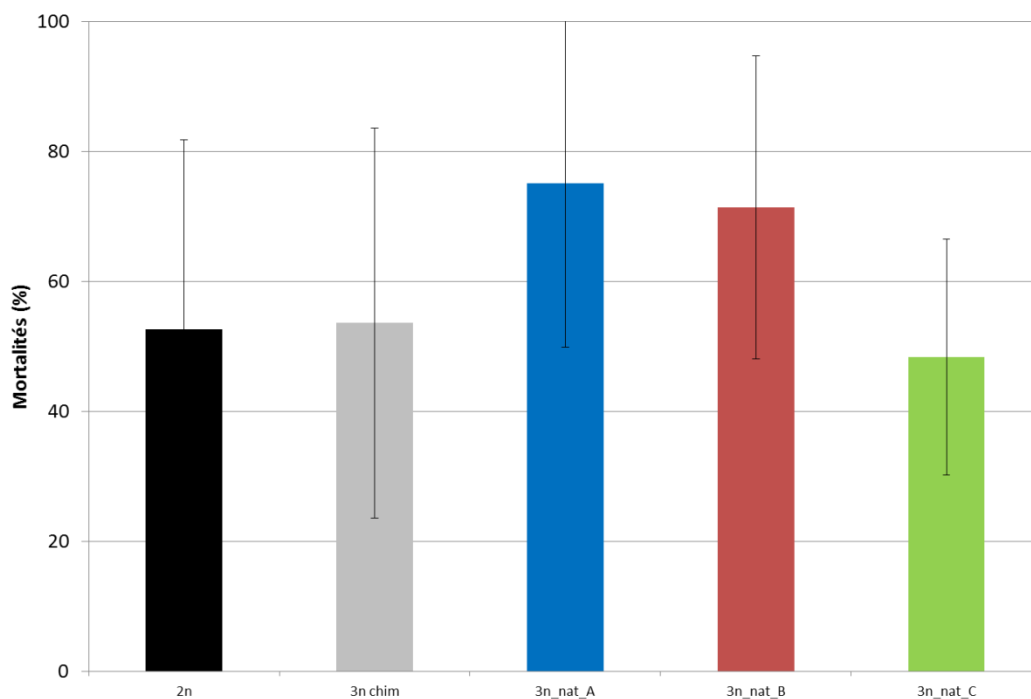


Figure 6 : Mortalité cumulée finale (moyenne % \pm écart-type inter-stocks) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer de juin 2015 à septembre 2016.



Les stocks S-OsHV-1 3 et S-V.aestu 3 ont présenté les plus faibles mortalités (31%) et le stock V.aestu 2 présentait les mortalités cumulées les plus importantes avec 90% (Figure 7).

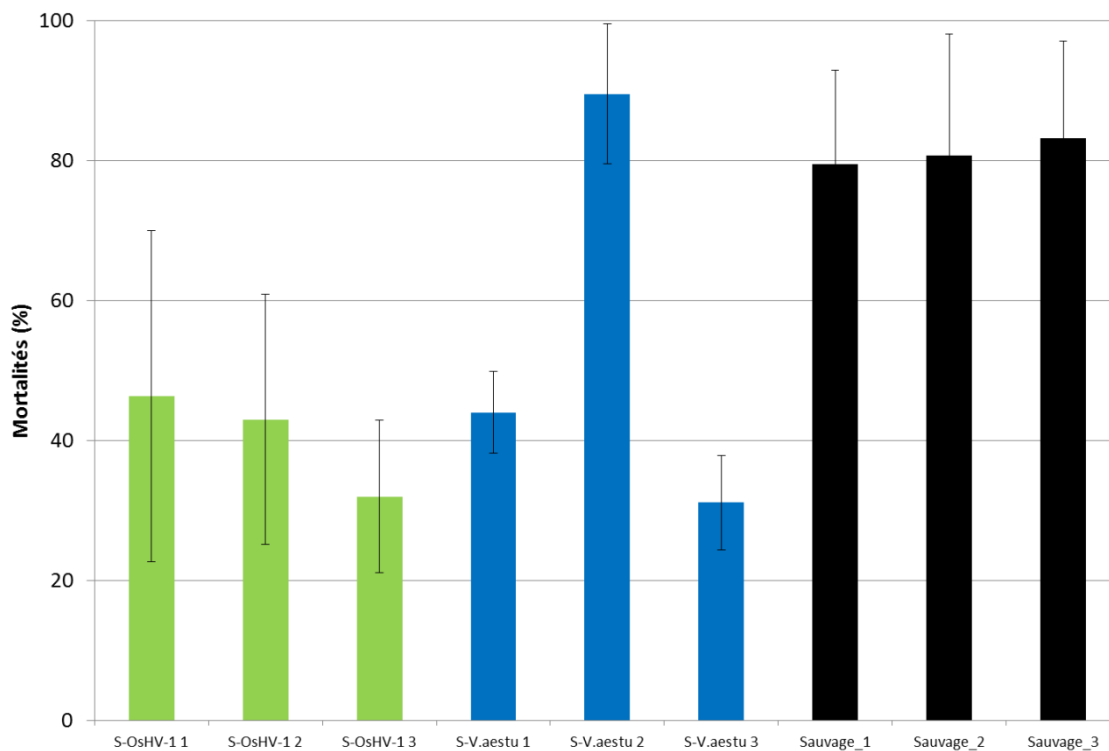


Figure 7 : Mortalité cumulée finale (moyenne % \pm écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer de juin 2015 à septembre 2016 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par *V. aestuarianus*, et en noir, stocks sauvages).

3.2.3.2. Poids individuel en septembre 2016

Le poids individuel des huîtres était en moyenne de 69 g en septembre 2016, et il variait entre les lots de 39g pour le lot 2n S-OsHV-2 à 96g pour les lots 3n_nat_A S-OsHV-1 3 (Figure 8).

Les huîtres du groupe 2n avaient le poids individuel moyen le plus faible, avec 50g, suivi de celles du groupe 3n_chim avec 57g. Les huîtres 3n_nat avaient un poids individuel moyen plus élevé compris entre 78 et 82g (Figure 9).

Les huîtres du stock S-V. aestu 1 avaient le poids individuel moyen le plus élevé avec 79g, et celles du stock Sauvage 2 étaient celles les plus légères avec en moyenne 63g (Figure 10).



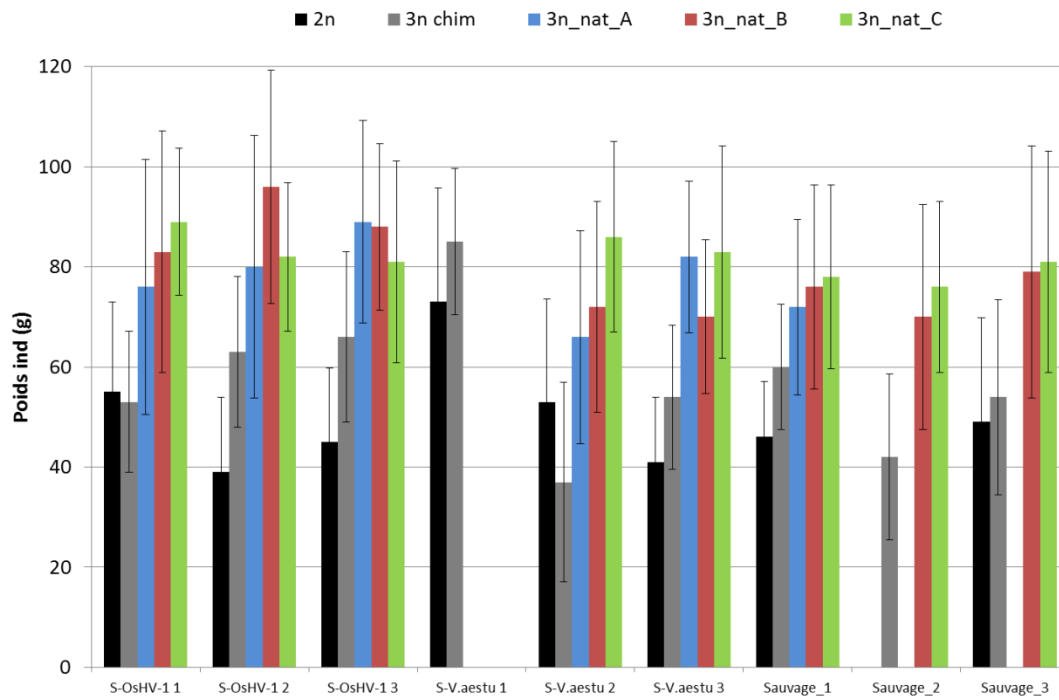


Figure 8 : Poids individuel (g) (moyenne \pm écart-type intra-lot) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer en septembre 2016.

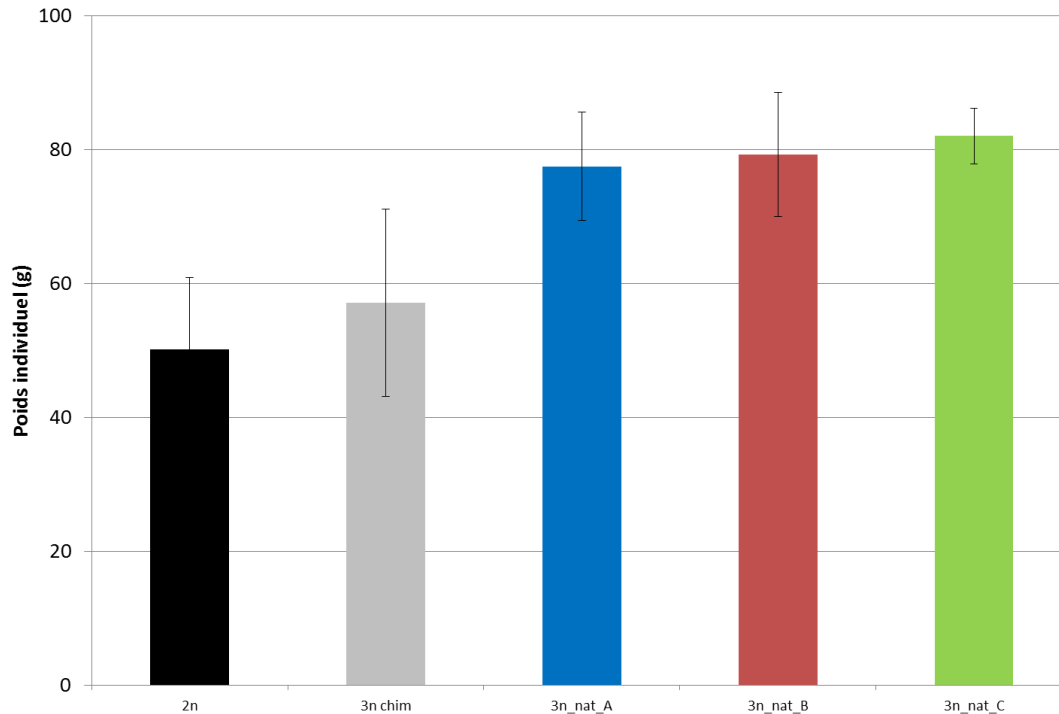


Figure 9 : Poids individuel (g) (moyenne \pm écart-type inter-stock) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer en septembre 2016.

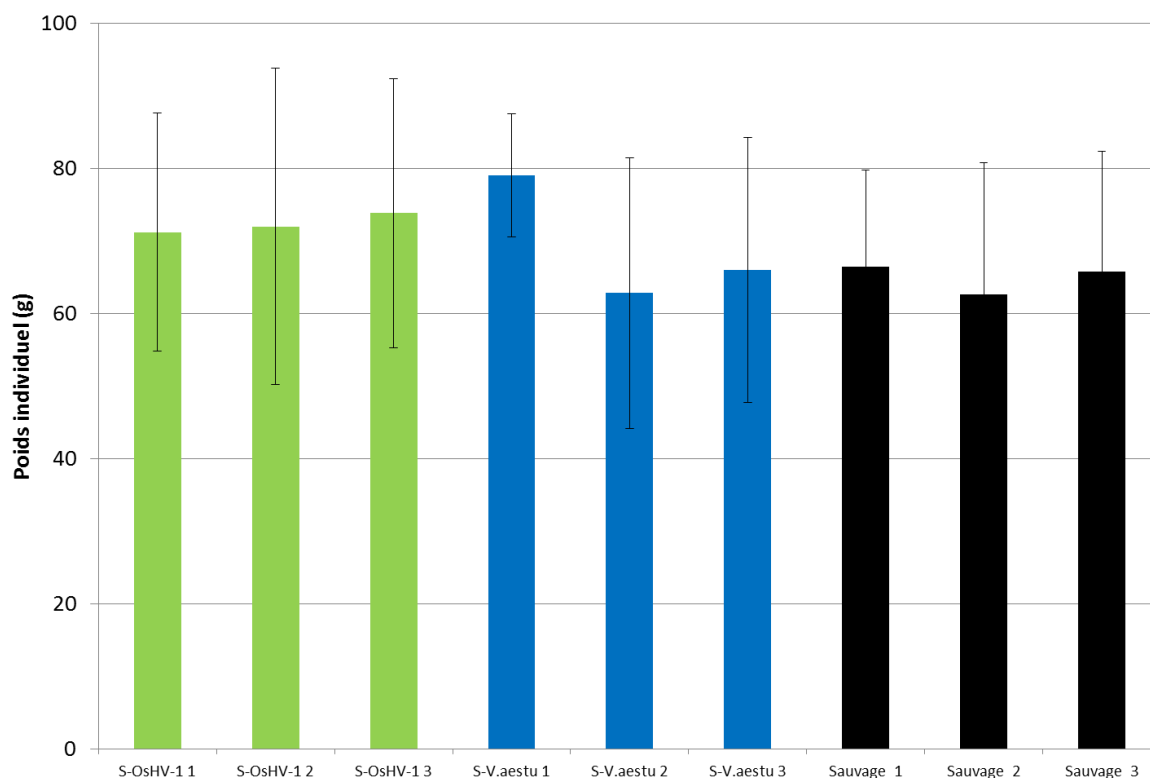


Figure 10 : Poids individuel moyen (moyenne \pm écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer en septembre 2016 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par *V. aestuarianus*, et en noir, stocks sauvages).

3.2.3.3. Rendement d'élevage en septembre 2016

Le rendement d'élevage était en moyenne de 27 kg en septembre 2016, et il variait entre les lots de 0 kg pour le lot 2n Sauvage-2 à 65 kg pour le 3n_nat_C S-OsHV-1 3 (Figure 11).

Les huîtres du groupe 3n_nat_A avaient le rendement moyen le plus faible, avec 20 kg d'huîtres en septembre 2016 pour un kilogramme de naissain mise en élevage en juin 2015, alors que celles du groupe 3n_nat_C présentaient le meilleur rendement avec 42 kg (Figure 12).

Les rendements étaient les plus importants pour les stocks sélectionnés sauf pour le stock S V. aestu 2, compris entre 36 et 49kg, alors qu'ils étaient les plus faibles pour le stock S V. aestu 2 et les stocks sauvages, compris entre 7 et 14 kg (Figure 13).

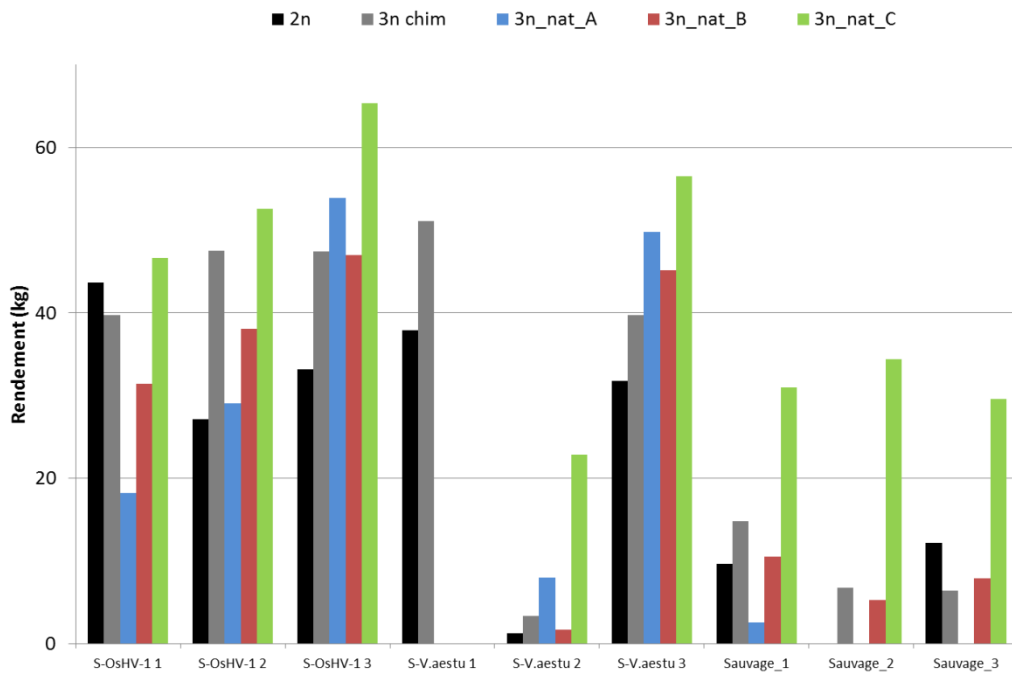


Figure 11 : Rendement d'élevage (kg) de chaque lot diploïde et triploïde testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissains mis en élevage en juin 2015.

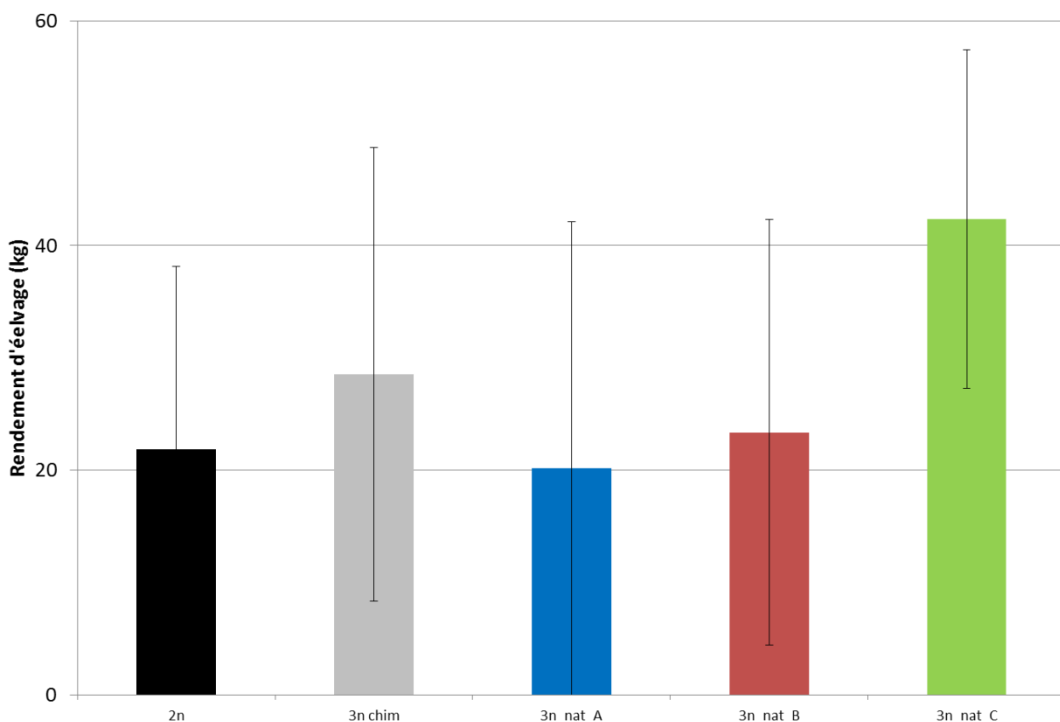


Figure 12 : Rendement d'élevage (kg) (moyenne \pm écart-type inter-stock) des groupes diploïdes et triploïdes testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissains mis en élevage en juin 2015.

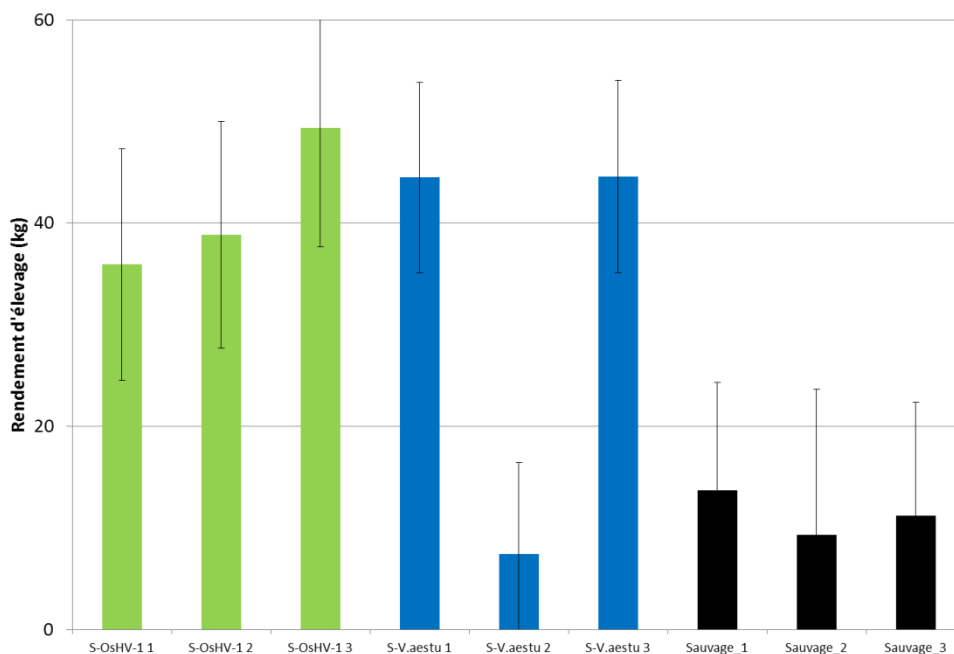


Figure 13 : Rendement d'élevage (moyenne % \pm écart-type inter-groupe) des stocks testés en mer en septembre 2016 pour un kilogramme de naissain mis en élevage en juin 2015 (vert pour résistant à l'infection par OsHV-1, bleu pour résistant à l'infection par *V. aestuarianus*, et en noir, stocks sauvages).

3.3. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en infection expérimentale par *V. aestuarianus*.

3.3.1. Mortalités

Aucune mortalité n'a été observée dans la condition témoin. Au contraire, des mortalités ont été constatées dès 48h post-infection, puis pendant toute la durée du suivi. Au 17 octobre 2016, la mortalité cumulée était en moyenne de 87% variant de 77% à 98% pour les 3 bacs.

3.3.1.1. Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales pour tous les groupes étaient élevées variant de 83% pour le groupe 3n_nat_C à 94% pour le groupe 3n_nat_B (Figure 14).



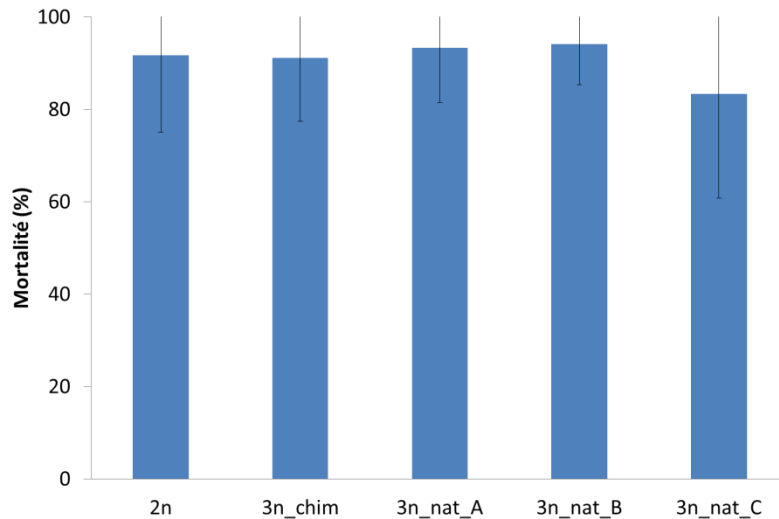


Figure 14 : Mortalité finale (moyenne % \pm écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en infection expérimentale au 17 octobre 2016.

Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative ($p < 0.0001$) entre les groupes avec un temps de survie plus élevé pour le groupe 3n_nat_C (Figure 15). Le temps de survie médian (50% des huîtres) était de 17 jours pour le groupe 3n_nat_C alors que celui du groupe 3n_nat_B n'était que de 10 jours (Figure 15).

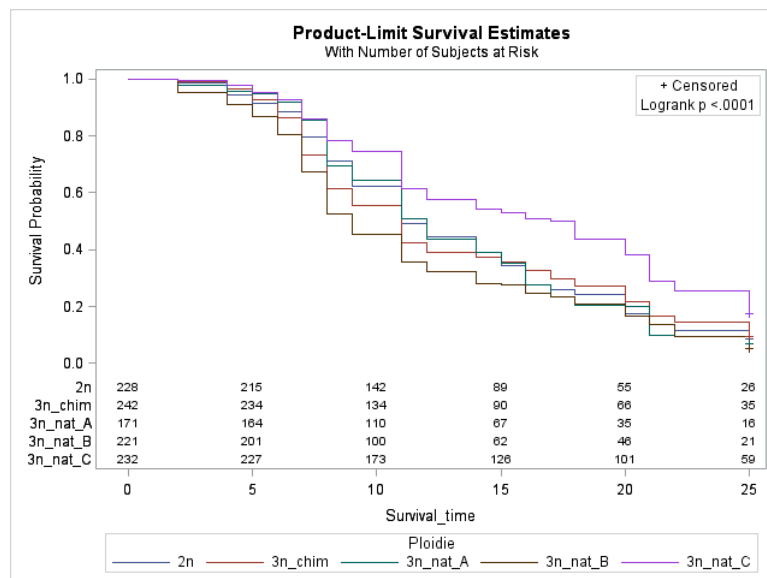


Figure 15 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes testés en infection expérimentale du 22 septembre au 17 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour post-infection.

3.3.1.2. Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)



La comparaison des courbes de survie entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour les 9 stocks. Celle-ci ne montrait pas de différence significative des courbes de survie pour chacun des stocks sauf pour le stock S-V.aestu 3, avec une meilleure survie des 2n par rapport aux 3n_chim (Figure 16).

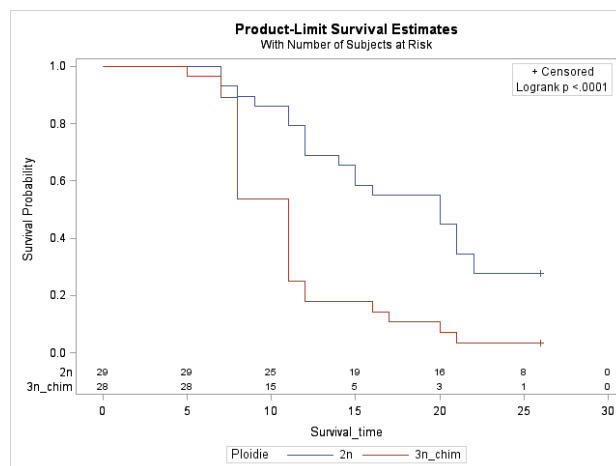


Figure 16 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour le lot S-V.aestu 3 testé en infection expérimentale du 22 septembre au 17 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour post-infection.

3.3.1.3. Comparaison entre les stocks

Tous les stocks ont présenté des mortalités moyennes importantes, comprises entre 86 et 96% (Tableau 8). Le stock S-V.aestu 3, dont les 5 groupes ont pu être testés, présentait la mortalité moyenne la plus basse avec 86%, alors qu'elle était la plus élevée avec 96% pour le stock Sauvage_1.

Tableau 8 : Mortalités finales au 17 octobre 2016 pour les stocks testés en infection expérimentale

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1	97	83	97	100	70	89
S-OsHV-1 2	97	83	97	97	83	91
S-OsHV-1 3	100	93	93	93	93	95
S-V.aestu 1	87	93				90
S-V.aestu 2	97	97	83	90	97	93
S-V.aestu 3	73	97	90	97	73	86
Sauvage_1	100	100	100	97	83	96
Sauvage_2		80		90	90	87
Sauvage_3	83	93		90	77	86
Total général	92	91	93	94	83	91

3.3.2. Recherche d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des huîtres moribondes prélevées au cours des mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 89 des 91 échantillons analysés (Tableau 9) avec de fortes quantités (10^{+7} copies d'ADN par mg de tissu) pour l'ensemble des groupes et dans l'ensemble des bacs (Tableau 10). A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 15 des échantillons et généralement à de faibles quantités (10^{+4}).

Tableau 9 : Détection d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 (nombre de positifs/nombre analysés) pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors de l'infection expérimentale en septembre/octobre 2016

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	30/30
	B	6/6	4/6	5/5	7/7	6/6	28/30
	C	6/6	6/6	6/6	7/7	6/6	31/31
	Total	18/18	16/18	17/17	20/20	18/18	89/91
OsHV-1	A	1/6	4/6	1/6	2/6	3/6	11/30
	B	2/6	0/6	0/5	0/7	0/6	2/30
	C	0/6	1/6	0/6	1/7	0/6	2/31
	Total	3/18	5/18	1/17	3/20	3/18	15/91

Tableau 10: Quantification d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors de l'infection expérimentale en septembre/octobre 2016 (quantités moyennes pour les échantillons positifs)

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	5.75E+06	2.75E+07	1.16E+07	9.68E+06	7.49E+06	1.24E+07
	B	5.50E+06	2.36E+07	1.18E+07	5.02E+06	1.41E+07	1.09E+07
	C	3.35E+07	6.34E+07	7.25E+06	9.34E+07	1.55E+07	4.42E+07
	Total	1.49E+07	4.00E+07	1.01E+07	3.73E+07	1.24E+07	2.30E+07
OsHV-1	A	2.37E+02	3.91E+04	3.30E+02	4.18E+02	1.67E+05	6.00E+04
	B	6.23E+02					6.23E+02
	C		1.17E+02		6.94E+00		6.21E+01
	Total	4.94E+02	3.13E+04	3.30E+02	2.81E+02	1.67E+05	4.41E+04

3.4. Testage de la sensibilité des lots diploïdes et triploïdes en laboratoire.

3.4.1. Testage 1 : Origine Agnas d'octobre 2015 à septembre 2016

3.4.1.1. Mortalités

Des mortalités faibles (<5%) ont été observées en janvier 2016, soit deux mois suivant le transfert des lots d'Agnas au laboratoire. Un pic de mortalité a été observé en mai 2016, et à la fin du suivi, la mortalité cumulée finale en septembre 2016 était de 97%.

3.4.1.1.1 Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales au 7 septembre 2016 étaient les plus faibles pour le groupe 2n et 3n_nat_C avec 95% et les plus élevées pour le groupe 3n_nat_B avec 99% (Figure 17).

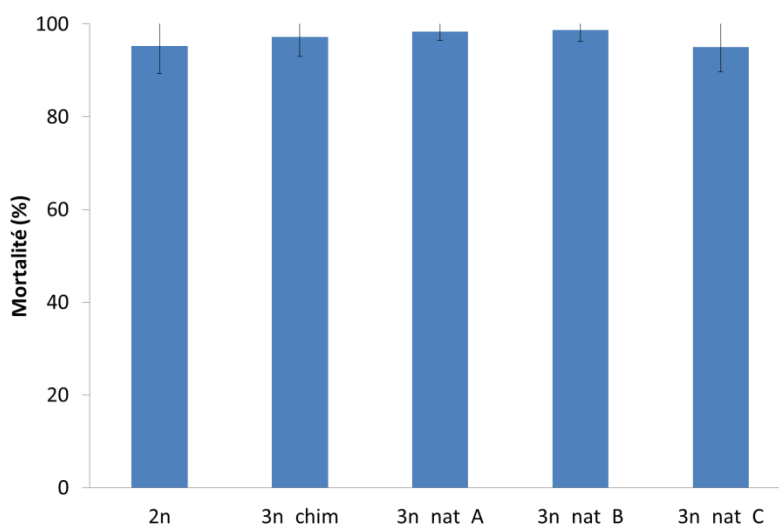


Figure 17 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 1 au 7 septembre 2016.

Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative ($p < 0.0001$) entre les groupes. Le groupe 2n a présenté un temps de survie supérieur à ceux des autres groupes, suivi par le groupe 3n_nat_C. Le meilleur temps de survie médian (50% des huîtres) était de 214 jours pour le groupe 2n, alors que celui du groupe 3n_nat_B était le plus faible avec 194 jours (Figure 18).



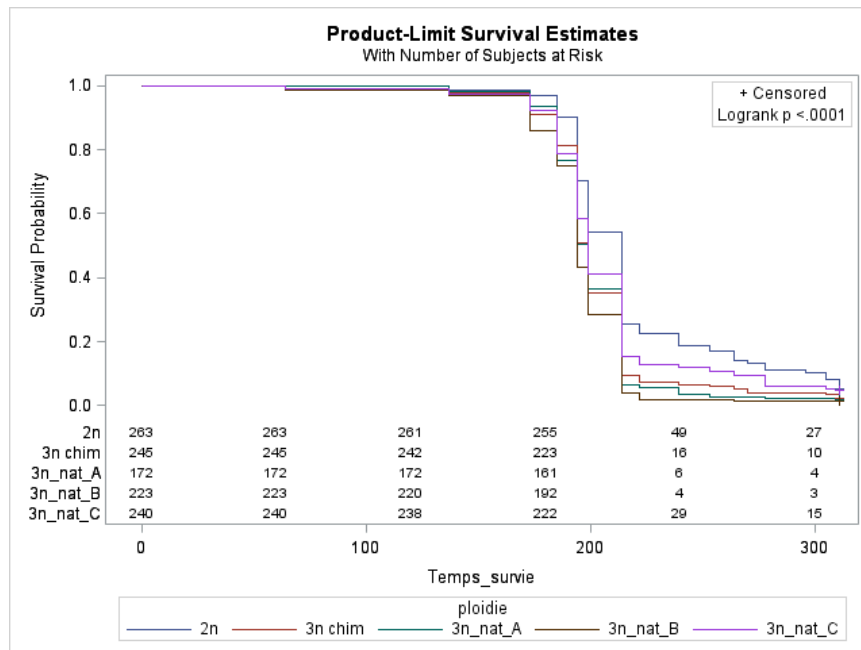


Figure 18 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 1 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.

3.4.1.1.2 Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

La comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour 8 stocks (absence du Sauvage 2). Les temps de survie étaient similaires entre les deux groupes pour les deux stocks sauvages et les stocks S-V.aestu 2 et 3 (Figure 19). Au contraire, des différences significatives de temps de survie ont pu être mises en évidence avec à chaque fois une meilleure survie des huîtres 2n pour les lots S-OshV-1 1,2 et 3 et S-V.aestu 1. A titre d'illustration, les courbes de survie sont montrées pour le stock S-OshV-1 3 (Figure 19).

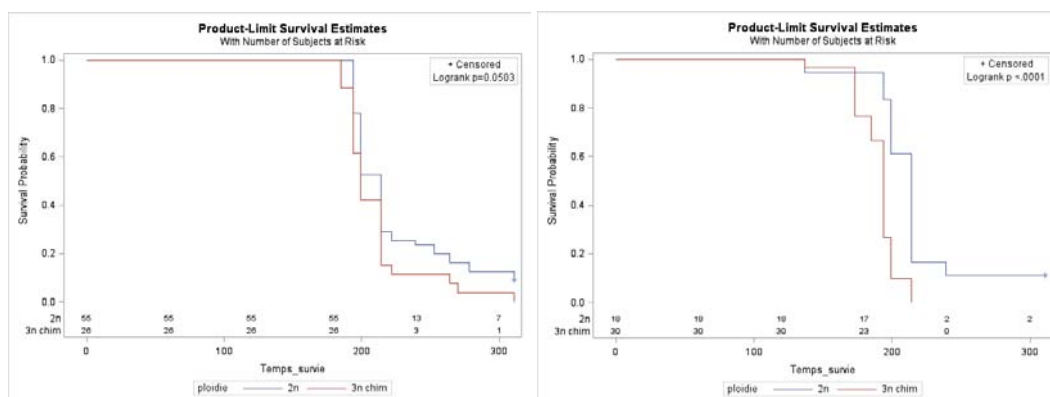


Figure 19 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lots S-V.aestu 3 (gauche) et S-OshV-1 3(droite) du testage 1 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.



3.4.1.1.3 Comparaison entre les stocks

Pour tous les lots 2n, les mortalités étaient supérieures à 90%. Les mortalités les plus faibles ont été observées pour les stocks S-OsHV-1 1 et S-V.aestu 1 et 3 (Tableau 11).

Tableau 11 : Mortalités finales au 7 septembre 2016 pour les stocks lors du testage 1 au laboratoire

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1	90	100	100	100	87	95
S-OsHV-1 2	100	100	97	100	97	99
S-OsHV-1 3	93	100	100	100	97	98
S-V.aestu 1	90	100				95
S-V.aestu 2	100	88	97	100	87	94
S-V.aestu 3	92	100	97	97	100	96
Sauvage_1	100	97	100	93	100	98
Sauvage_2		97		100	97	98
Sauvage_3	97	93		100	97	97
Total général	95	97	98	99	95	97

3.4.1.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des huîtres moribondes prélevées au cours de ces mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 33 des 35 échantillons analysés en fortes quantités (10^{+6} copies d'ADN par mg de tissu) pour l'ensemble des groupes et dans l'ensemble des bacs. A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 9 des 35 échantillons et à de faibles quantités (10^{+4}) (Tableau 12).

Tableau 12 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) et quantification d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 1 en laboratoire

		2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	Détection	7/8	8/8	4/5	12/12	2/2	33/35
	Quantification	1.98E+06	2.18E+06	4.71E+06	3.44E+06	1.00E+06	2.81E+06
OsHV-1	Détection	1/8	0/8	1/5	6/12	1/2	9/35
	Quantification	1.48E+03		8.67E+03	1.41E+04	9.57E+04	2.12E+04



3.4.2. Testage 2 : Origine La Guillotine d'octobre 2015 à septembre 2016

3.4.2.1. Mortalités

De faibles mortalités (<5%) ont été observées en janvier 2016, soit deux mois suivant le transfert des lots du site de La Guillotine au laboratoire. Un pic de mortalité a été observé en mai 2016, et à la fin du suivi, la mortalité cumulée finale en septembre 2016 était de 97%.

3.4.2.1.1 Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales au 7 septembre 2016 étaient les plus faibles pour le groupe 3n_nat_C avec 94% et les plus élevées pour le groupe 3n_nat_B avec 98% (Figure 20).

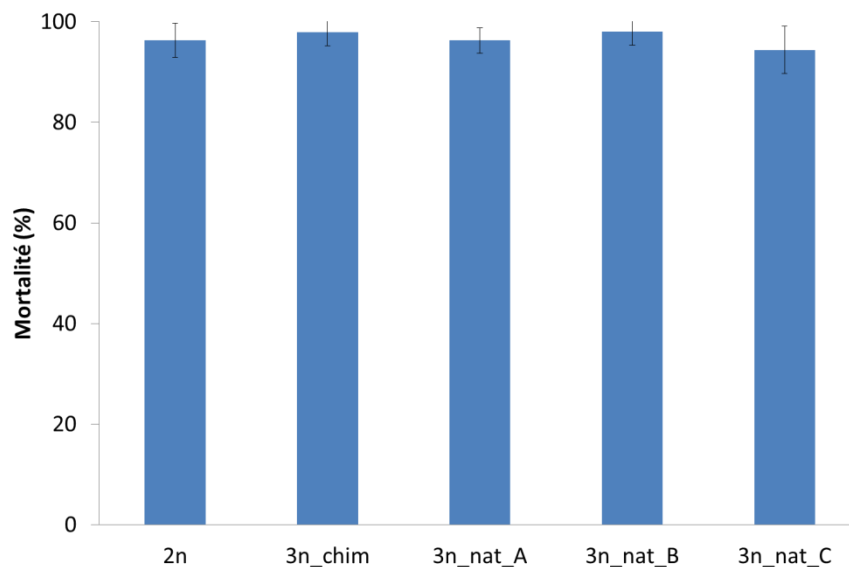


Figure 20 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 1 au 7 septembre 2016.

Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative de temps de survie ($p < 0.0001$) entre les groupes. Le groupe 2n présentait un temps de survie supérieur aux autres groupes, suivi par le groupe 3n_nat_C. Tous les groupes présentaient un temps de survie médian (50% des huîtres) de 194 jours, mais le temps de survie moyen du groupe 2n était de 198 jours contre 180 jours pour celui du groupe 3n_nat_B (Figure 21).



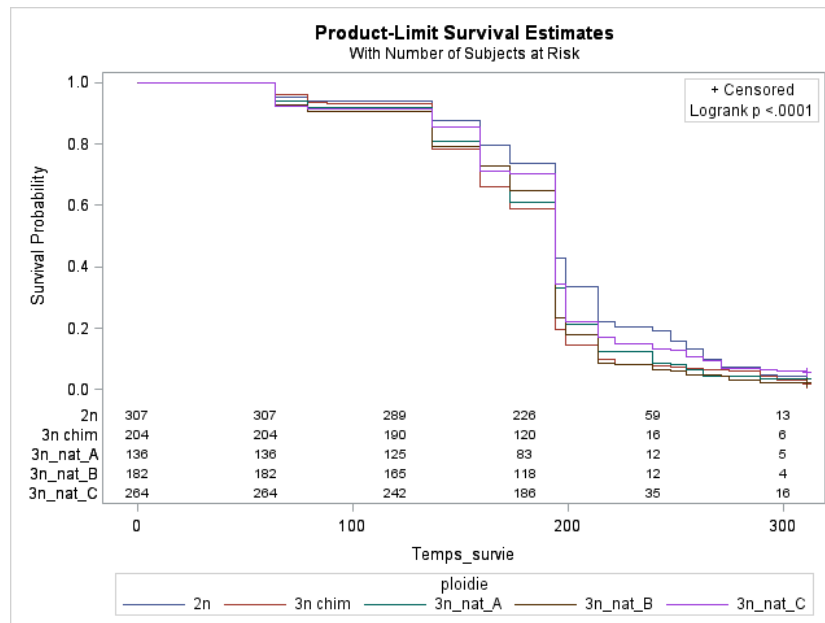


Figure 21 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 2 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.

3.4.2.1..2 Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

La comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour 7 stocks (absence du Sauvage 2 et 3). Les temps de survie étaient similaires entre les deux groupes pour les stocks Sauvage 1, S-OsHV-1 3 et les lots S-V.aestu 1 et 2 (Figure 22). Au contraire, des différences significatives de temps de survie ont pu être mises en évidence avec à chaque fois une meilleure survie des huîtres 2n pour les lots S-OsHV-1 1 et 2 et S-V.aestu 1 et 2. A titre d'illustration, les courbes de survie sont montrées pour le stock S-OsHV-1 3 (Figure 22).

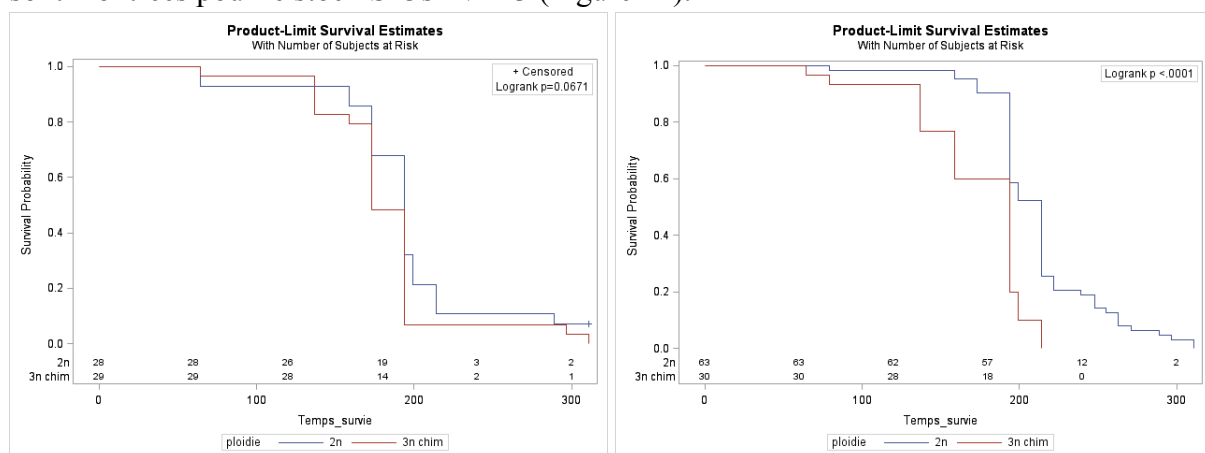


Figure 22 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lot S-V.aestu 1 (gauche) et S-V.aestu 3 (droite) du testage 2 en laboratoire du 25 octobre 2015 au 7 septembre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 25 octobre 2015.



3.4.2.1..3 Comparaison entre les stocks

Pour tous les lots 2n, les mortalités étaient supérieures à 90%. Les mortalités les plus faibles ont été observées pour les stocks S-OsHV-1 1 et S-V.aestu 3 (Tableau 13).

Tableau 13 : Mortalités finales au 7 septembre 2016 pour les stocks lors du testage 2 au laboratoire

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1	90	93	93	96	87	92
S-OsHV-1 2	97	100	97	100	97	98
S-OsHV-1 3	100	97	97	100	95	97
S-V.aestu 1	93	100				96
S-V.aestu 2	97	96	95	98	87	95
S-V.aestu 3	100	100	100	93	97	98
Sauvage_1	97	100		100	100	99
Sauvage_2	93				97	95
Sauvage_3					97	97
Total général	96	98	96	98	94	97

3.4.2.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des animaux moribonds prélevés au cours de ces mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 24 des 31 échantillons analysés en fortes quantités (10^{+6} copies d'ADN par mg de tissu). A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 6 des 31 échantillons en faible quantités (10^{+3}) (Tableau 14).

Tableau 14 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) et quantification d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 2 en laboratoire

		2n	3n chim	3n_nat A	3n_nat B	3n_nat C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	Détection	4/4	5/6	0/1	8/10	7/10	24/31
	Quantification	8.31E+05	7.88E+06	#DIV/0!	1.22E+06	2.30E+05	2.41E+06
OsHV-1	Détection	0/4	0/6	0/1	4/10	2/10	6/31
	Quantification				5.03E+03	4.56E+03	4.87E+03

3.4.3. Testage 3 : Origine Agnas de juin 2016 à octobre 2016

3.4.3.1. Mortalités

Les premières mortalités ont été observées la semaine suivant le transfert des lots d'Agnas au laboratoire. Au 27 octobre 2016, la mortalité cumulée était en moyenne de 62% variant de 62% à 63% pour les 2 bacs.



3.4.3.1.1 Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales au 27 octobre 2016 étaient les plus faibles pour le groupe 2n avec 50% et les plus élevées pour le groupe 3n_nat_B avec 73% (Figure 23).

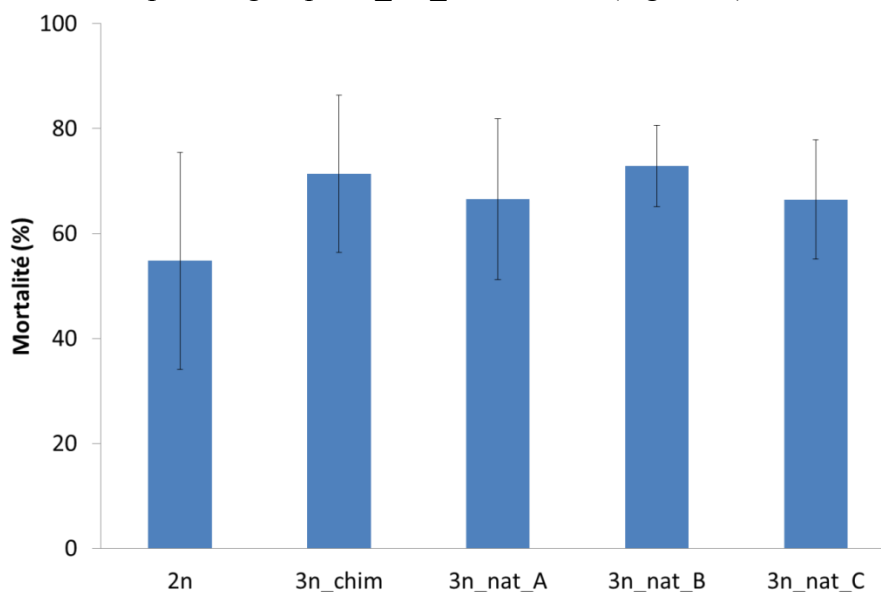


Figure 23 : Mortalité finale (moyenne % \pm écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 3 au 27 octobre 2016.

Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative ($p < 0.0001$) du temps de survie entre les groupes avec une meilleure survie pour le groupe 2n (Figure 24). Ainsi le temps de survie médian (50% des huîtres) était de 91 jours pour le groupe 2n, alors que celui du groupe 3n_nat_B n'était que de 43 jours (Figure 24).

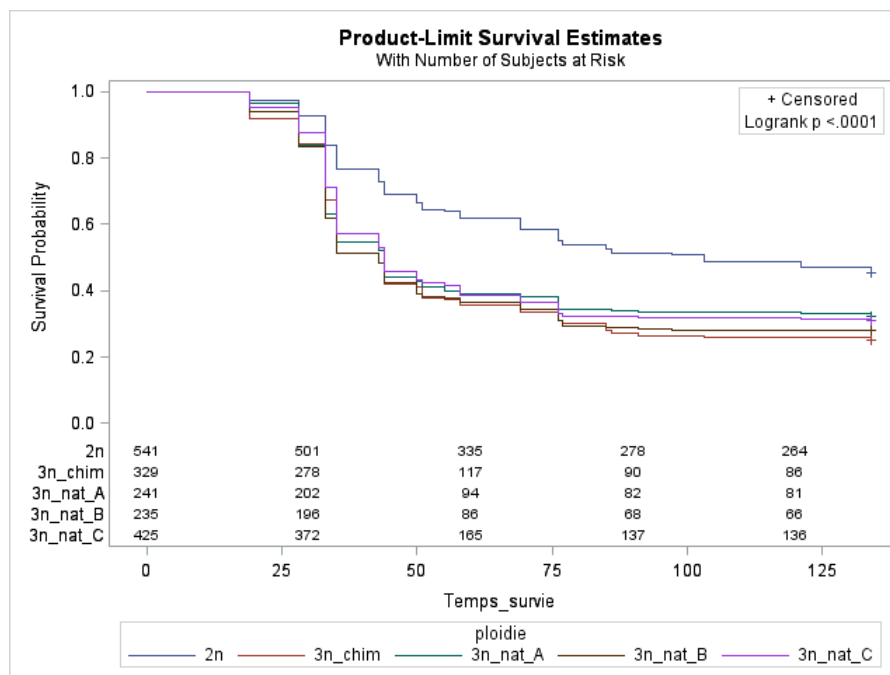


Figure 24 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 3 en laboratoire du 8 juin 2016 au 27 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 8 juin 2016.



3.4.3.1..2 Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

La comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour 6 stocks, les trois sélectionnés pour leur meilleure résistance à OsHV-1, S-V.aestu 1, S-V.aestu 3 et Sauvage_1. Excepté pour le stock S-V.aestu 1 (Figure 25), des différences significatives de survie ont pu être mises en évidence avec à chaque fois une meilleure survie des huîtres 2n. A titre d'illustration, les courbes de survies sont montrées pour le stock S-OsHV-1 3 (Figure 25).

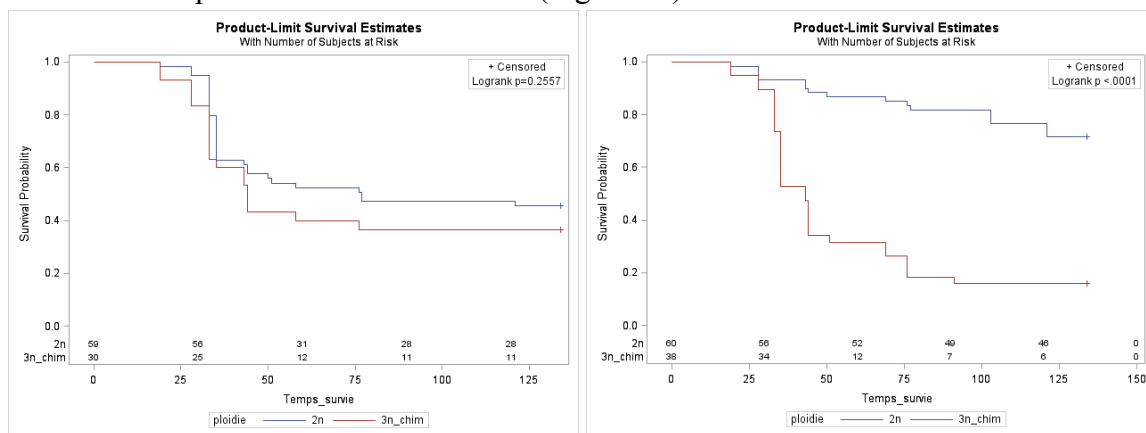


Figure 25 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lot S-V.aestu 1 (gauche) et S-OsHV-1 3 (droite) du testage 3 en laboratoire du 8 juin 2016 au 27 octobre 2016. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 8 juin 2016.

3.4.3.1..3 Comparaison entre les stocks

Les mortalités les plus faibles ont été observées pour les stocks S-OsHV-1 3 et S-V.aestu 3 (Tableau 15).

Tableau 15 : Mortalités finales au 27 octobre 2016 pour les stocks lors du testage 3 au laboratoire

Stocks	2n	3n_chim	3n_nat_A	3n_nat_B	3n_nat_C	Total général
S-OsHV-1 1	47	75	75	80	83	72
S-OsHV-1 2	77	85	72	75	80	78
S-OsHV-1 3	28	64	43	63	57	51
S-V.aestu 1	55	63				59
S-V.aestu 2			75		59	67
S-V.aestu 3	37	53	68	67	70	56
Sauvage_1	73	87			66	75
Sauvage_2		73		79	57	70
Sauvage_3	60				60	60
Total général	55	71	67	73	67	65



3.4.3.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des huîtres moribondes prélevées au cours de ces mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 99 des 100 échantillons analysés en fortes quantités (10^{+7} copies d'ADN par mg de tissu) pour l'ensemble des groupes et dans l'ensemble des bacs. A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 10 des 100 échantillons en faible quantités ($<10^{+3}$) (Tableau 16 ; Tableau 17).

Tableau 16 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 3 en laboratoire

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	8/8	15/15	11/11	10/11	18/18	62/63
	B	12/12	4/4	5/5	4/4	12/12	37/37
	Total	20/20	19/19	16/16	14/15	30/30	99/100
OsHV-1	A	1/8	2/15	1/11	0/11	2/18	6/63
	B	1/12	0/4	1/5	1/4	1/12	4/37
	Total	2/20	2/19	2/16	1/15	3/30	10/100

Tableau 17 : Quantification d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 3 en laboratoire (quantités moyennes pour les échantillons positifs)

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	4.93E+06	4.03E+06	4.49E+06	2.14E+06	2.72E+06	3.54E+06
	B	1.07E+07	2.04E+06	9.69E+06	6.43E+06	6.61E+06	7.84E+06
	Total	8.38E+06	3.61E+06	6.12E+06	3.37E+06	4.28E+06	5.15E+06
OsHV-1	A	1.29E+03	1.29E+03	1.17E+03		9.59E+02	1.16E+03
	B	1.30E+02		1.63E+03	1.34E+02	1.18E+03	7.69E+02
	Total	7.11E+02	1.29E+03	1.40E+03	1.34E+02	1.03E+03	1.00E+03

3.4.4. Testage 4 : Origine La Guillotine de septembre 2016 à février 2017

3.4.4.1. Mortalités

Les premières mortalités ont été observées la semaine suivant le transfert des lots de La Guillotine au laboratoire. Au 17 février 2017, la mortalité cumulée était en moyenne de 58% variant de 56% à 60% pour les 2 bacs.

3.4.4.1.1 Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales au 17 février 2017 étaient les plus faibles pour le groupe 2n avec 36% et les plus élevées pour le groupe 3n_nat_B avec 83% (Figure 26).

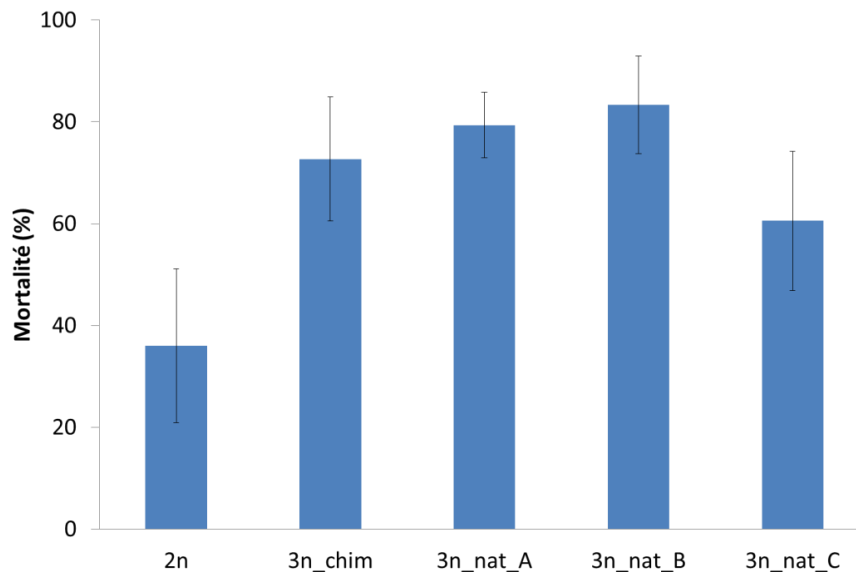


Figure 26 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 4 au 17 février 2017

Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative ($p < 0.0001$) entre les groupes avec un meilleur temps survie pour le groupe 2n (Figure 27). Le temps de survie médian (50% des huîtres) excédait 160 jours pour le groupe 2n, alors que celui du groupe 3n_nat_B n'était que de 27 jours (Figure 27).

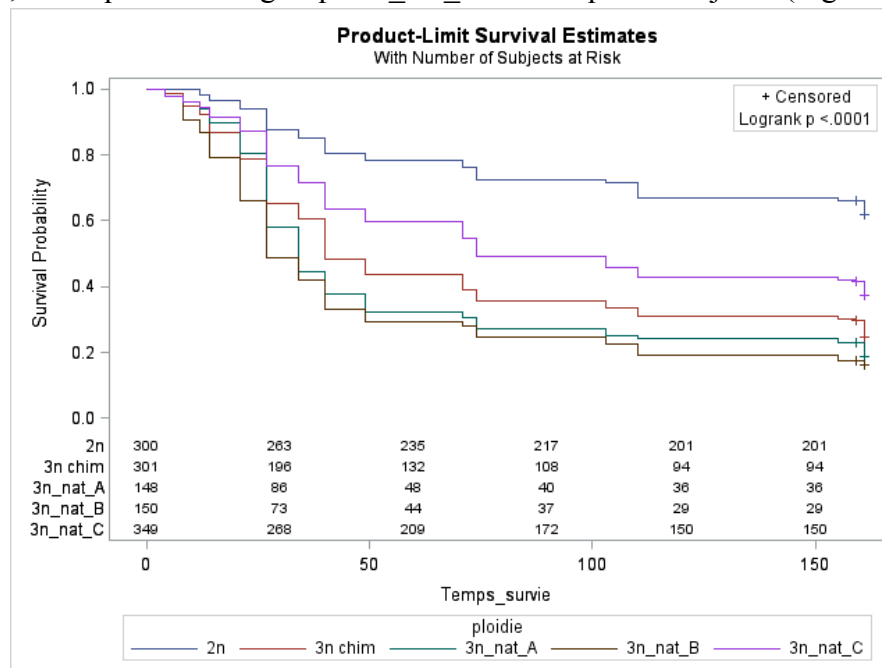


Figure 27 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 4 en laboratoire du 15 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 15 septembre 2016.



3.4.4.1..2 Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

La comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour 4 stocks (S-OsHV-1 2, S-OsHV-1 3, S-V.aestu 3 et Sauvage_1). A chaque fois, les huîtres 2n ont présenté des survies significativement supérieures à celles 3n produites par induction. A titre d'illustration, les courbes de survie sont montrées pour le stock S-V.aestu 3 (Figure 28).

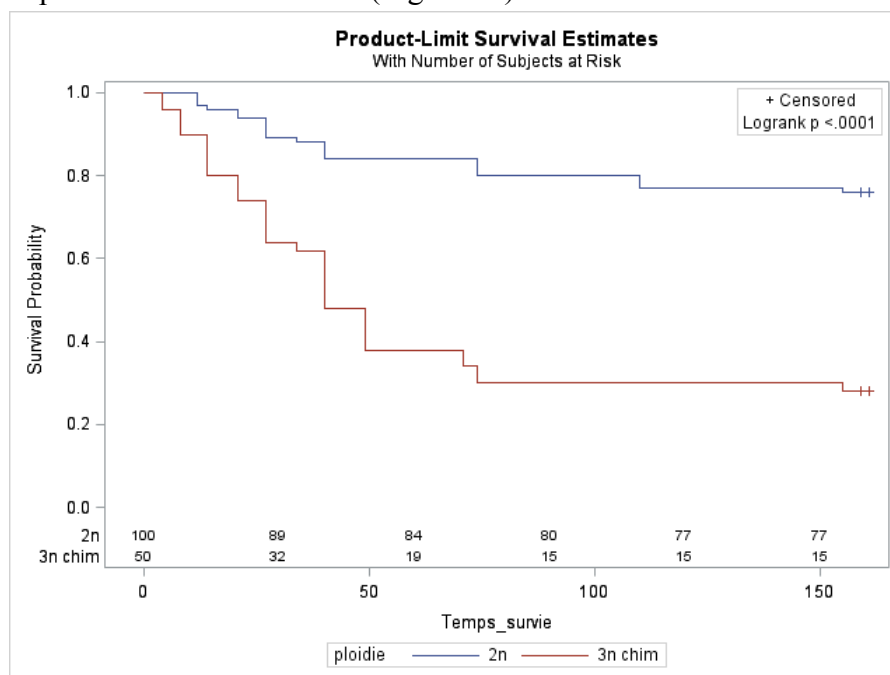


Figure 28 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour le lot S-V.aestu 3 pour le testage 4 en laboratoire du 15 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 15 septembre 2016.

3.4.4.1..3 Comparaison entre les stocks

Seuls 4 stocks 2n ont pu être testés. Les stocks S-OsHV-1 3 et S-V.aestu 3 ont présenté les mortalités les plus basses avec 22 et 24% respectivement en 2n (Tableau 18).

3.4.4.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des animaux moribonds prélevés au cours de ces mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 49 des 52 échantillons analysés en fortes quantités (10^{+7} copies d'ADN par mg de tissu) pour l'ensemble des groupes et dans l'ensemble des bacs. A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 2 des 52 échantillons en faibles quantités ($<10^{+3}$).

Tableau 18 : Mortalités finales au 17 février 2017 pour les stocks lors du testage 4 au laboratoire

Stocks	2n	3n chim	3n nat A	3n nat B	3n nat C	Total général
S-OsHV-1 1		88			66	77
S-OsHV-1 2	50	76	84	88	76	69
S-OsHV-1 3	22	58	80	72		58
S-V.aestu 1		72				72
S-V.aestu 2			74		60	67
S-V.aestu 3	24	72			64	46
Sauvage_1	54	70		90	58	68
Sauvage_2					42	42
Sauvage_3					58	58
Total général	36	73	79	83	61	63

3.4.5. Testage 5 : Origine Agnas de septembre 2016 à février 2017

3.4.5.1. Mortalités

Les premières mortalités ont été observées la semaine suivant le transfert des lots d'Agnas au laboratoire. Au 21 février 2017, la mortalité cumulée était en moyenne de 69% variant de 68% à 70% pour les 3 bacs.

3.4.5.1.1 Comparaison entre les 5 groupes

Les mortalités finales au 17 février 2017 étaient les plus faibles pour le groupe 2n avec 60% et les plus élevées pour le groupe 3n_nat_B avec 82% (Figure 29).

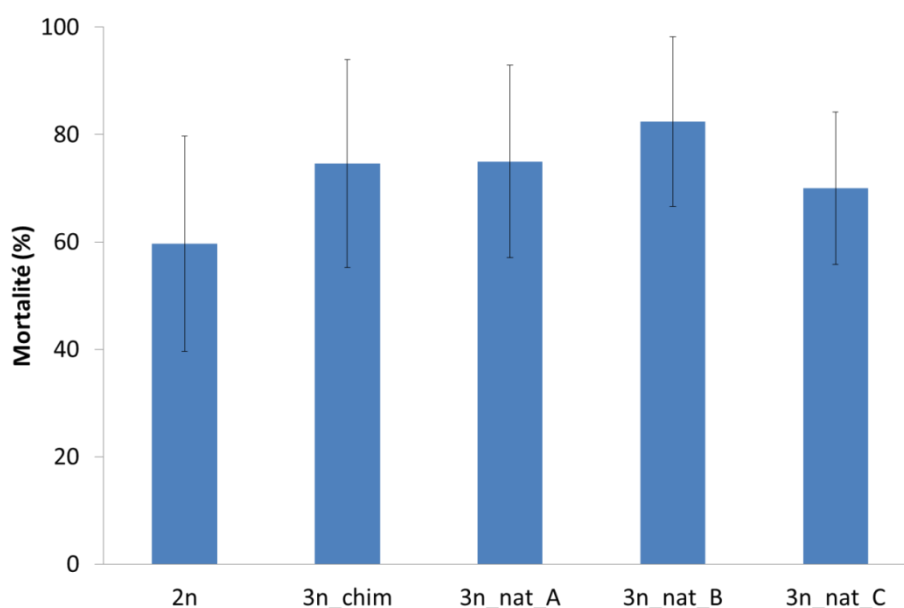


Figure 29 : Mortalité finale (moyenne % ± écart-type entre les stocks) des lots diploïdes et triploïdes testés en laboratoire pour le testage 5 au 17 février 2017.



Les courbes d'estimation de Kaplan-Meier pour la fonction de survie indiquaient une différence significative ($p < 0.0001$) entre les groupes avec une meilleure survie pour le groupe 2n (Figure 30). Ainsi le temps de survie médian (50% des huîtres) était de 63 jours pour le groupe 2n, alors que celui du groupe 3n_nat_B n'était que de 33 jours (Figure 30).

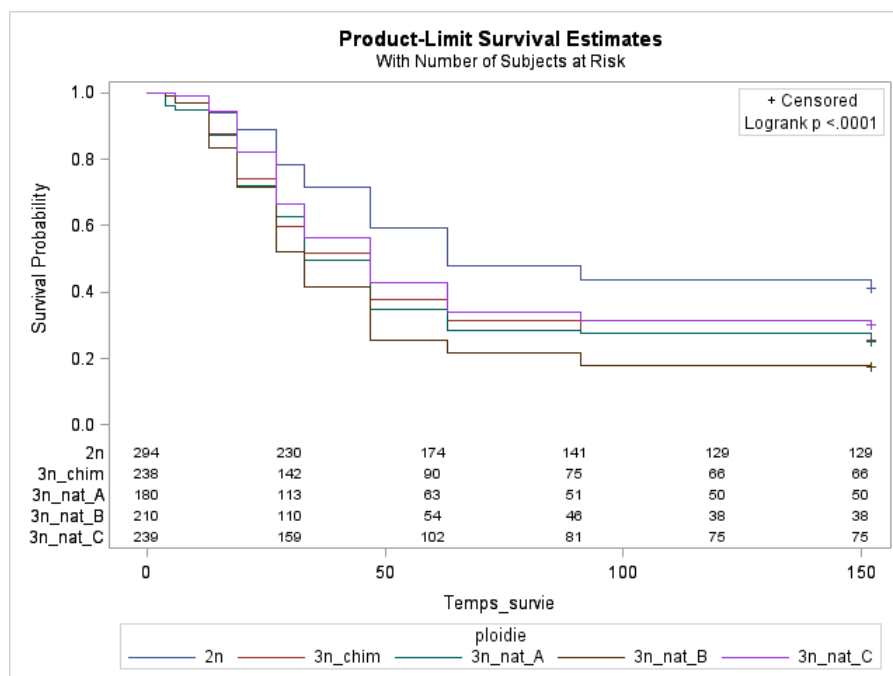


Figure 30 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes diploïdes (2n), et triploïdes pour le testage 5 en laboratoire du 21 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 21 septembre 2016.

3.4.5.1.2 Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

La comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique) a pu être réalisée pour tous les stocks sauf pour S-V.aestu 2 et Sauvage_2. Des différences significatives de survie ont pu être mises en évidence pour les stocks S-OsHV-1 2, S-OsHV-1 3, Sauvage 3 avec une meilleure survie à chaque fois pour les huîtres 2n. A titre d'illustration, les courbes de survie sont montrées pour le stock S-OsHV-1 3 (Figure 31). Pour les autres, les 2n et les 3n_chim ont montré des courbes de survie similaires (Figure 31).

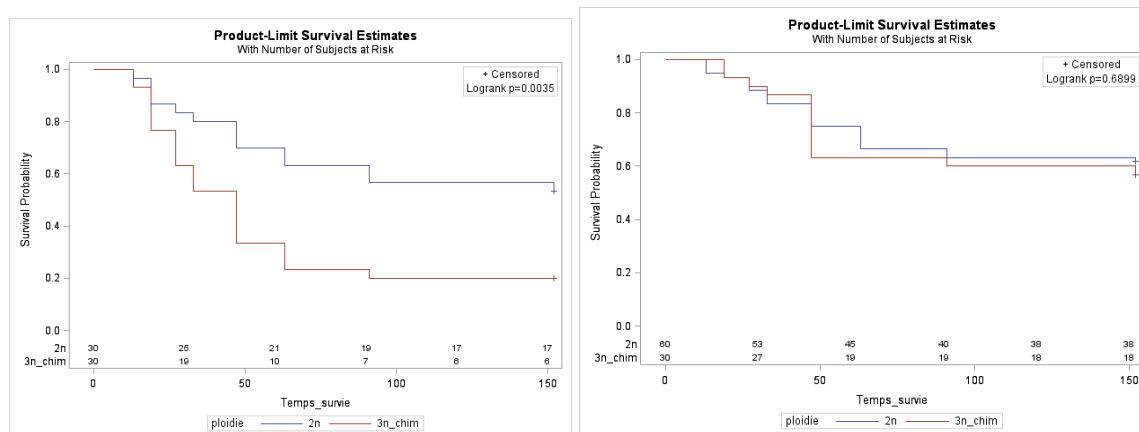


Figure 31 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n et 3n_chim pour les lots S-OsHV-1 3 (gauche) et S-V.aestu 3 (droite) du testage 5 en laboratoire du 21 septembre 2016 au 17 février 2017. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du 21 septembre 2016.

3.4.5.1..3 Comparaison entre les stocks

Les mortalités les plus faibles ont été observées pour les stocks S-OsHV-1 3 et S-V.aestu 3 (Tableau 19).

Tableau 19 : Mortalités finales au 17 février 2017 pour les stocks lors du testage 5 au laboratoire

Stocks	2n	3n chim	3n nat A	3n nat B	3n nat C	Total général
S-OsHV-1 1	77	80	90	93	67	81
S-OsHV-1 2	70	90	87	90	67	79
S-OsHV-1 3	47	80	53	73	80	67
S-V.aestu 1	67	67				67
S-V.aestu 2	70		77		70	72
S-V.aestu 3	40	43	57	87	67	55
Sauvage_1	67	77	87	77	77	77
Sauvage_2		77		73	80	77
Sauvage_3	53	83		83	53	68
Total général	60	75	75	82	70	71

3.4.5.2. Recherche d'ADN d'OsHV-1 et *V. aestuarianus*

L'analyse des animaux moribonds prélevés au cours de ces mortalités a révélé la détection d'ADN de *V. aestuarianus* pour 86 des 89 échantillons analysés en fortes quantités (10^{+7} copies d'ADN par mg de tissu) pour l'ensemble des groupes et dans l'ensemble des bacs. A l'opposé, l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 4 des 89 échantillons en faibles quantités ($<10^{+3}$) (Tableau 20 ; Tableau 21).



Tableau 20 : Détection (nombre de positifs/nombre analysés) d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 5 en laboratoire

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	4/4	6/6	6/6	6/6	6/6	28/28
	B	6/6	6/6	5/6	6/6	6/6	29/30
	C	6/6	6/6	5/6	6/6	6/7	29/31
	Total	16/16	18/18	16/18	18/18	18/18	86/89
OsHV-1	A	0/4	0/6	0/6	0/6	1/6	1/28
	B	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	1/30
	C	0/6	0/6	1/6	1/6	0/7	2/31
	Total	0/16	0/18	2/18	1/18	1/18	4/89

Tableau 21: Quantification d'ADN de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 pour des huîtres moribondes prélevées pour les groupes diploïdes et triploïdes lors du testage 5 en laboratoire (quantités moyennes pour les échantillons positifs)

	réplicat	2n	3n chim	3n_nat_ A	3n_nat_ B	3n_nat_ C	Total général
<i>V. aestuarianus</i>	A	9.09E+06	3.01E+07	2.89E+07	4.00E+07	1.28E+07	2.52E+07
	B	9.73E+06	1.37E+07	2.30E+07	1.57E+07	2.33E+07	1.69E+07
	C	3.28E+07	7.22E+06	1.69E+07	3.13E+07	5.32E+06	1.88E+07
	Total	1.82E+07	1.70E+07	2.33E+07	2.90E+07	1.38E+07	2.02E+07
OsHV-1	A					1.97E+02	1.97E+02
	B			2.98E+02			2.98E+02
	C			1.71E+02	2.71E+02		2.21E+02
	Total			2.34E+02	2.71E+02	1.97E+02	2.34E+02

3.5. Analyse globale de la sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* des lots diploïdes et triploïdes en infection expérimentale et des testages en laboratoire.

3.5.1. Comparaison entre les 5 groupes

Des différences significatives de temps de survie ont été observées entre les groupes (Figure 32). Le groupe 2n présentait un temps de survie significativement plus important par rapport à tous les groupes 3n (Tableau 22). Le groupe 3n_nat_C présentait un temps de survie significativement plus importante par rapport aux 3n_chim, 3n_nat_A et 3n_nat_B. Enfin, ces trois derniers groupes présentaient des temps de survie similaires.

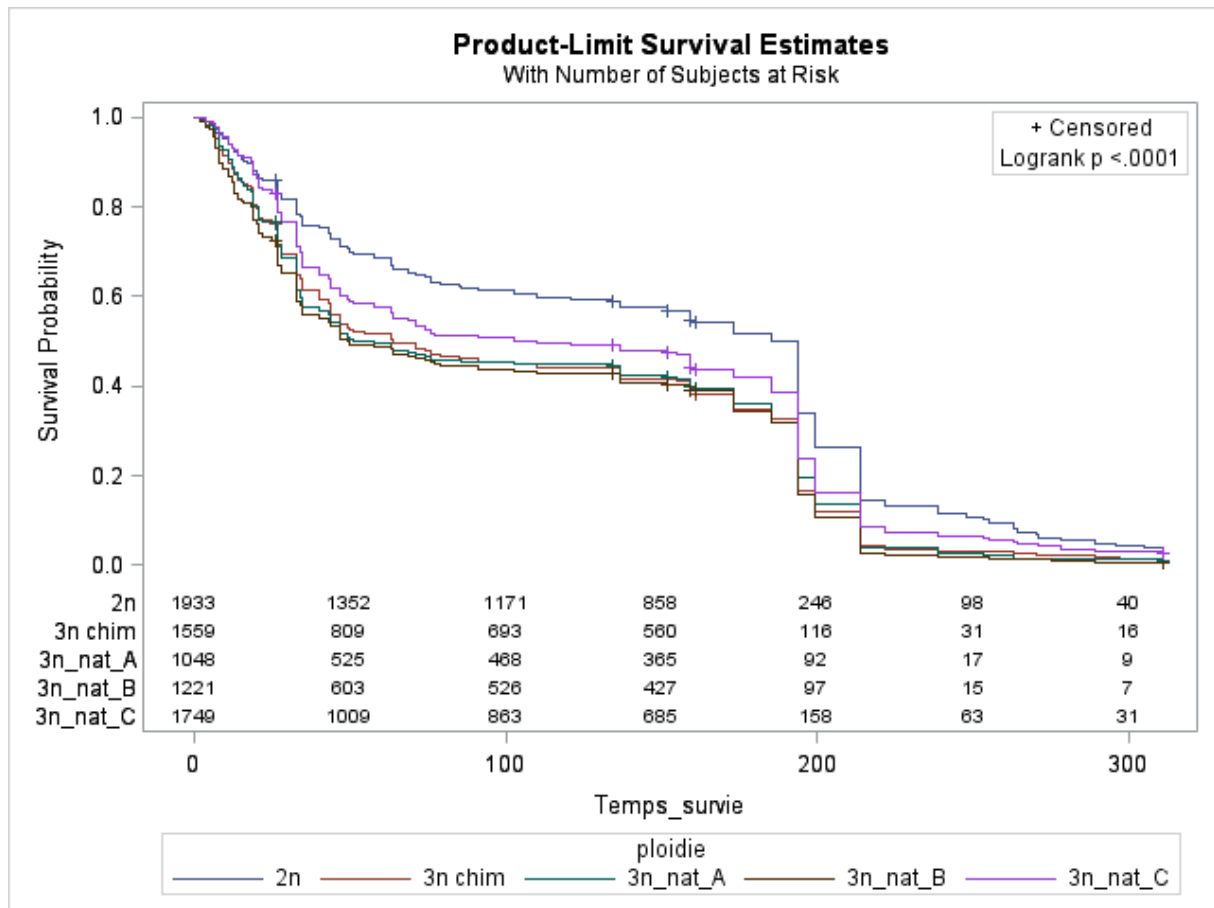


Figure 32 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n, 3n_chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C des 5 testages en laboratoire et en infection expérimentale. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du début des expériences.

Tableau 22: Comparaison par paire des fonctions de survie des 5 groupes

ploidie	ploidie	Chi-Square	p-Values
2n	3n chim	141.9	<.0001
2n	3n_nat_A	137.6	<.0001
2n	3n_nat_B	177.0	<.0001
2n	3n_nat_C	48.0	<.0001
3n chim	3n_nat_A	2.2	0.5713
3n chim	3n_nat_B	0.5	0.9611
3n chim	3n_nat_C	23.5	<.0001
3n_nat_A	3n_nat_B	5.5	0.1312
3n_nat_A	3n_nat_C	15.4	0.0008
3n_nat_B	3n_nat_C	33.8	<.0001



3.5.2. Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes ayant le même fond génétique (2n et 3n_chimique)

Des différences significatives de temps de survie ont été observées pour tous les lots, sauf pour le lot S-V.aestu 2 ($p=0,1092$), avec à chaque fois un temps de survie supérieur des huîtres 2n en comparaison des huîtres 3n_chim (Figure 33).

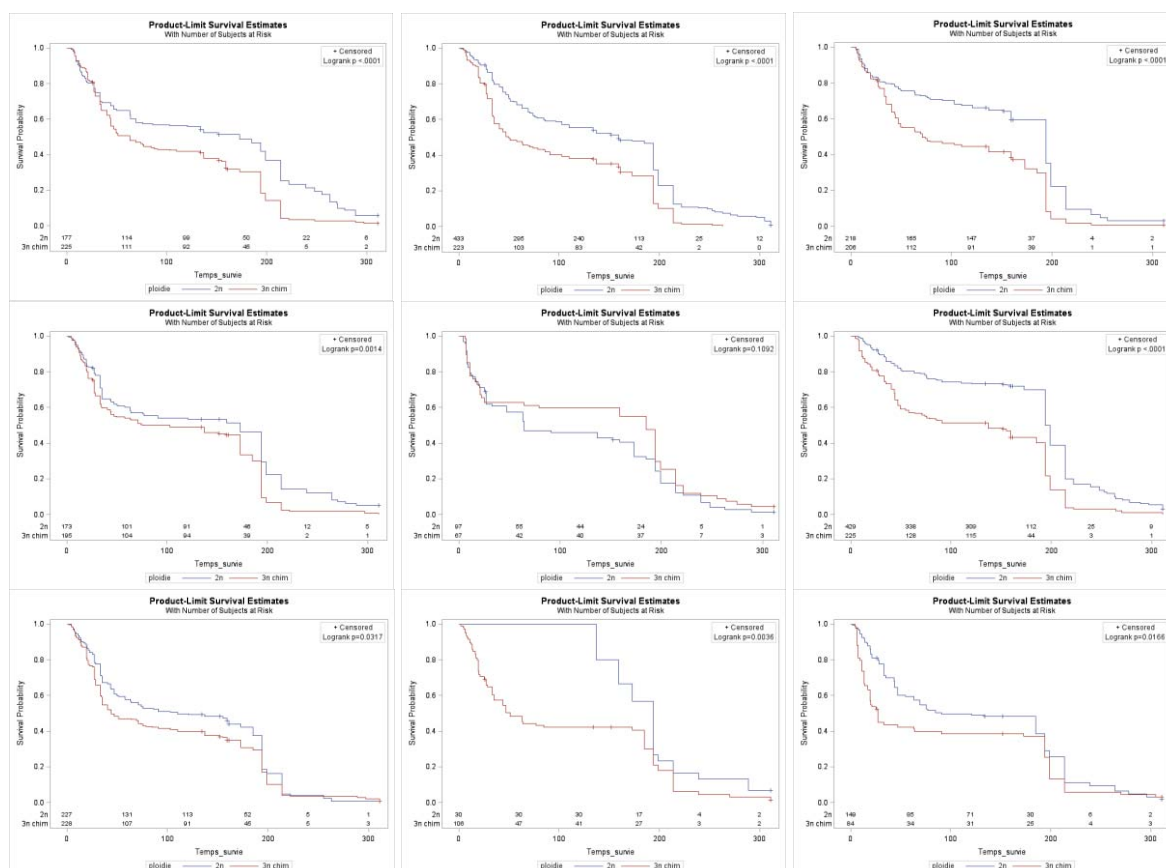


Figure 33 : Courbe de Kaplan-Meier des groupes 2n (en bleu) et 3n_chim (en rouge) des 5 testages en laboratoire et en infection expérimentale. Le temps de survie est exprimé en jour à partir du début des expériences. En haut : lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 ; au milieu : lots sélectionnés pour leur moindre sensibilité à *V. aestuarianus* ; en bas : lots sauvages. De gauche à droite, lots 1 à 3.

3.5.3. Comparaison entre les stocks

Les mortalités les plus faibles ont été observées pour les stocks S-OsHV-1 3 et S-V.aestu 3 (Tableau 23).

Tableau 23 : Mortalités globales des testages en laboratoire et en infection expérimentale.

Stocks	2n	3n chim	3n nat A	3n nat B	3n nat C	Total général
S-OsHV-1 1	74	85	88	91	76	83
S-OsHV-1 2	76	87	86	92	82	83
S-OsHV-1 3	54	83	78	79	81	75
S-V.aestu 1	73	81				77
S-V.aestu 2	89	96	81	98	75	84
S-V.aestu 3	53	73	80	84	76	69
Sauvage_1	78	86	96	91	77	84
Sauvage_2	93	82		85	70	78
Sauvage_3	70	89		91	75	78
Total général	69	83	83	88	77	78



4. Résultats – Objectif n°2 : Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à une infection à *V. aestuarianus*

4.1. Huîtres survivantes à une triple exposition à *V. aestuarianus* pour deux stocks présentant chacun des niveaux contrastés de résistance à une infection à OsHV-1.

4.1.1. Testage en mer

Les mortalités en mer ont été observées dans les 15 jours suivant la mise sur site. Au 18 août 2016, la mortalité moyenne était de 40% à d'Agnas variant de 7% pour un lot sélectionné pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1 du stock A à 92% pour un lot non sélectionné du stock A, le témoin produit à partir des huîtres sauvages ayant subi des mortalités de 80%. La recherche d'agent infectieux pour des huîtres moribondes prélevées le 08/07/16 à d'Agnas a montré que 8 individus sur 12 étaient détectés positifs pour la présence d'ADN de *V. aestuarianus* (10^{+4} à 10^{+8} copies d'ADN bactérien par mg de tissu d'huître) alors que seulement 3/12 étaient détectés positifs pour la présence d'ADN d'OSHV-1 en faibles quantités ($<10^{+3}$). Une de ces huîtres présentait une détection positive pour les deux agents pathogènes recherchés.

Pour le site de La Casse, la mortalité moyenne était de 48% variant de 7% pour un lot sélectionné pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1 du stock B à 94% pour un lot témoin du stock A, le témoin affichant une mortalité de 85%. Les trois individus moribonds prélevés le 17 août 2016 ont tous été détectés positif pour la présence d'ADN de *V. aestuarianus* (10^{+4} à 10^{+8} copies d'ADN bactérien par mg de tissu d'huître) et d'OsHV-1 (10^{+2} à 10^{+6} copies d'ADN viral par mg de tissu d'huître).

4.1.2. Testage en laboratoire

Le premier testage a débuté fin septembre 2016 et des mortalités ont été observées dès octobre. A ce jour, le premier suivi en laboratoire est en cours, et il est prématuré de présenter les premiers résultats. D'autres testages en laboratoire sont prévus d'être réalisés en 2017 afin de répliquer cette expérience et obtenir des données fiables.



4.2. Vers l'obtention de lignées d'huîtres présentant une double résistance accrue aux infections par OsHV-1 et *V. aestuarianus*

4.2.1. Testage en mer

Les données des mortalités en mer des séries C1 et C2, lesquelles étaient associées à OsHV-1, ont déjà été présentées dans le rapport 2016 de l'action AESTU (Dégremont et al., 2016a; Travers et al., 2015). Pour la série P, les mortalités ont débuté en mai 2016 sur le site d'Agnas. En juin 2016, la mortalité moyenne était de 14%, variant de 0% pour des lots sélectionnés pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1 à 100% pour un lot témoin non sélectionné. En novembre 2016, la mortalité moyenne était de 28% et variant entre les lots de 4 à 100%.

Sur le site de La Casse, il n'a pas été possible de réaliser des comptages de mortalités à l'automne (mauvaises conditions météo et accès possible uniquement avec un professionnel). Cependant, la visite effectuée le 20/07/16 indiquait le début des mortalités. Pour les huîtres moribondes échantillonnées à cet instant, 22 individus sur les 24 analysés ont été détectés positifs pour la présence d'ADN de *V. aestuarianus* avec de fortes quantités (10^{+6} copies d'ADN par mg de tissu d'huîtres) alors que seulement 2 individus ont été détectés positifs pour la présence d'ADN d'OsHV-1 avec de faibles quantités ($<10^{+3}$ copies d'ADN par mg de tissu d'huîtres).

4.2.2. Testage en laboratoire

4.2.2.1. Série C2

Alors qu'un testage est toujours en cours (C2-3 Tableau 5), les données de mortalités des deux premiers testages ont été moyennées, le but étant d'identifier des lots présentant les mortalités les plus faibles et donc une résistance accrue à l'infection à *V. aestuarianus*. La mortalité moyenne était de 97%, variant de 86% à 100% entre les lots. Les quatre meilleures familles étaient identiques pour les deux testages, et ces mêmes familles ont montré une faible mortalité en première année d'élevage en mer lors des épisodes de mortalités impliquant OsHV-1 ($<10\%$). L'ADN de *V. aestuarianus* a été détecté pour 185 individus sur 193 analysés en fortes quantités (10^{+6}), alors que l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 17 individus, généralement à de faibles quantités (10^{+3}).

4.2.2.2. Série P

Comme pour la série C2, un testage est toujours en cours (P3 Tableau 5), les données de mortalités des deux premiers testages P1 (origine Agnas) et P2 (origine La Casse) ont également été moyennées. La mortalité moyenne était de 80% à la fin des suivis variant de



55% à 94%. La famille présentant les mortalités les plus faibles pour le testage P1 est également celle qui présente les plus faibles mortalités pour le testage P2. Cette famille présente également la particularité d'avoir présenté des mortalités inférieures à 10% lors du testage en mer en 2016 (Figure 34). L'ADN de *V. aestuarianus* a été détecté pour 141 individus sur 145 analysés en fortes quantités (10^{+6}), alors que l'ADN d'OsHV-1 n'a été détecté que pour 36 individus, généralement en faibles quantités (10^{+3}).

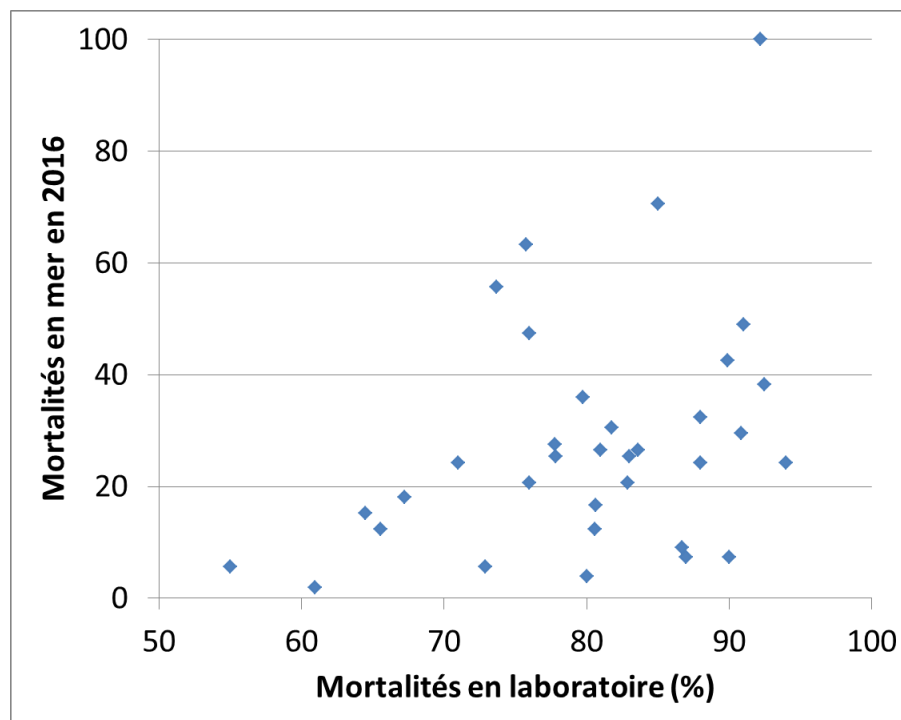


Figure 34 : Mortalités (%) en mer et en laboratoire des lots de la série P

4.3. Analyses transcriptomiques lors d'une infection expérimentale par *V. aestuarianus*

Les différentiels d'expression entre les conditions suivantes T0/J1, T0/J4 et T0/J8 montrent un nombre de transcrits significativement différent, avec plus de gènes exprimés un jour post-infection (341 gènes) par rapport aux 4^{ème} et 8^{ème} jours (195 et 19 gènes, respectivement) (Figure 35). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'après 8 jours d'infection, les huîtres infectées de la famille H40 guérissent et retrouvent une situation d'huîtres non infectées, du fait du peu de gènes différentiellement exprimés.

Il faut cependant noter que nous ne disposons d'annotation que pour certains de ces gènes. Ainsi, sur les 341 gènes modulés à J1 (avec ratio de 2 à 5,208 pour la Protéine deltex-3-like) 186 sont annotés. Sur les 195 modulés à J4 (avec ratio de 2 à 4,987 pour la Stress induced protéine 1) 109 sont annotés et enfin sur les 19 gènes modulés à J8 (avec ratio de 2 à 4,035 pour un Transporter), seulement 2 sont annotés.

Cependant parmi ces transcrits différentiellement régulés au cours du temps et annotés, nous avons pu noter un certain nombre de gènes d'intérêt. Après un jour d'infection, il a été observé une lectine de type C fortement exprimée, le gène codant pour la laccase et plusieurs gènes impliqués dans la voie de l'apoptose (inducteurs ou inhibiteurs). Certains de ces gènes sont exprimés aussi après 4 et 8 jours d'infection. Ces premiers résultats vont être confirmés par PCR en temps réel sur ces gènes candidats afin de confirmer leur niveau d'expression.

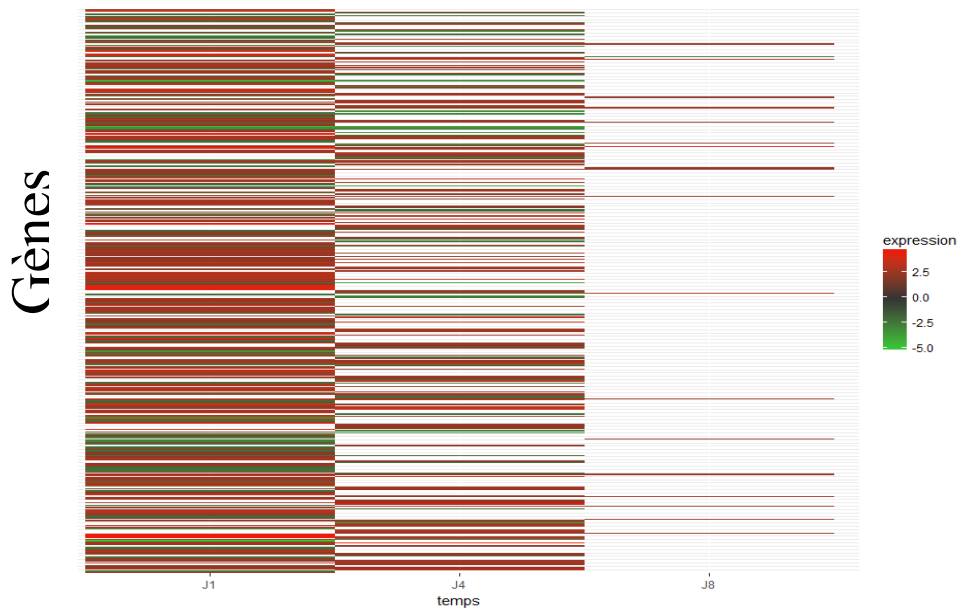


Figure 35 : Heatmap des gènes différentiellement exprimés pour la famille H40 infectée par la bactérie *Vibrio aestuarianus* après 1, 4 et 8 jours. (Supérieur à 2 ou -2 et ayant une p value <0,05)

5. Discussion

5.1. Objectif 1 : Rôle de la ploïdie chez *C. gigas* dans la sensibilité aux infections à *V. aestuarianus* et à OsHV-1

5.1.1. Testages 2015 (première année d'élevage) : sensibilité à l'infection par OsHV-1

Une partie de la profession rapporte que les huîtres triploïdes seraient plus fragiles et montreraient des mortalités causées par *V. aestuarianus* plus importantes aux stades adultes. Des études préliminaires à partir de stocks d'huîtres diploïdes et triploïdes d'ostréiculteurs font état de résultats contrastés avec une mortalité plus importante des triploïdes dans le bassin d'Arcachon (Bechade, 2015), des mortalités similaires entre diploïdes et triploïdes dans le traict de Pen-Bé-Mesquer (Glize and Cesbron, 2015b) et enfin des mortalités plus importantes des diploïdes en Bernerie-en-Retz (Glize and Cesbron, 2015a). Il n'a pas pu être conclu à une tendance nette d'une plus grande sensibilité d'un des niveaux de ploïdie. Cependant, ces résultats préliminaires sont faussés par des fonds génétiques variés, et des parcours zootechniques différents.

La comparaison de la sensibilité des huîtres diploïdes et triploïdes face à l'infection causée par la bactérie *V. aestuarianus* a donc été initiée à grande échelle en 2015 en utilisant trois groupes d'huîtres : (1) des huîtres sauvages, (2) huîtres sélectionnées pour leur résistance accrue à l'infection par OsHV-1 et (3) des huîtres sélectionnées pour leur moindre sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus*. Pour chaque groupe, trois lots ont été utilisés pour ne pas confondre les facteurs lot, sélection et ploïdie.

La comparaison de la sensibilité des huîtres diploïdes et triploïdes est réalisée de deux façons. La première étant de produire pour chacun des 9 lots testées, des diploïdes (2n) et des triploïdes (3n_chim) en utilisant les mêmes géniteurs. La rétention d'un des globules polaires, permet ainsi de tester exactement les mêmes fonds génétiques et de réellement tester le niveau de la ploïdie. Cependant, ce type de production d'huîtres triploïdes par induction à partir d'huîtres diploïdes, n'est plus utilisé ou de façon marginale par les écloséries françaises. La seconde comparaison est donc également particulièrement intéressante car elle teste les huîtres triploïdes majoritairement produites par les écloséries par le croisement d'huîtres femelles diploïdes avec des huîtres mâles tétraploïdes (4n). Pour cette seconde méthode, trois stocks d'huîtres tétraploïdes, dont celui utilisé par les écloséries, ont également été évalués à grande échelle pour la première fois. Au total, 9 lots diploïdes, 9 lots triploïdes produits par induction, et 27 lots triploïdes produits par croisement entre des diploïdes et des tétraploïdes, ont été produits pour ce testage.

Le testage de ces lots a été initié dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron avec une exposition aux agents pathogènes naturellement présents dans l'environnement. En première année d'élevage, il n'a pas été observé de différence de mortalité entre les huîtres 2n et 3n_chim confirmant des études similaires (Dégremont et al., 2016b). Au contraire, la mortalité moyenne a été la plus élevée (75%) pour les huîtres sauvages, intermédiaire pour les

lots sélectionnés pour leur moindre sensibilité à *V. aestuarianus* (45%) et les plus faibles pour les lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 (13%) (Figure 2). Les mortalités ont été attribuées à l'infection par OsHV-1.

Concernant les huîtres triploïdes produites par croisement entre des 2n et 4n, des différences de mortalités ont également été observées entre les groupes 3n avec une meilleure résistance des huîtres 3n_nat_C (Figure 3). Ces différences sont attribuées au niveau de sélection de ces stocks tétraploïdes, lequel visait une meilleure résistance face à l'infection à OsHV-1. Ce résultat confirme un transfert du progrès génétique des 2n vers les 4n avec un gain de survie des 3n correspondant (Chavanne et al., 2013).

5.1.2. Testages 2016 (seconde année d'élevage) : résistance à l'infection par *V. aestuarianus*

La détection à de fortes quantités d'ADN bactérien dans pratiquement toutes les huîtres moribondes (380 positifs pour 398 analysées) pour les testages en laboratoire et en infection expérimentale **suggère la forte implication de cet agent pathogène dans les mortalités observées**. Au contraire, le rôle d'OsHV-1 semble plus que limité avec seulement 46 huîtres détectées positives avec de faibles quantités. Cette détection est plus typique soit de porteurs asymptomatiques, les animaux testés ayant survécu à des épisodes de mortalités par OsHV-1 en mer en 2015 (Dégremont et al., 2013), soit à des traces d'ADN viral dégradé présentes dans l'eau de mer.

Alors que les groupes diploïdes et triploïdes ont été testés avec la souche virulente de *V. aestuarianus* 02/041 en infection expérimentale, les groupes testés en laboratoire ont été naturellement infectés en mer par une ou plusieurs souches de *V. aestuarianus*. Le transfert des groupes au laboratoire et les conditions de testage (densité, renouvellement en eau de mer...) ont permis d'observer des mortalités induites par la bactérie. Ce type de protocole avec une contamination possible des animaux en condition d'élevage en mer, puis testage en laboratoire, a d'ailleurs été réalisé avec succès dès 2001 pour tester la résistance à l'infection par OsHV-1 pour du naissain de *C. gigas* (Dégremont et al., 2010), ces résultats ayant également été confirmés plus récemment (Petton et al., 2015). Les mortalités observées en infection expérimentale ont été plus rapides que celles obtenues lors des 5 testages en laboratoire. Cette différence est probablement causée par le renouvellement continu de l'eau de mer pour les testages en laboratoire avec un effet de dilution, alors qu'en infection expérimentale, l'eau n'a été renouvelée qu'à trois reprises au cours du suivi. Associées à la proximité des huîtres, ces conditions ont favorisé l'infection des animaux comme observé pour OsHV-1 chez du naissain *C. gigas* (Petton et al., 2015).

L'un des principaux résultats de ces suivis montre que toutes les huîtres, peu importe leur niveau de ploïdie (2n ou 3n) ou leur niveau de sélection (non sélectionné, sélectionné pour leur meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 ou sélectionné pour leur moindre sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*), connaissent des mortalités importantes en



laboratoire ou en infection expérimentales par *V. aestuarianus*, atteignant souvent plus de 90% à la fin des suivis. Néanmoins, les mortalités observées en mer en 2016 ont été beaucoup plus limitées variant de 15 à 30% en fonction des groupes (2n, 3n-chim, 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C) (Tableau 6 & Tableau 7). Les conditions de testages en laboratoire ont favorisé l'infection bactérienne avec une forte intensité de sélection, mais pour les deux types de testages (en mer et en laboratoire), les mortalités les plus faibles ont été observées pour les groupes 2n et 3n_nat_C, alors que les mortalités les plus importantes l'ont été pour le groupe 3n_nat_B (Figure 4 ; Figure 32).

Alors que le niveau de la ploïdie n'influence pas la sensibilité ou la résistance de *C. gigas* face à OsHV-1 (Figure 2 & Figure 3), **il apparaît que les huîtres diploïdes sont moins sensibles à l'infection par *V. aestuarianus* que les huîtres triploïdes** (Figure 32 & Tableau 22). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés récemment pour des testages en infections expérimentales par *V. aestuarianus* (Azéma et al., 2016). Cependant, Azéma et al. (2016) avaient utilisé des huîtres n'ayant pas connu au préalable des mortalités dues à l'infection par OsHV-1, alors que les professionnels disposent rarement d'un tel matériel du fait de la très large distribution du virus sur le littoral français. Dans notre étude, les huîtres utilisées ont survécu aux mortalités induites par OsHV-1, et les huîtres diploïdes ont présenté également une moindre sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* que les huîtres triploïdes (Figure 33).

Dans le cadre de l'action AESTU, l'existence d'une composante génétique dans la sensibilité à l'infection due à la bactérie *V. aestuarianus* a été démontrée (Azéma et al., 2017a). On retrouve de nouveau des différences de sensibilité entre les stocks, notamment pour les testages 3, 4 et 5 pour lesquels les mortalités moyennes finales cumulées (<70%) étaient moindres par rapport aux autres testages (>85%). Les lots diploïdes S.V.aestu 3 et S.OsHV-1 3 ont présenté une capacité accrue à résister à l'infection bactérienne (Tableau 15, Tableau 18 & Tableau 19). Les lots sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 avaient été au préalable testés pour leur sensibilité à *V. aestuarianus* dans le cadre d'AESTU sauf S-OsHV-3. Ce lot a été produit à partir de parents sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection à OsHV-1 lesquels avaient été injectés avec *V. aestuarianus* lors d'une infection expérimentale. La résistance à l'infection à *V. aestuarianus* étant un caractère avec une héritabilité faible à modérée et en l'absence de corrélation génétique entre la résistance à l'infection virale et la résistance à l'infection bactérienne, ce lot possède maintenant la capacité d'une double résistance accrue (Azéma et al., 2017a). La double résistance est également observée pour le lot V.aestu 3 (Figure 2 & Figure 28).

Comme pour les stocks diploïdes, des différences de sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* ont été observées entre les 3n_nat_A, 3n_nat_B et 3n_nat_C. Ces groupes partagent les mêmes mères, mais proviennent de différents stocks d'huîtres tétraploïdes. D'après l'infection expérimentale et les 5 testages en laboratoire, le groupe 3n_nat_C a présenté une résistance accrue à l'infection par *V. aestuarianus* par rapport aux autres groupes 3n (Figure 33). Ce stock possède comme fond génétique une partie du lot S-OsHV-1 3, indiquant que le transfert du progrès génétique du compartiment diploïde vers le compartiment tétraploïde est possible. Au contraire, le groupe 3n_nat_B a systématiquement

présenté la plus forte sensibilité à l'infection bactérienne pour toutes les expériences (Figure 33 ; Tableau 8 ; Tableau 11 ; Tableau 13 ; Tableau 15 ; Tableau 18 ; Tableau 19). **Cette étude révèle pour la première fois dans la littérature qu'il serait possible de diminuer les mortalités induites par *V. aestuarianus* des huîtres triploïdes de *C. gigas* produites par croisement entre des huîtres diploïdes et tétraploïdes en utilisant pour chaque niveau de ploïdie des huîtres sélectionnées.**

Enfin, les huîtres 3n_nat_C ont également présenté les plus faibles mortalités dues à l'infection par OsHV-1 en 2015 (Figure 3). Comme pour les huîtres diploïdes, il serait donc possible de produire des huîtres triploïdes lesquelles présenteraient la capacité d'une double résistance accrue aux infections à OsHV-1 et *V.aestuarianus*. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus chez *Crassostrea virginica* montrant une double résistance accrue à *Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelsoni* lorsque les huîtres triploïdes étaient produites à partir de stocks 2n et 4n sélectionnés (Dégremont et al., 2012).

5.1.3. Bilan mortalité, croissance et rendement d'élevage pour le testage en mer

Alors que les testages en laboratoire ont focalisé sur le testage des lots face à *V. aestuarianus*, il est important d'analyser les résultats des testages en condition d'élevage professionnel. A la fin du suivi en septembre 2016, les huîtres étaient âgées de 20 mois. Elles ont été élevées en zone intertidale pendant 16 mois dans deux sites d'élevages du bassin de Marennes-Oléron. Elles ont donc été exposées aux agents pathogènes naturellement présents dans ces environnements. Tous les stocks sélectionnés, excepté le stock S-V.aestu2, ont présenté une mortalité cumulée finale inférieure à 50% (Figure 7), confirmant l'intérêt pour améliorer le gain génétique des stocks sélectionnés pour leur meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 (Dégremont et al., 2015). Le gain génétique pour améliorer la survie est également positif pour *V. aesturianus* mais il est nécessaire d'utiliser des stocks préalablement sélectionnés pour une meilleure résistance au virus. En effet le lot S-V.aestu2 a été identifié comme particulièrement sensible à l'infection par OsHV-1, annihilant totalement le potentiel d'amélioration pour une meilleure résistance à l'infection par *V. aesturianus*.

A la fin du suivi, une majorité des huîtres 3n_nat ont atteint la taille commerciale (Figure 8 & Figure 9). Cet avantage d'une meilleure croissance des huîtres 3n par rapport aux huîtres 2n a l'avantage de réduire le cycle d'élevage et donc de réduire le temps d'exposition à *V. aestuarianus*. Ainsi, même si les huîtres 3n ont présenté une mortalité supérieure de 10 à 20% en valeur absolue par rapport aux huîtres 2n (Figure 4 & Tableau 23), les huîtres 2n auraient besoin d'une année supplémentaire pour atteindre la taille des huîtres 3n. Hors, il a été observé qu'une année de testage en mer pour des juvéniles/adultes équivalait à une mortalité d'environ 15% pour les 2n (Figure 4). Dans le cas de cette hypothèse, les taux de mortalités seraient alors similaires pour une taille marchande identique des 2n et 3n.



Enfin, le rendement d'élevage observé en septembre 2016 était de loin le meilleur pour les huîtres produites à partir du stock 4nC, à savoir celui dont le progrès génétique pour améliorer la résistance à OsHV-1 est le plus abouti (Figure 12). De façon identique, les stocks sélectionnés, hormis le stock S-V. aestu2, ont également présenté des rendements très importants par rapport aux stocks sauvages (Figure 13). Il en résulte que l'utilisation de stocks 2n et 4n tous deux sélectionnés, permet d'obtenir des huîtres triploïdes ayant des rendements d'élevage très élevés avec une biomasse multiplié par 57 et 65 en 16 mois d'élevage pour les lots 3n_nat_C utilisant les stocks S-V. aestu3 et S-OsHV-1 3, respectivement (Figure 11). Il est également à rappeler que ces deux stocks ont présenté les meilleures de résistance à l'infection par *V. aestuarianus* en laboratoire (Tableau 23).

5.2. Objectif n°2 : Réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à une infection à *V. aestuarianus*

L'obtention de lots d'huîtres présentant une résistance accrue à l'infection par *V. aestuarianus* est primordiale pour comprendre les mécanismes sous-jacents de l'infection chez l'hôte et du pouvoir infectieux de l'agent pathogène. L'amélioration génétique par la sélection pour une meilleure résistance à l'infection bactérienne est également importante pour apporter des connaissances permettant d'aider au développement de programme de sélection.

Lors des précédents travaux réalisés dans le cadre de l'action AESTU, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la sensibilité à l'infection par l'herpès virus OsHV-1 et la sensibilité à l'infection par la bactérie *V. aestuarianus* à chaque âge/poids testé (Azéma et al., 2017a). En d'autres termes, la sélection d'animaux pour leur résistance à l'infection virale ne devrait pas influencer la sensibilité de ces animaux à l'infection bactérienne. Il serait également possible d'obtenir des lots présentant une double résistance accrue. Néanmoins, la faible héritabilité du caractère résistance à l'infection bactérienne suggère qu'il serait plus opportun de travailler en sélection familiale que massale, d'où le choix de tester un grand nombre de familles depuis 2014. En parallèle, une sélection massale a également été entreprise à partir de lots testés en infection expérimentale et pour lesquels une forte intensité de sélection a été réalisée (Azéma et al., 2015).

Pour chaque série de croisements, les testages en laboratoire ont montré que les mortalités observées étaient principalement liées à l'infection à *V. aestuarianus*. Une partie des huîtres a donc été contaminée lors de leur passage en mer dans le bassin de Marennes-Oléron, puis les conditions de testages en laboratoire (bac avec renouvellement d'eau de mer traitée aux UV) ont permis à l'agent pathogène d'induire une infection exprimée. Ce résultat est en adéquation avec ceux observés pour les testages des huîtres 2n et 3n (voir 5.1.2).

Depuis 2014, de nombreux testages ont été effectués ou sont actuellement en cours au laboratoire. Il est également prévu d'en débiter d'autres en 2017 à partir d'animaux restés en

mer depuis la première année d'élevage. Cette répétition de testage a pour principal objectif de tester des lots à des âges et des stades physiologiques différents, sachant que la sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* chez *C. gigas* augmente avec l'âge et la taille (Azéma et al., 2017a). L'analyse globale des résultats à la fin des testages permettra d'établir le rang des familles pour leur résistance à l'infection à *V. aestuarianus* et OsHV-1, et de s'assurer que le classement final est la conséquence des capacités de résistance des huîtres aux agents pathogènes et non d'effets environnementaux.

Les premiers résultats ont identifié des familles présentant une double résistance accrue aux infections à *V. aestuarianus* et OsHV-1. Cependant, les mortalités de ces familles dans les conditions de testages en laboratoire ont été élevées atteignant parfois 100% de mortalités. Néanmoins, ces conditions de testages sont particulières et elles ne sont pas représentatives de la pression infectieuse dans les élevages.

Les premiers résultats du RNAseq sont encourageants dans l'étude du transcriptome de *C. gigas* infectée expérimentalement par la bactérie *V. aestuarianus*. Nous pouvons voir une réponse de l'huître fortement marquée avec un grand nombre de gènes différentiellement exprimés après un jour par rapport à J4 et J8. Une étude fonctionnelle de ces gènes candidats va être réalisée afin de mettre en évidence les voies impliquées dans la résistance à cette bactérie. L'analyse du transcriptome pour la famille H4, présentant une sensibilité différente à l'infection bactérienne, va être réalisée dans l'année 2017 et les gènes candidats vont être analysés par PCR en temps réel.

6. Conclusions générales

Les objectifs de cette étude visaient principalement (1) à étudier la sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* d'huîtres diploïdes et triploïdes utilisant des plusieurs fonds génétiques, sélectionné pour une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1, une moindre sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* et des huîtres sauvages échantillonnées dans le bassin de Marennes-Oléron, et (2) d'étudier la réponse à la sélection pour l'amélioration de la résistance à l'infection bactérienne.

La comparaison de la sensibilité des huîtres diploïdes et triploïdes a permis de vérifier que les huîtres diploïdes et triploïdes présentaient une sensibilité similaire à l'infection par OsHV-1. Dans les conditions testées, les animaux survivants ont cependant montré une plus grande sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* pour des huîtres triploïdes, même si les deux niveaux de ploïdies connaissent des mortalités importantes dans les conditions de testages en laboratoire.

L'importance du fond génétique est de nouveau mise en évidence avec des mortalités moindres dues à l'infection à OsHV-1 pour les lots sélectionnés résistants à cet agent pathogène, intermédiaire pour ceux sélectionnés vis-à-vis de l'infection à *V. aestuarianus*, et



importantes pour les animaux sauvages. Dans une moindre mesure, la sensibilité à l'infection à *V. aestuarianus* a été la moins élevée pour l'un des stocks sélectionnés pour cet agent pathogène, mais également pour l'un des stocks sélectionnés pour sa meilleure résistance à l'infection par OsHV-1, soulignant une double résistance accrue.

Les performances des huîtres triploïdes produites par croisement entre des huîtres diploïdes et tétraploïdes ont également montré l'importance du fond génétique des parents. Ainsi, les huîtres tétraploïdes du stock C ont présenté le double avantage d'observer des mortalités moindres dues à l'infection par OsHV-1 chez leurs descendants triploïdes et dans une moindre mesure, également des mortalités moindres dues à l'infection par *V. aestuarianus*.

Les nombreux testages récents visant à l'obtention d'huîtres sélectionnées pour une double résistance accrue aux infections à OsHV-1 et *V. aestuarianus* ont montré que certaines familles présentaient cette caractéristique. Ces familles sont toujours en cours d'évaluation, et la prochaine étape consistera à les reproduire pour évaluer leur réponse à la sélection. Les animaux survivant à des infections expérimentales ont été reproduits avec succès en 2016, et l'évaluation de la réponse à la sélection est en cours. Il faudra attendre la fin 2017 pour acquérir les derniers résultats.

7. Valorisation

En complément des travaux décrits ci-dessus, une valorisation scientifique des données acquises de l'action AESTU a été entreprise en 2016 avec la publication de trois articles de rang A pour lesquels le soutien financier de la DPMA a été souligné dans les remerciements :

Azéma P, Lamy J-B, Boudry P, Renault T, Travers M-A, Dégremont L. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*. 2017;49:23

Azéma P, Maurouard E, Lamy J-B, Dégremont L. The use of size and growing height to improve *Crassostrea gigas* farming and breeding techniques against OsHV-1. *Aquaculture*. 2017;471:121-9.

Azéma P, Travers M-A, Benabdelmouna A, Dégremont L. Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *J Invertebr Pathol*. 2016;139:92-101.



8. Références bibliographiques

- Azéma, P., et al., 2017a. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*. 49, 23.
- Azéma, P., et al., 2017b. The use of size and growing height to improve *Crassostrea gigas* farming and breeding techniques against OsHV-1. *Aquaculture*. 471, 121-129.
- Azéma, P., et al., 2016. Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal of Invertebrate Pathology*. 139, 92-101.
- Azéma, P., et al., 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Veterinary Research*. 46, 139.
- Barranger, A., et al., 2014. Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology*. 146, 93-104.
- Bechade, M., Suivi de l'évolution des mortalités de naissains et adultes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon au cours de l'été 2015. In: C. R. C. A. Aquitaine, (Ed.), Gujan-Mestras, 2015, pp. 25.
- Chavanne, H., et al., Plan de sauvegarde 2011 : synthèse de résultats 2011-2012. 2013.
- Dégremont, L., et al., Mortalités d'huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*) et infection à *Vibrio aestuarianus*– AESTU 3. 2016a.
- Dégremont, L., et al., 2012. Triploid Oysters in the Chesapeake Bay: Comparison of Diploid and Triploid *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*. 31, 21-31.
- Dégremont, L., et al., 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture*. 408-409, 51-57.
- Dégremont, L., et al., 2016b. Effect of ploidy on the mortality of *Crassostrea gigas* spat caused by OsHV-1 in France using unselected and selected OsHV-1 resistant oysters. *Aquaculture Research*. 47, 777-786.
- Dégremont, L., et al., 2015. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture*. 446, 111-121.
- Dégremont, L., et al., 2010. Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions and in comparison with field performance. *Journal of Shellfish Research*. 29, 847-856.
- Garnier, M., et al., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 31, 358-365.
- Glize, P., Cesbron, R., Suivi de la mortalité de l'huître creuse. Bilan final 2015. In: SMIDAP, (Ed.), 2015a, pp. 9.



- Glize, P., Cesbron, R., Suivi des populations d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) élevées dans le traict de Pen-Bé-Mesquer. Programme PENHUIT 2. In: SMIDAP, (Ed.), 2015b, pp. 32.
- Goudenège, D., et al., 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environmental Microbiology*. 17, 4189-4199.
- Pépin, J. F., et al., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 149, 269-276.
- Petton, B., et al., 2015. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*. 6, 205-222.
- Saulnier, D., et al., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*. 77, 191-197.
- Travers, M.-A., et al., Mortalités d'huîtres creuses adultes (*C. gigas*) et infection à *V. aestuarianus*-AESTU +. Journée de restitution convention 2014 Ifremer/DPMA. 20 mai 2015, Nantes, 2015.
- Travers, M.-A., et al., Mortalités d'huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*) et infection à *Vibrio aestuarianus* - AESTU. 2014.
- Zhang, X. J., et al., 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the cultured tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Gunther. *Journal of Fish Diseases*. 34, 57-64.

