

Département 'Ressources Biologiques et Environnement' RBE

Laboratoire UMR IHPE 'Interaction Hôte Pathogène Environnement'
Equipe MIMM 'Mécanismes d'Interaction et Adaptation en Milieu Marin'
Montpellier et Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins

Evelyne Bachère
Lionel Dégremont

ACOBION, Montpellier

David Piquemal
Roman Bruno
Florian Noguier



Signature d'expression de gènes, Marqueur prédictif de capacités de survie chez l'huître *Crassostrea gigas*



Coordination & rédaction : Evelyne Bachère
Mars 2017
Convention DPMA-Ifremer 2016-16/1212569

**Signature d'expression de gènes,
marqueur prédictif
de capacités de survie
chez l'huître *Crassostrea gigas***

Rapport scientifique de l'action PREDIGENE
Convention DPMA-Ifremer 2016-16/1212569

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : restreinte : X interdite : <input type="checkbox"/>		date de publication : nombre de pages : 30 bibliographie : oui illustration(s) : 9 figures et 5 tables langue du rapport : Français	
Validé par : Adresse électronique :			
Titre de l'article : PREDIGENE Signature d'expression de gènes : marqueur prédictif de meilleures capacités de survie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> aux phénomènes de mortalités			
Contrat n°		Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>	
Auteurs principaux : Evelyne Bachère Lionel Dégremont		Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / UMR IHPE 'Interaction Hôte Pathogène Environnement' / Equipe MIMM 'Mécanismes d'Interaction et Adaptation en Milieu Marin' / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins ACOBIOM, Montpellier	
Contributeurs extérieurs: David Piquemal Roman Bruno Florian Noguier			
Contributeurs Yannick Gueguen Marine Salou Elodie Fleury Wilfried Louis Charlotte Berha Valérian Le Roy Hubert Palvadeau Manuella Rabiller Serge Mortreux Patrick Legall		Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / UMR IHPE 'Interaction Hôte Pathogène Environnement' Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins / Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture Ifremer / Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes / Unité Littoral / Laboratoire Environnement Ressources Normandie / Laboratoire Environnement Ressources Languedoc Roussillon	
Cadre de la recherche : Action PREDIGENE- Convention DPMA-Ifremer 2016-			
Destinataire : DPMA-Ifremer			

Résumé

Dans le contexte des mortalités massives d'huîtres *Crassostrea gigas*, les mécanismes moléculaires et les **bases génétiques impliquées dans la capacité de survie** des huîtres ont été explorées par des approches de génomique à très haut débit. Ces travaux se sont centrés dans un premier temps sur la survie à des infections par des *Vibrio* virulents pour lesquels des infections expérimentales étaient reproductibles et standardisées en laboratoire. Ces analyses ont conduit à la mise en évidence d'une série de gènes dont l'expression peut **prédire la capacité des huîtres à survivre** aux infections à vibrios (Rosa et al. 2012). Depuis 2013, les travaux ont permis la validation de **la signature de survie** qui a pu être corrélée avec les capacités de survie des huîtres en conditions d'épisodes de mortalités *in situ* dans l'Etang de Thau. La signature a discriminé les huîtres qui sont capables de survivre de celles qui vont mourir avec 73% de prédiction de survie.

L'objectif de l'approche est d'utiliser cette signature comme **outil de criblage ou phénotypage**, non destructeur, d'huîtres présentant des traits génétiques leur conférant une meilleure résistance aux mortalités *in situ* ou aux pathogènes et ce dans un **objectif de prophylaxie** ou en soutien de **programmes de sélection**.

Pour poursuivre cet objectif, l'action Prédigène s'est proposée d'étudier **(1) l'héritabilité de la signature d'expression** de gènes, marqueur prédictif de capacité de survie, c'est-à-dire la transmission à la descendance de traits génétiques conférant de meilleures capacités de survie. Pour cela, des individus d'une population sauvage d'huîtres ont été phénotypés par la signature moléculaire sur la base d'analyses de qPCR haut débit Fluidigm et biostatistiques. Ainsi trois groupes d'huîtres ont été identifiés en fonction d'un index individuel caractérisant soit un potentiel de bonne survie [S+], un potentiel de mauvaise survie [S-] et des témoins [T] sans discrimination du phénotype. Des croisements en intra-lots ont été réalisés sous sélection divergente d'intensité de 10%. Enfin, chez les descendants, l'index de potentiel de survie a été établi sur des naissains de chaque lignée sélectionnée afin de calculer l'héritabilité de la signature. Les résultats ont montré des **héritabilités fortes à modérées pour les index de survie**, de 0.88 pour la lignée [S-] à 0.39 pour la lignée [S+], indiquant la possibilité de développer des programmes de sélection pour améliorer ou diminuer ce caractère. Il sera toutefois nécessaire de produire plusieurs générations de sélection afin d'obtenir une meilleure mesure de la réponse moyenne par génération de la sélection.

Par ailleurs, Prédigène avait aussi pour objectif **(2) d'évaluer l'impact environnemental** des conditions d'élevage sur les taux de survie des différentes lignées et le phénotype [S]. En effet, la signature prédictive de survie a été caractérisée dans des contextes de mortalités en milieu méditerranéen. Les 3 familles ont été déployées dans le cadre du réseau RESCO dans quatre environnements géographiques et climatiques contrastés de Normandie (Baie des Veys), Bretagne Nord (Brest), Marennes-Oléron (Baie de Bourgneuf) et Méditerranée (Marseillan) pour analyser l'impact environnemental sur le phénotype de survie. Alors que sur les sites d'élevage de la façade Atlantique, aucune différence des taux de survie n'a été observée entre les 3 familles [S+], [S-] et [T], sur Marseillan, des taux de survie significativement supérieurs ont été observés chez les huîtres [S+] par rapport aux familles [S-]. De ces résultats, il ressort que la signature moléculaire étudiée dans le cadre de Prédigène révélerait un **potentiel de survie** des huîtres à des **conditions environnementales** (biotiques et abiotiques) **plus spécifiques à l'Etang de Thau**.

Ces résultats montrent surtout que, en exploitant le fort potentiel adaptatif et polymorphisme de l'espèce, l'approche de phénotypage par signature moléculaire pourrait être appliquée pour produire rapidement **des souches d'huîtres adaptées à différentes conditions environnementales** et/ou résistantes à différents pathogènes. Face à la crise que subit la conchyliculture, la production de **souches locales et adaptées** aux conditions environnementales **spécifiques aux différentes zones ostréicoles régionales** permettrait à terme de sécuriser la filière en réduisant les risques zoonosaires et les conditions de stress des animaux liés aux transferts.

Mots-clés

Huître creuse – signature d'expression de gènes - qPCR - biostatistique - capacité de survie - phénotypage - héritabilité

Key words

Pacific oyster - gene expression signature - qPCR- biostatistics - survival capacity - phenotyping- heritability

Sommaire

1. Introduction	6
1.1. Contexte et état de l'art	6
1.2. Objectifs de l'action Prédigène	8
2. Matériel et méthodes	8
2.1. Matériel biologique	8
2.2. Extraction d'ARNs et synthèse des ADNc	9
2.3. Analyse de la signature de survie par pPCR haut-débit Fluidigm	10
2.4. Analyses statistiques de données de qPCR	11
2.5. Calculs de la réponse à la sélection	12
3. Résultats	13
3.1. Phénotypage des géniteurs et assignation d'un index de survie individuel	13
3.2. Production de lignées par sélection divergente	14
3.3. Analyse de la signature de survie chez des naissains des lignées[S+],[S++], [S-] et[T]	15
3.3.1. Expressions relatives des gènes chez les différentes lignées	15
3.3.2. Index de survie chez les naissains des familles lignées [S+], [S++], [S-] et [T]	18
3.4. Estimation de la réponse à la sélection de l'index de survie et de l'héritabilité	19
3.5. Impact du contexte environnemental sur les taux de survie des individus des lignées [S+], [S-] et [T]	19
4. Discussion	20
5. Conclusions	22
6. Références	23

Annexe 1. Liste des index de survie assignés à chaque huître géniteur

Annexe 2. Liste des individus sélectionnés pour la production des lignées [S+], [S-] et [T].

Annexe 3. Index de survie individuels des naissains des différentes lignées

1. Introduction

1.1. Contexte et état de l'art

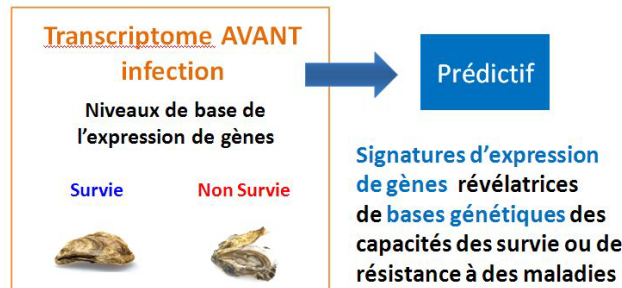
L'activité conchylicole est basée sur la culture quasi monospécifique de l'huître *Crassostrea gigas* introduite sur les côtes françaises dans les années 1970. Après une période de plein développement, les productions conchylicoles sont touchées par des phénomènes récurrents de mortalités particulièrement ravageurs dans les cheptels conduisant à de lourdes pertes économiques.

Ces mortalités d'origines multifactorielles résultent de l'action combinée (i) de facteurs environnementaux tel que la température, (ii) des microorganismes commensaux et pathogènes présents dans l'huître et/ou l'environnement (*Vibrios* et *Herpesvirus*), et (iii) des statuts physiologique et génétique des huîtres qui vont définir leur état de santé. Ces phénomènes de mortalités massives d'huîtres se développent dans un contexte de changements globaux où les pressions environnementales s'accroissent se traduisant par des changements rapides de température, de salinité et par l'exposition à des xénobiotiques d'origine anthropique. La diversité de ces pressions biotiques et abiotiques et leur synergie, qui peuvent être à l'origine de crises écologiques, est amplifiée dans le cas des activités conchylicoles.

La culture de l'huître en France et en Europe repose sur des transferts d'animaux au niveau national et international qui soulèvent en premier lieu le problème de sécurité zoosanitaire et d'expansion de la distribution des pathogènes. Par ailleurs, ces transferts multiples au cours du cycle de production des huîtres sont sources de stress: rupture d'homéostasie par déséquilibre de la microflore endobionte, chocs thermiques et de salinité... Ces conditions peuvent donc avoir un impact sur la sensibilité des huîtres aux microorganismes présents dans ces environnements changeants. Les phénomènes de mortalités dans les productions conchylicoles traduisent une susceptibilité accrue des animaux qui pourrait être liée à une **rupture des capacités d'adaptation** de l'espèce face aux pressions environnementales et pratiques culturelles basées notamment sur des transferts d'animaux.

Des efforts de recherche considérables ont été réalisés afin de comprendre l'étiologie des mortalités de *C. gigas* et à terme de proposer des approches pour soutenir les productions conchylicoles. En utilisant les nouveaux outils technologiques de séquençages (NGS) et de génomique à haut débit, les connaissances sur la biologie de l'huître se sont fortement accrues en termes de développement et de reproduction, de réponses aux stress abiotiques, et enfin, en termes de réponses à des infections et d'immunité (Bachère et al., 2015). Outre le séquençage récent du génome complet de *C. gigas* (Zhang et al., 2012), des approches de génomiques ont été consacrées à la caractérisation des traits génétiques qui gouvernent la tolérance des huîtres aux conditions de stress ou aux pathogènes. Le génome de l'huître se caractérise par un très fort polymorphisme de séquences. Ces caractéristiques génomiques seraient liées aux capacités d'adaptation uniques et originales de l'huître soumise, de par sa nature sessile, à des environnements changeants. De façon remarquable, le génome révèle une forte représentativité du nombre de gènes et/ou de copies de gènes impliqués dans la réponse aux stress, notamment thermiques et de salinité, mais également dans l'immunité (Meng et al., 2013; Zhang et al., 2015), et par une incroyable variabilité interindividuelle de l'expression de gènes (Rosa et al., 2012). Ce polymorphisme d'expression de gènes a été mis en évidence notamment dans le cadre d'études transcriptomiques à haut débit

portant sur les mécanismes moléculaires et les bases génétiques impliqués dans la survie des huîtres *C. gigas* à des vibrioses (Rosa et al., 2012). Ces travaux ont été centrés sur la caractérisation de signatures d'expression de gènes révélatrices de la capacité des huîtres à survivre à des infections ou aux mortalités *in situ*.



Ces signatures d'expression de gènes représentent des outils de criblage (ou phénotypage), non destructeurs et quantitatifs, d'huîtres présentant des traits génétiques de meilleure survie *in situ* ou à des pathogènes (Rosa et al., 2012). Le caractère héritable de la survie ou de la résistance des huîtres à des pathogènes a été démontré mais des corrélations génétiques avec d'autres traits sont difficiles à démontrer comme, entre résistance à un pathogène donné et un autre (Dégremont et al. 2015). Aussi, la caractérisation de ces signatures d'expression de gènes peut donc être utilisée en soutien à des programmes de sélection génétique visant à améliorer les capacités de survie des huîtres.

Une première signature de survie a été caractérisée chez *C. gigas* constituée de 14 gènes dont l'expression basale est prédictive de la capacité des huîtres à survivre à une vibriose en conditions expérimentales (Rosa et al. 2012). En 2013, la poursuite de l'étude a permis la validation de la signature de survie dans un contexte de mortalités *in situ*, à l'issue d'un suivi de huit mois dans l'Etang de Thau (Figure 1).

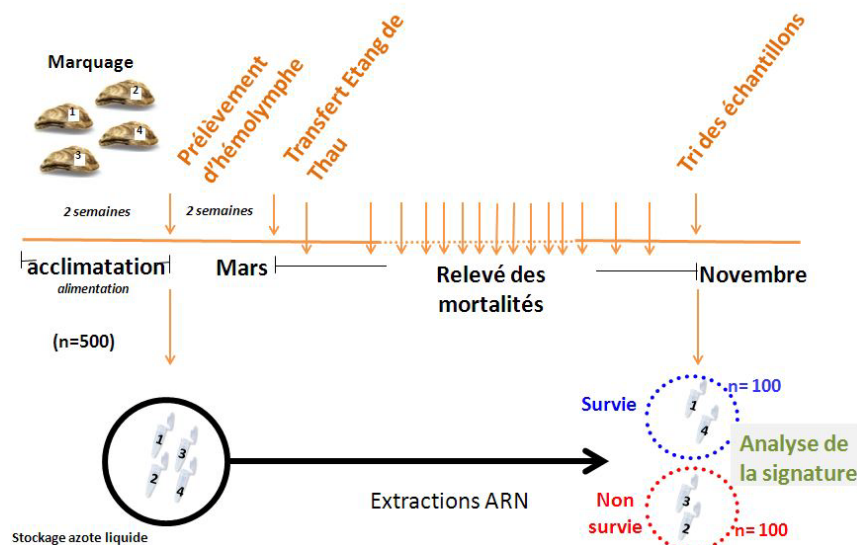


Figure 1. Protocole expérimental mis en place pour la validation d'une signature prédictive de survie des huîtres dans un contexte de mortalités *in situ* dans l'Etang de Thau.

La signature de survie réduite à 8 gènes (initialement inclus dans la signature précédente) a discriminé les huîtres qui ont été capables de survivre de celles qui sont mortes avec 73% de prédiction de survie. Enfin, dans le cadre de la convention DPMA-Ifremer 2014, les méthodes de caractérisation de la signature moléculaire de survie ont été approfondies, conduisant notamment au calcul d'un index individuel, quantitatif et diagnostique de la survie, outil de phénotypage des huîtres.

Dans cette approche, le but recherché est de mettre en évidence des gènes marqueurs de capacité de survie inhérente aux individus plutôt que d'essayer de caractériser des fonctions biologiques ou des mécanismes moléculaires impliqués dans cette capacité.

1.2. Objectifs de l'action Prédigène

L'action Prédigène se proposait d'étudier (1) **l'héritabilité de la signature d'expression** de gènes, marqueur prédictif de capacité de survie, c'est-à-dire la transmission à la descendance de traits génétiques conférant de meilleures capacités de survie. Pour cela, des individus d'une population sauvage d'huîtres ont été phénotypés par la signature moléculaire et ainsi sélectionnés pour la production de lignées désignées comme de "bonne survie" [S+] ou de "mauvaise survie" [S-] chez lesquelles la signature de survie a donc été recherchée.

Par ailleurs, Prédigène a eu pour objectif (2) d'évaluer **l'impact environnemental** des conditions d'élevage sur les taux de survie des différentes lignées et le phénotype [S]. En effet, la signature prédictive de survie a été caractérisée dans des contextes de mortalités en milieu méditerranéen. Dans le cadre de Prédigène, les lignées ont été déployées dans quatre environnements géographiques et climatiques contrastés de Normandie, Bretagne Nord, Marennes-Oléron et Méditerranée.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Population d'étude. Une population d'huîtres *Crassostrea gigas* a été échantillonnée sur le site de La Floride dans le bassin de Marennes-Oléron pendant l'été 2015. Ces huîtres sauvages ont été captées sur les tables ostréicoles d'Ifremer en 2014. Environ 500 huîtres ont été transférées à l'écloserie du laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins à la station Ifremer de La Tremblade en septembre 2015.

De septembre à décembre 2015, les huîtres ont été maintenues dans deux bacs de 250l, alimentés en continue par de l'eau de mer filtrée et traitée UV (débit 500l.h⁻¹) et enrichie en phytoplancton (*Skeletonemacostatum*).

Prélèvements pour analyses des phénotypes de capacité de survie chez les huîtres de la population d'étude. En décembre 2015, les huîtres ont été marquées individuellement et numérotées de 1 à 500 et de petites encoches ont été faites sur les valves supérieures et inférieures à proximité du muscle postérieur des huîtres. Après une semaine de récupération des huîtres, des prélèvements individuels d'hémolymphe (environ 150µl), non destructeurs, ont été réalisés au niveau du muscle adducteur à l'aide d'une seringue.

Les hémocytes correspondant ont été obtenus par centrifugation (800g, 10 min) et immédiatement mis en suspension dans 50 µl de tampon de lyse fourni par le fournisseur (ZYMO RESEARCH) avant congélation dans l'azote liquide et stockage à -20°C pour extraction d'ARNs et phénotypage des huîtres pour la signature de survie (voir paragraphe 2.2).

Ponte. Pour chaque lot à produire (lignée S-, lignée S++, lignée S+ et témoin T), une ponte en masse a été réalisée le 01 mars 2016. Les huîtres ont été mises dans un b cher de 5l contenant de l'eau de mer filtrée et traitée UV. Des chocs thermiques successifs (10–25°C) ont été réalisés en changeant l'eau de mer afin de déclencher la ponte des huîtres matures. Dès les premières émissions de gamètes constatées, les chocs thermiques ont été stoppés et les huîtres ont été maintenues dans de l'eau de mer à 25°C. Les gamètes femelles sont ainsi fécondés instantanément, puis ils ont été récupérés par filtration en utilisant des tamis de 20 µm et de 100 µm. La fraction retenue sur le tamis de 20 µm, contenant les embryons, a été mise dans un bac d'élevage larvaire de 30l. Pour chaque lot à produire, 3 bacs d'élevage larvaire ont été utilisés. Mis à part un rendement larvaire faible pour la lignée [S++] probablement causé par une pollution des gamètes par le contenant, aucun problème particulier n'a été constaté lors de l'élevage larvaire. Pour une description des étapes d'élevages larvaires, fixation et micronurserie voir Dégremont et al., (2015b). Enfin, les lots ont été transférés en nurserie à la station Ifremer de Bouin du 12 mai au 05 juillet 2016.

Prélèvements pour analyses des phénotypes de capacité de survie chez les naissains des différentes lignées [S-], [S+], [S++] et [T]. A l'issue de la phase de nursage, 100 naissains par lignées (5 mois; 100 à 200 mg) ont été d coquill s et immédiatement transférés individuellement dans des tubes de 2 ml contenant 800 µl de tampon de lyse (ZYMO RESEARCH) et une bille de métal (5mm, Qiagen) pour broyage. Les échantillons ont été congelés à -20°C immédiatement après broyage jusqu'à extraction des ARNs.

2.2. Extraction d'ARNs et synthèse des ADNc

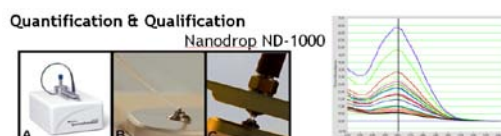
Les extractions d'ARNs ont été réalisées avec le kit ZR-96 *Quick-RNA*TM de ZYMO RESEARCH (Référence R1053) qui permet de traiter simultanément 96 échantillons sur plaque. Avec cette méthode, les tissus sont lysés par incubation dans une solution contenant de fortes quantités de sels chaotropiques qui détruisent la structure des tissus. Ce tampon de lyse inactive immédiatement les RNases présentes dans le matériel biologique. Les échantillons lysés dans ce tampon sont stables et peuvent être conservés congelés jusqu'à l'étape de purification des ARNs. Après ajout d'éthanol, il se crée des conditions optimales de liaison qui favorisent l'adsorption de l'ARN à la membrane de silice. L'ADN contaminant, qui est également lié à la membrane de silice, est éliminé par un traitement à la DNase au cours de la préparation. Les sels, protéines et constituants cellulaires sont éliminés par simples étapes de lavages avec 2 tampons différents. L'ARN pur est finalement  lu  sous conditions de faible force ionique avec de l'eau RNase-free.

Hémocytes des géniteurs. Sur les 495 échantillons d'hémocytes, 480 ont été traités pour des raisons pratiques d'extraction d'ARN réalisée sur plaque 96 puits. Les échantillons conservés à -20°C dans le tampon de lyse, ont été décongelés à +4°C puis amenés à température ambiante pour extraction des ARNs selon les instructions du fournisseur. Après homog n sation douce avec un

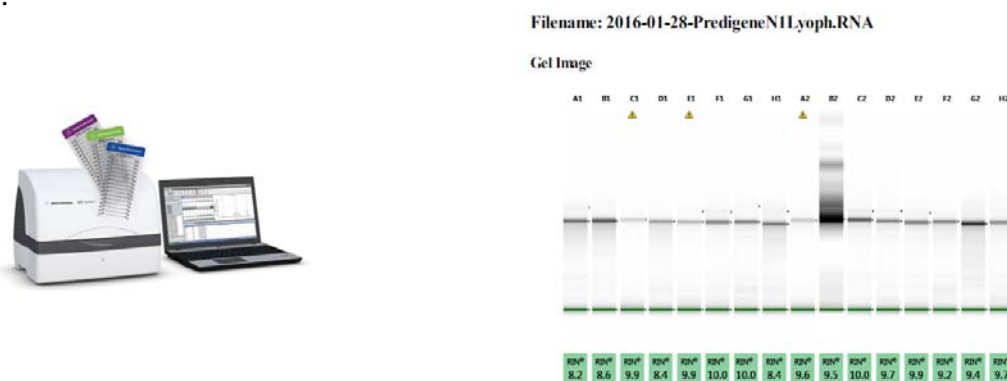
volume d'éthanol 100%, les mélanges ont été transférés sur plaques de colonnes à membrane de silice 96 puits (5 plaques de 96) et centrifugés pendant 5 minutes à 3000 x g. Suite au traitement à la DNase et 3 étapes de lavages, les ARNs ont été élués dans 75 µl d'H₂O RNase-free par centrifugation (3000g, 5 min).

Naissains. Les extractions d'ARNs ont été réalisées comme décrit précédemment à l'aide du kit ZR-96 *Quick-RNA*TM de ZYMO RESEARCH mais sur des lysats d'animaux entiers (100 individus par lignée).

La quantification et la mesure de pureté (absence de contamination en protéines, ADN ou inhibiteurs) des ARNs obtenus ont été contrôlées au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).



La qualité des ARNs a été déterminée à l'aide du ratio A260/A280. L'intégrité des ARN extraits a été vérifiée sur Tape Station Agilent. Les ARNs ayant un score de qualité (RIN > 6) ont été retenus.



La synthèse des ADNc a été réalisée avec le kit de synthèse d'ADNcSuperScriptTM VILOTM cDNASynthesis Kit (Invitrogen, réf. 11754-250), en suivant le protocole du fournisseur. La réaction a été effectuée dans un volume final de 20 µl en présence de 300 ng d'ARN et d'amorces de synthèse aléatoire (random primers) selon les conditions suivantes: 10 min à 25°C, 60 min à 52°C et 5 min à 85°C.

2.3. Analyse de la signature de survie par pPCR haut-débit Fluidigm

L'expression de la signature a été recherchée par qPCR Eva Green en utilisant le BioMark (Fluidigm)(Jang et al., 2011). Cette plateforme permet l'analyse simultanée des 32 gènes sur 96 échantillons individuels par plaque (Figure 2).

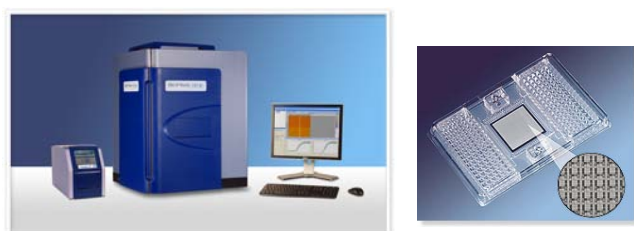
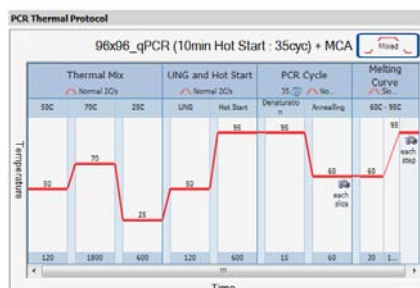


Figure 2: Plateforme BioMark (Fluidigm) et utilisation de puce 96.

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans le BioMark pendant 2h15 selon le programme suivant:



Les résultats des qPCR sont présentés sous la forme d'une "heat map", avec les gènes cibles sur l'axe des X et les échantillons sur l'axe des Y. L'intersection de chaque gène et de chaque échantillon est une réaction de qPCR. Les couleurs sur la "heat map" correspondent à des valeurs de Cq (Figure 3).

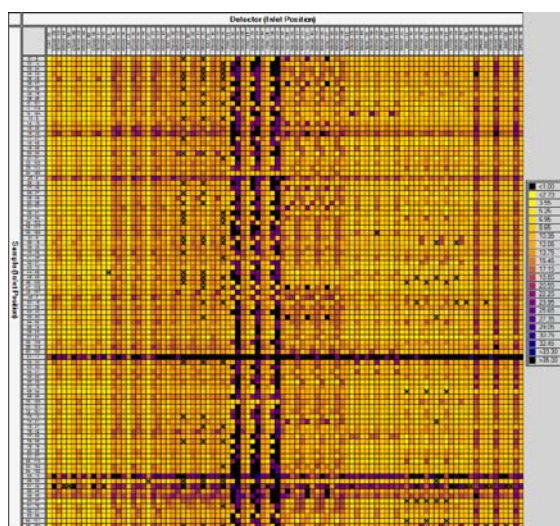


Figure 3. Exemple de "heatmap" montrant les valeurs de Cq qui apparaissent avec un code couleur pour chaque position de réaction sur la puce.

2.4. Analyses statistiques de données de qPCR

En considérant une efficacité d'amplification de 100 %, l'expression relative des gènes a été normalisée selon la méthode de $2^{\Delta\Delta Cq}$ de Livak & Schmittgen (2001) avec la valeur moyenne géométrique Cq des gènes de références utilisés, *eukaryotic translation elongation factor 1-alpha* (*Cg-ef1a*: AB122066), *ribosomal protein L40* (*Cg-rpl40*: FP004478) et *40S ribosomal protein S6* (*Cg-rps6*: CU686508)(Rosa et al., 2012). Dans cette méthode de quantification relative, on procède à 2 normalisations consécutives :

$$\Delta Cq = Cq \text{ cible} - Cq \text{ référence}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ condition cible} - \Delta Cq \text{ condition référente}$$

$$2^{(-\Delta\Delta Cq)} = \text{simple transformation mathématique.}$$

Cette normalisation avec l'aide d'une condition référente permet de comparer de manière cohérente les échantillons entre eux.

Au cours de travaux précédents réalisés sur les capacités de survie d'huîtres dans l'Etang de Thau, un modèle de classification a été mis en place (Acobiom, comm pers 2013) permettant la synthèse d'une variable "index de survie" pour chaque individu analysé à partir des valeurs de ΔCq

obtenues. Ce modèle de classification permet de sélectionner les gènes candidats de manière itérative grâce à l'utilisation des outils tels que "R software" (R 3.3.1 64bits), "Bioconductor package v3.3", "glmnet package v2.0-5" et "maxstat package v0.7-24". La méthodologie générale utilisée est principalement dérivée de la méthodologie du "glmnet package" qui consiste à modéliser des régressions couplées à des pénalisations de variables (Zou et al., 2008).

Un modèle à 8 biomarqueurs (G8, G51, G123, G166, G167, G216, G330 et G382) normalisés par 1 gène de référence (G2) avait été proposé et des coefficients β (issus des modèles de régression) avaient été déterminés pour ce modèle (Tableau 1).

Gène	Coefficient
G8	-0.2732438
G51	0.6087137
G123	0.6914084
G166	0.450317
G167	-0.3533992
G216	0.1599397
G330	-1.283214
G382	-0.2371926

Tableau 1. Coefficients β relatifs à chaque gène de la signature

Pour chaque individu et pour chacun des gènes testés, un ΔCq moyen avait été déterminé. L'index score ou index de survie a été établi comme la résultante de la somme des produits de chaque ΔCq par leur coefficient β respectif, tel que :

$$\text{index de survie} = \sum_{i=1}^n (\Delta Cq_n \times \beta_n)$$

Dans le modèle établi précédemment par Acobiom (comm pers. 2013), un seuil de -4.03 avait été évalué permettant l'aide à la décision pronostique en termes de "bonne survie" ou "mauvaise survie". Ce seuil a été utilisé pour classer les huîtres potentiellement attendues de bonne survie (< -4.03) ou de mauvaise survie (> -4.03).

2.5. Calculs de la réponse à la sélection

L'héritabilité réalisée (h^2_r) a été calculée à partir des deux lignées de la sélection divergente, selon la formule de Hill (1972a):

$$h^2 = \frac{R_i}{S_i} = \frac{X_{ui+1} - X_{di+1}}{(Y_{ui} - X_{ui}) - (Y_{di} - X_{di})}$$

S étant l'écart de sélection, et R la réponse avec :

Y_{ui} et Y_{di} étant les moyennes des parents sélectionnés à la génération i pour les lignées [S++] (ou S+) et [S-] respectivement,

X_{ui} et X_{di} étant les moyennes de la population d'étude à la génération i pour la lignée [S++] (S+) et [S-] respectivement ($X_{ui} = X_{di}$ en génération 0)

X_{ui+1} et X_{di+1} étant les moyennes des lots [S++] ([S+]) et [S-] à la génération i+1

Egalement, l'héritabilité réalisée (h^2_r) a été calculée pour chaque lignée, selon la formule de Hill (1972b):

$$h^2 = \frac{\sum_{i=1}^t X_i S_i}{\sum_{i=1}^t S_i^2}$$

X_i étant la différence des moyennes entre le lot sélectionné (S_{++} , S_+ ou S_-) et le lot témoin (S_0) à la génération i ,

S_i étant la différence des moyennes entre les parents sélectionnés et de la population avant sélection ayant donné la génération i

t étant le nombre de génération, à savoir une seule pour cette étude.

Les écart-types des héritabilités ont été calculés selon les formules de Roff (1997) avec :

- 1 lignée (S_{++} , S_+ ou S_-) et le témoin T :

$$\begin{aligned} Var(h^2) &= S_{cum}^{-2} \left(\frac{2Vp(th^2 + p)}{N} \right) \\ SE(h^2) &= Var(h^2)^{1/2} \end{aligned}$$

- 2 lignées divergentes [S_{++}]vs[S_-] ou [S_+]vs[S_-]:

$$SE(h^2) = \left(\frac{2(th^2 + p)}{t^2 N_t^2} \right)^{1/2}$$

Vp étant la variance phénotypique,

$p = N/M$ avec N étant le nombre de parents par génération, et M le nombre d'individus phénotypés par génération

3. Résultats

3.1. Phénotypage des huîtres géniteurs par qPCR et assignation d'un index de survie individuel

A l'issue des différentes étapes de l'expérimentation (qualité du prélèvement d'hémocytes, qualité des ARNs), 391 individus ont été retenus. Pour des raisons de contrôle qualité, seuls les individus possédant des valeurs de $C_q > 22$ ont été conservés. De même, tous les individus possédant des données manquantes pour les gènes de la signature ont été retirés de l'analyse.

Chacune des 391 huîtres a été assignée d'une valeur d'index de survie et 86 individus ont été identifiés comme présentant une prédiction de bonne survie (S_+) avec des index inférieurs au seuil de -4.03. L'effectif de géniteurs a été séparé en trois groupes: les huîtres attendues avec une bonne survie [S_+], les huîtres avec un index de survie neutre S_0 [T] et les huîtres avec un index prédictif de mauvaise survie [S_-]. Comme indiqué dans la figure 4, 40% des huîtres présentent des index à la valeur de seuil de -4.03 autour duquel se distribue la population d'étude, avec toutefois une plus grande représentativité d'huîtres avec des index prédictifs de mauvaise survie. Les données sont présentées en Annexe 1.

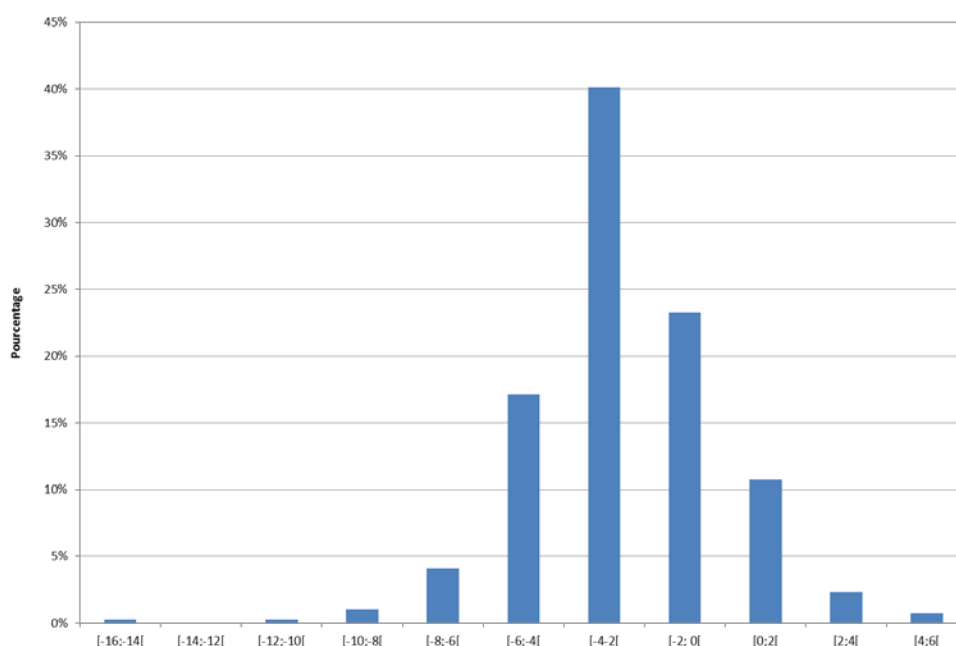


Figure 4 : Distribution de l'index de survie dans la population d'étude (n=391).

3.2. Production de lignées par sélection divergente

A partir des index de survie des 391 huîtres de la population d'étude, une sélection divergente a été réalisée en sélectionnant par troncature 10% des huîtres de la population présentant les index prédictifs de mauvaise survie (lignée S-) et 10% des huîtres de la population présentant les index prédictifs d'une bonne survie (lignée S++). Suite à un rendement larvaire faible pour la lignée [S++], une seconde lignée, nommée [S+], a été produite à partir des 10% suivant dans le classement des index. Enfin, 10% des huîtres ont été prélevées aléatoirement dans la population pour la réalisation du lot témoin [T]. Ce lot témoin permet de corriger la variation due aux modifications de l'environnement entre les générations, si pour des raisons pratiques on s'intéresse seulement à la variation dans une seule direction notamment lorsque la réponse n'est pas la même dans les deux directions (Falconer, 1974). La liste des individus sélectionnés en fonction de leur index de survie pour générer les différentes lignées [T], [S++], [S+] et [S-] est présentée en Annexe 2.

Alors que l'index de survie moyen de la population d'étude se situe autour de $-2.519 (\pm 2.405)$, les huîtres sélectionnées pour générer la lignée [S++] présentaient un index de survie moyen de -6.410 , avec des index de -4.395 pour les [S+], de -2.168 pour les témoins [T], et de 1.870 pour la lignée [S-] (Tableau 2).

Lots	Parents	
	Moyenne \pm SE	Effectif
Population d'étude	-2.519 ± 2.405	391
S++	-6.410 ± 1.769	39
S+	-4.395 ± 0.184	35
T	-2.168 ± 1.485	41
S-	1.870 ± 1.184	39

Tableau 2 : Index de survie (moyenne \pm écart-type) de la population d'étude et des individus sélectionnés pour la production des lignées témoin [T], [S++], [S+] et [S-].

3.3. Analyse de la signature de survie chez des naissains des lignées [S+],[S++], [S-] et [T]

Afin d'en déterminer le caractère héritable, la signature de survie a été analysée chez des individus issus des différentes lignées d'huîtres générées sur la base des index prédictifs de survie. Les analyses d'expression de gènes et de la signature de survie (32 gènes incluant 2 gènes de référence) ont porté sur des individus entiers de 5 mois (100 naissains par lignée), leur taille ne permettant pas le prélèvement d'hémocytes comme effectué chez les géniteurs. Les qPCR ont été réalisées sur le système BIOMARK de Fluidigm. A partir de la matrice de données obtenues, les expressions relatives des gènes ont été calculées comme précédemment par la méthodologie du $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak et al. 2001) chez les différentes lignées d'huîtres incluant une famille S30 sélectionnée pour sa résistance à l'herpesvirus (Dégremont, comm. pers.). Comme réalisé dans les analyses chez les géniteurs et pour éviter tout biais dans la normalisation, un seul gène de référence (OY2) a été utilisé et ainsi le gène OY3 a été traité comme un gène d'intérêt.

3.3.1. Expressions relatives des gènes chez les différentes lignées.

Dans un premier temps, les profils d'expression des gènes ont été comparés entre les différentes lignées sélectionnées. Les histogrammes des valeurs d'expression relative des gènes obtenues sont représentés dans la figure 5 où la lignée témoin [T] a été prise comme condition de référence.

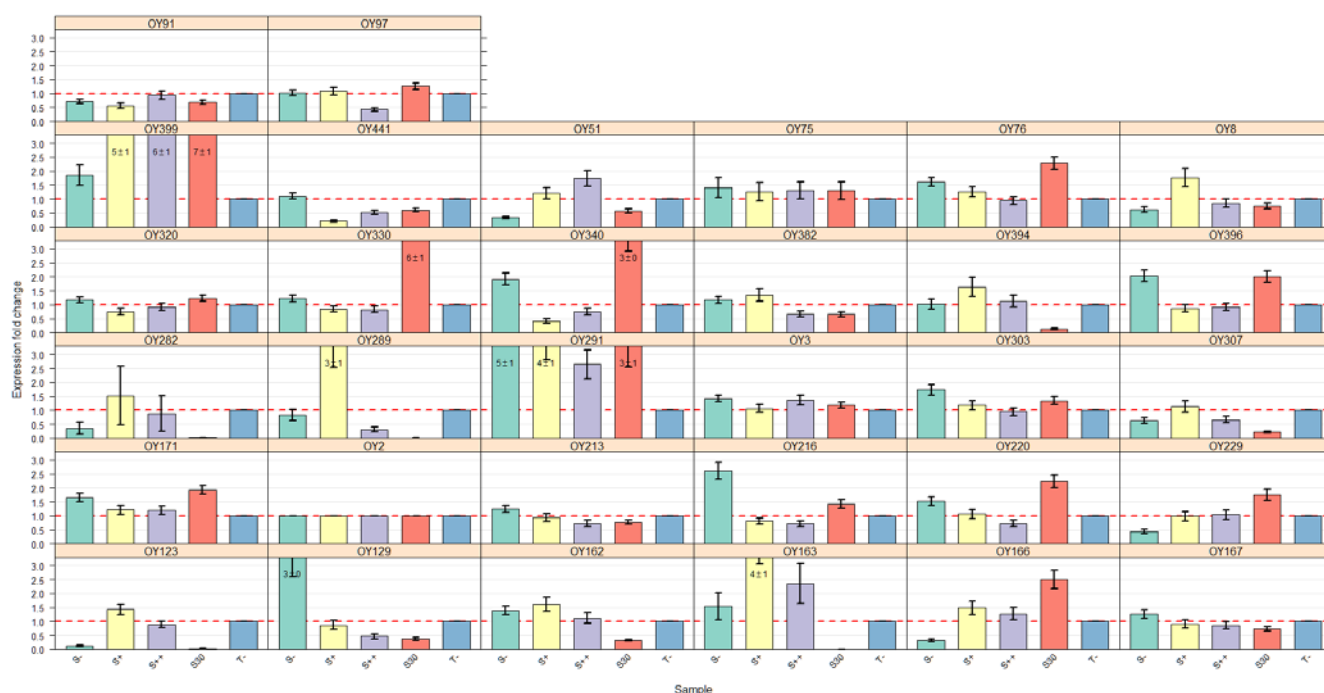


Figure 5: Histogrammes des valeurs d'expression relative des gènes chez les différentes lignées [S-] en vert, [S+] en jaune, [S++] en violet, S30 en rouge et la lignée [T] en bleu prise comme condition de référence.

Chez la lignée [S-], parmi les gènes de la signature, OY8, OY51, OY123 et OY166 présentent un profil de sous-expression similaire alors que les gènes OY129, OY216 et OY396 présentent un profil de surexpression. Les profils d'expression sont proches chez les lignées [S++] et [S+]. Il

apparaît clairement que la lignée sélectionnée S30 se distingue par des profils d'expression très contrastés incluant ceux des gènes de la signature, avec dans certains cas une absence d'expression de gènes comme OY163, OY282, OY289. Ces gènes codent une famille de peptides antimicrobiens, les big-défensines, pour lesquels un phénomène de Présence/Absence de gènes (PAV) a été mis en évidence (Rosa et al., 2011; 2015).

Une analyse factorielle discriminante (FDA) sur les 5 conditions a été réalisée (sur la base des ΔCq) afin de mettre en relief des éventuelles différences entre groupes et décrire en particulier le profil de la lignée S30.

Un premier graphe de type "Arrow-plot" a été produit pour analyser le comportement des gènes de la signature ensembles (OY8, OY51, OY123, OY166, OY167, OY216, OY330 et OY382) (Figure 6).

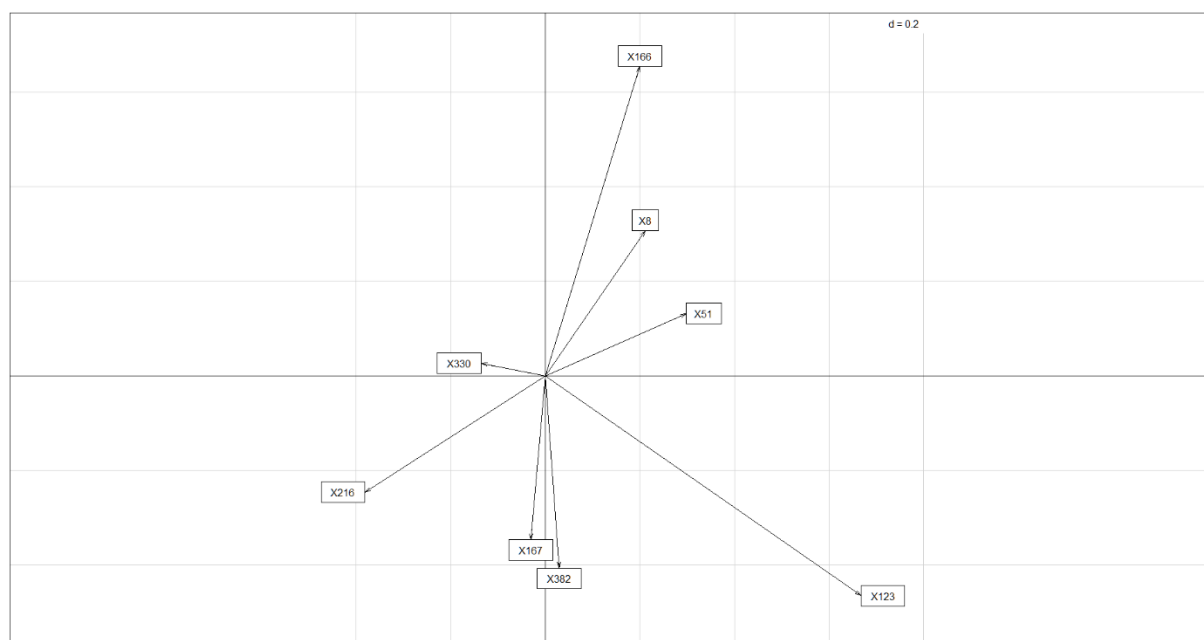


Figure 6. Arrow-plot pour chaque gène de la signature de potentiel de survie.

Comme visualisé sur la figure 6, les gènes étiquetés X167 (OY167) et X382 (OY382) sont proches, indiquant que les profils d'expression de ces 2 gènes sont similaires, ce qui corrobore les résultats visualisés dans la figure 5 des histogrammes. Dans cette représentation, la longueur des flèches est liée à la puissance de la corrélation. Ainsi une flèche de petite taille indique une faible puissance alors qu'une flèche de grande taille indique une importance majeure (exemple X166 et X123). Ainsi, les gènes OY166, OY08, OY51 et OY123 sont sous-exprimés chez la lignée [S-] alors que OY330, OY216 sont surexprimés.

Les analyses FDA ont également été visualisées au travers d'un diagramme de classe (Figure 7). Ce diagramme a pour but de replacer en fonction d'une variable commune (ici la lignée) tous les

points pouvant être apparentés à cette variable puis de placer le centre de gravité des nuages de points ainsi agrégés en fonction du graphe "Arrow-plot".

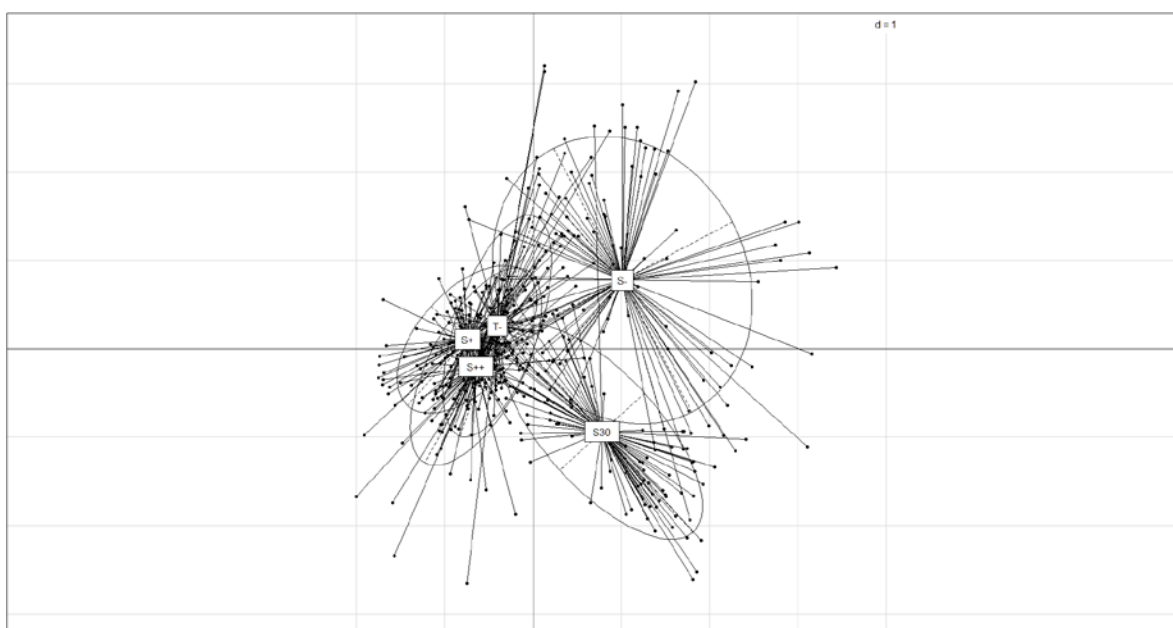
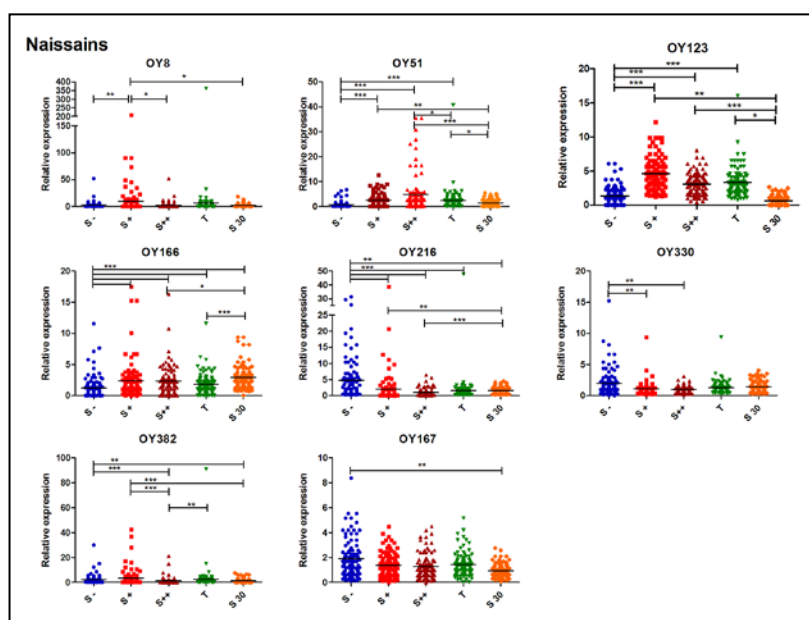


Figure 7: Diagramme de classe pour les conditions décrites ou lignées [S-], [S+],[S++], [T] et S30.

Chaque groupe de point est indiqué par un cercle dont le centre est étiqueté par le nom de la condition. Ainsi il apparaît que le groupe lignée [S-] est relativement bien séparé des groupes lignées [S+] et [S++]. En considérant les informations données par le graphe "Arrow-plot", le gène X166 est fortement corrélé à la lignée [S-] alors que le gène X216 l'est pour la lignée [S++] (avec un gradient allant de [T-] vers [S+] puis [S++]). De ces analyses, il ressort bien que la lignée sélectionnée S30 est extrêmement bien séparée des autres groupes avec le gène X123.

Enfin, la signature de survie ne serait pas retrouvée *sensu stricto* dans la famille S30 sélectionnée pour la résistance à l'herpesvirus, celle-ci présentant des profils d'expression des gènes significativement différents de ceux observés chez les lignées [S+],[S++] et [T] ainsi que [S-] (Figure 8).

Figure 8: Comparaison des profils d'expression des gènes de la signature de survie chez des naissains des différentes lignées [S-], [S+], [S++], [T] et S30



Ces résultats suggèrent qu'une signature spécifique au phénoype de survie à l'herpesvirus peut être identifiée selon l'approche proposée dans la présente étude.

3.3.2. Calcul des index de survie chez les naissains des familles lignées [S+],[S++], [S-] et [T]

Les indices de survie individuels ont été calculés pour 100 naissains de chacune des lignées sur la base des données de qPCR, comme réalisé pour les géniteurs selon la méthode établie par Acobiom. Les indices individuels obtenus sont présentés en ANNEXE 3.

Après application de la règle de calcul aux naissains, nous observons un décalage de ce score chez les individus des différentes lignées par rapport à la valeur de -4.03. Les valeurs ne sont pas centrées autour de la valeur seuil ce qui indiquerait un biais dans la construction du score. Cette différence pourrait être liée d'une part à la nature de l'échantillon et d'autre part à l'âge des individus. En effet, chez les géniteurs, huitres adultes de 2 ans, l'expression des gènes a été analysée à partir des hémocytes, alors que chez leur descendance, les analyses ont été réalisées sur du naissain de 5 mois et des animaux entiers. L'expression de certains gènes de la signature pourrait différer entre ces conditions: hémocytes et individus entiers. Ceci a été vérifié en comparant les valeurs centrales des distributions des gènes de la signature chez les géniteurs et chez les naissains par des tests de Mann-Whitney (données indépendantes et distribution non-paramétrique) (Tableau 3). Ces tests ont révélé des différences significatives entre les modèles géniteurs et naissains, ce qui renforce l'idée de variations d'expression pour certains gènes entre les hémocytes chez les adultes et animal entier chez les naissains.

Gene	OY8	OY51	OY123	OY166	OY167	OY216	OY330	OY382
P-value	0	0	0	0	0	0	0	0.4657

Tableau 3: Tests Mann-Whitney pour les gènes de la signature entre les conditions "géniteurs" et "naissains".

Malgré ce décalage des index chez les naissains par rapport aux géniteurs, les lignées [S++] et [S+] présentent des index moyens les plus faibles avec -1.043 et -0.581 respectivement, alors que la lignée [S-] présente l'index moyen le plus élevé de 4.039, la lignée témoin [T] ayant un index intermédiaire avec 0.153 (Tableau 4).

Lignées	Parents		Naissains	
	Moyenne \pm SE	Effectif	Moyenne \pm SE	Effectif
S++	-6.410 \pm 1.769	39	-1.043 \pm 1.871	100
S+	-4.395 \pm 0.184	35	-0.581 \pm 2.306	100
T	-2.168 \pm 1.485	41	0.153 \pm 1.971	100
S-	1.870 \pm 1.184	39	4.039 \pm 3.730	100

Tableau 4: Index de survie (moyenne \pm écart-type) de la population d'étude, de la lignée témoin [T] et des lignées sélectionnées [S++], [S+] et [S-].

3.4. Estimation de la réponse à la sélection de l'index de survie et de l'héritabilité

L'héritabilité estimée à partir des deux lots de la sélection divergente (S++ vs S- et S+ vs S-) est comprise entre 0.62 et 0.74 (Tableau 2). Pour la lignée [S-], l'héritabilité de l'index de la survie est forte (0.88), alors qu'elle est modérée pour les lignées [S++] (0.31) et [S+] (0.39) (Tableau 5).

	S++	S+	S-	S++ vs S-	S+ vs S-
R	-1.20	-0.73	3.89	-5.08	-4.62
S	-3.89	-1.88	4.39	-8.28	-6.27
h ²	0.31 ± 0.09	0.39 ± 0.16	0.88 ± 0.12	0.62 ± 0.11	0.74 ± 0.12

Tableau 5: Réponse à la sélection (R), écart à la sélection (S) et héritabilité de l'index de survie (\pm écart-type) estimée pour chaque lot sélectionné, [S++], [S+] et [S-] et entre les deux lots de la sélection divergente [S++]vs[S-] et [S+]vs[S-].

3.5. Analyse de l'impact du contexte environnemental sur les taux de survie des individus des lignées [S+], [S-] et témoin [T].

La survie des huîtres des différentes lignées [S+], [S-] et témoin [T] a été comparée entre 4 sites géographiques faisant l'objet de suivis dans le cadre du réseau de surveillance de l'Ifremer:

- Géfosse dans la Baie des Veys (Normandie)
- La Pointe du Château dans la rade de Brest (Bretagne)
- Coupelasse, Bourgneuf (Charentes-Maritimes)
- Marseillan dans l'Etang de Thau (Méditerranée)

Avant leur transfert sur les sites de cultures, la majorité des naissains en nurserie dans la station de Bouin avait dépassé le stade T10 avec des poids moyens individuels évalués de:

- 2.81 g pour [S++] 1973 individus,
- 1.89 g pour [S+] 5585 individus,
- 1.95 g pour [S-] 4975 individus,
- 2.18 g pour 5200 individus de la lignée témoin [T].

Les naissains de chaque lignée [S+], [S-] et [T] ont été acheminés dans les différents sites de suivi. Le 07 Juillet 2016, les différents lots, soit 3 fois 300 naissains par poches, ont été déployés sur tables pour les sites de Géfosse, la Pointe du Château et Coupelasse, et en suspension, dans des lanternes, à Marseillan. Seul dans ce dernier site, des naissains de la lignée [S++] ont pu être rajoutés pour le suivi des mortalités. En effet, le faible nombre de naissains disponible pour cette lignée n'a pas permis de la déployer dans tous les sites.

Le suivi des survies a été réalisé dans le cadre du suivi RESCO II de l'Ifremer jusqu'à la fin Septembre 2016, après la période attendue des mortalités. Au cours de cette période, des différences de mortalités pour les trois familles ont été observées entre les sites de Baie des Veys, Brest et Bourgneuf d'une part, et d'autre part dans l'Etang de Thau. Des taux de survie moyens entre 25 et 53 % ont été observés dans les sites de Normandie, Bretagne et Charentes-Maritimes et de 78 à 95 % dans l'Etang de Thau où le pic de mortalité *in situ* est probablement survenu avant le début de l'expérimentation en Juillet (Figure 9).

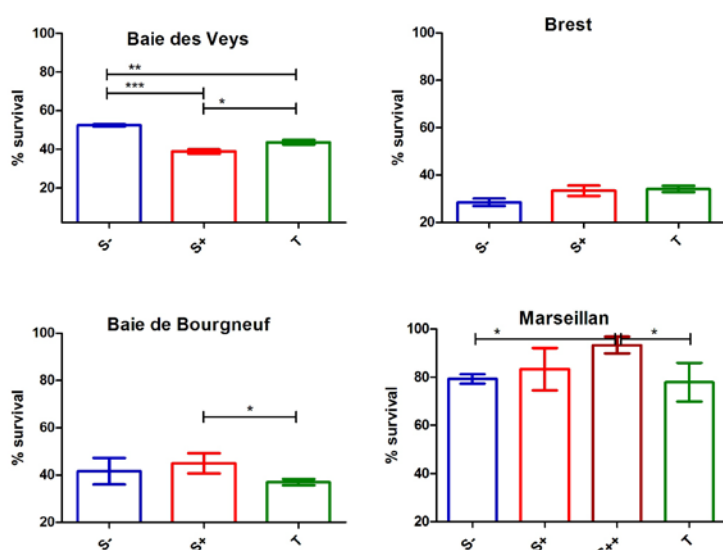


Figure 9: Taux de survie observés pour les différentes lignées [S-], [S+], [S++] et [T] témoin dans les sites géographiques de la Baie des Veys (Normandie), Brest, Baie de Bourgneuf (Charentes-Maritimes) et Etang de Thau (Méditerranée).

En Baie des Veys, les taux de survie diffèrent significativement entre les lignées mais le meilleur taux de survie est observé pour la lignée [S-] de pronostic de mauvaise survie. Toutefois, sur ce site, des mortalités élevées ont été observées dès les premiers jours après la mise en eau des huîtres, mortalités qui pourraient relever du parcours zootechnique (transport et manipulation) (Julien Normand, comm. pers.). Aucune différence n'est observée à la Pointe du Château (Brest) entre les lignées, ainsi que dans la Baie de Bourgneuf sauf entre les lignées [S+] et [T] (Figure 9).

Enfin, à Marseillan dans l'Etang de Thau, les taux de survie entre lignées [S-], [S+] et [T] ne diffèrent pas significativement à la fin de l'expérimentation (29 septembre 2016) hormis pour la lignée [S++]. Les taux de survie des huîtres [S++] sont significativement plus élevées (93.3 % +/- 3.5 %) que ceux des [S-] (79.3 % +/- 1.9 %) et des [T] (77.9 % +/- 8 %) (Figure 9).

4. Discussion

L'action Prédigène contribue à l'approfondissement des connaissances sur les bases génétiques qui gouvernent les capacités des huîtres à survivre à des épisodes de mortalités, et à la validation d'une méthode innovante de phénotypage et de qualification de souches d'huîtres utilisable en soutien à des programmes d'amélioration génétiques ou dans un objectif prophylaxie. Cette étude s'est inscrite dans la continuité de travaux initiés en 2012 sur la caractérisation d'une signature moléculaire ou combinaison de gènes dont l'expression basale est prédictive de la survie ou non survie des huîtres en conditions d'élevage.

Héritabilité

La disponibilité d'une méthode de phénotypage quantitatif au travers de l'assignation d'un index individuel de survie a permis de mettre en place cette étude d'héritabilité du caractère [capacité de survie]. La méthode de sélection choisie, sélection divergente, a nécessité le phénotypage de près de 500 huîtres géniteurs puis de 400 naissains, analyse rendue possible par les technologies de qPCR à haut débit de type Fluidigm et méthodes d'analyses biostatistiques afférentes développées

par Acobiom. Les géniteurs ont donc été sélectionnés sur la base de leur index de survie pour la production de lignées de phénotypes attendus de bonne survie [S+] ou mauvaise survie [S-]. Pour les calculs d'héritabilité, des naissains des différentes lignées ont également été phénotypés comme leurs parents pour assignation individuelle d'un index de survie.

Les résultats ont montré des héritabilités modérées à fortes pour l'index de la signature de survie soulignant les possibilités de développer des programmes de sélection pour améliorer ou diminuer ce caractère. Cependant, les valeurs obtenues restent imprécises surtout en première génération de sélection. Il est fréquent d'obtenir de fortes fluctuations dans la réponse à la sélection dans les premières générations, à cause de la variabilité des moyennes de génération. Celles-ci sont causées par la variation d'échantillonnage dépendant du nombre d'individus contrôlés, et par les modifications des conditions environnementales. Il est donc nécessaire de produire plusieurs générations de sélection afin d'obtenir une meilleure mesure de la réponse moyenne par génération, laquelle est alors obtenue par la pente de la droite de régression calculée sur les moyennes de génération (Falconer, 1974). Il faut rappeler que l'intervalle de génération est un facteur important de l'évaluation de la réponse à la sélection. Cet intervalle est le temps qui s'écoule entre deux états identiques dans le cycle de vie de deux générations successives.

L'estimation de l'héritabilité dépend également de l'écart à la sélection. Il faut rappeler que dans notre étude, une ponte en masse a été réalisée pour chaque lignée. Cette ponte peut alors entraîner des contributions différentes entre les parents sélectionnés (maturité, fertilité, compétition gamétiques...). Cette différence entre l'écart de sélection prévu et l'écart de sélection réalisé entraînera alors une estimation à la hausse ou à la baisse de l'héritabilité, laquelle est le quotient de la réponse et de l'écart à la sélection.

L'héritabilité estimée est plus importante pour la lignée S- (index associé à une moins bonne survie) que pour les lignées S+ et S++ (index associé à une meilleure survie). Mis à part que les estimations sont imprécises en première génération de sélection, ce résultat pourrait éventuellement traduire une asymétrie de la réponse (Falconer, 1974, Roff, 1997). Les causes peuvent être multiples. Par exemple, l'écart de sélection peut différer entre les deux lignées en sélection montante ou descendante à cause de la sélection naturelle qui peut aider la sélection dans une direction et la retarder dans une autre. Il semblerait ainsi qu'il serait plus « facile » de sélectionner des huîtres présentant des index associés à une moins bonne survie. L'asymétrie génétique (dominance et fréquence des gènes aux loci concernés) est également responsable d'une asymétrie de la réponse, tout comme la sélection pour les hétérozygotes, la dépression de consanguinité, ou encore les effets maternels.

Il faut souligner que dans notre étude, l'index de survie a été calculé à partir d'adultes pour les parents, et à partir de naissains chez les descendants. De même, les tissus analysés entre les générations n'étaient pas identiques avec l'analyse de l'hémocyte chez les parents et de l'animal entier chez les descendants du fait de l'impossibilité de prélever des hémocytes sur des huîtres de 5 mois. Ces différences de mesure de l'index entre les générations peuvent donc également biaiser l'estimation de l'héritabilité. Une alternative serait de définir une signature moléculaire indépendante des facteurs "tissus" et/ou "âge" permettant d'obtenir des index de survie totalement représentatifs du phénotype [survie] à tous stades de vie des huîtres. Ceci pourrait être intéressant dans le cadre de qualification, en sortie de nurserie, de souches d'huîtres sélectionnées pour leur capacité de survie. Toutefois, dans l'objectif d'une application de l'approche dans des programmes

de sélection, seul le phénotypage des géniteurs est requis pour la production de lignées sélectionnées dont la survie est le critère final à prendre en compte par rapport à la détermination des index de survie.

Impact environnemental

La signature moléculaire et l'index de survie afférent ont été caractérisés dans des conditions environnementales et de pathogénèse spécifiques de l'Etang de Thau, à partir d'huîtres provenant d'écloserie. Dans Prédigène, cette signature a été utilisée pour phénotyper des huîtres sauvages de Marennes Oléron et la production des lignées dont la survie a été évaluée dans différentes conditions environnementales. Compte tenu des contraintes techniques et zootechniques, le suivi environnemental s'est déroulé de Juillet 2016, date où les naissains produits ont atteint une taille suffisante pour être déployés, à fin septembre 2016. Cette période bien que relativement courte coïncidait cependant aux périodes de mortalités généralement observées sur les zones d'élevage de la façade atlantique. Des taux de survie de 40 à 60% ont été relevés sur les 3 sites concernés, Baie des Veys, Brest et Baie de Bourgneuf mais indépendamment des lignées concernées [S-], [S+] ou témoin. Sur l'Etang de Thau où les épisodes sont plus précoces, des taux de mortalités de seulement 20% ont été enregistrés dans la même période. Toutefois, les taux de survie chez les lignées [S+] ont été significativement supérieurs à ceux observés chez les [S-] et témoins, suggérant une adéquation entre le phénotype sélectionné et la survie *in situ* pour le site de Marseillan.

Une signature de survie environnementale

Ces résultats suggèrent que la signature moléculaire étudiée dans Prédigène serait adaptée aux conditions environnementales méditerranéennes. La signature n'est pas spécifique d'un ou plusieurs pathogènes mais révélerait plutôt une capacité de survie globale dans des conditions multifactorielles biotiques et abiotiques. Ainsi la lignée S30, sélectionnée pour sa résistance à l'herpesvirus OSHV-1, présente des profils d'expression de gènes distincts de ceux observés dans les lignées sélectionnées sur la base de la signature de survie. Une signature moléculaire spécifique au phénotype "survie à OSHV-1" pourrait donc être caractérisée spécifiquement selon l'approche développée dans notre étude. Il serait toutefois hasardeux de vouloir expliquer les mécanismes de la résistance à l'OSHV-1 sur la seule base des fonctions biologiques des gènes identifiés dans la signature moléculaire.

6. Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus à l'issue de Prédigène et des travaux précédents montrent qu'une signature moléculaire révélatrice de capacité de survie des huîtres à des conditions environnementales méditerranéennes a pu être caractérisée à partir de populations sauvages ou d'écloserie provenant des côtes Atlantiques. Il est maintenant établi que les caractéristiques génomiques, comme un très fort polymorphisme interindividuel, polymorphisme de séquences nucléiques, polymorphisme d'expression des gènes et variations de la structure du génome, seraient sous jacentes au remarquable potentiel de capacités d'adaptation de l'espèce à des environnements changeants. Ainsi, il serait possible d'exploiter ces caractéristiques et de révéler et

sélectionner, dans une population donnée, divers traits potentiels d'intérêt. L'approche que nous avons proposé dans ces travaux pourrait donc être appliquée pour caractériser des signatures moléculaires de survie spécifiques aux diverses zones géographiques ostréicoles, à des stress abiotiques spécifiques ou encore révélatrices de résistance à des pathogènes donnés.

Pour les professionnels, ces travaux, considérés encore comme exploratoires dans le monde de l'aquaculture, pourraient aboutir rapidement à une démarche originale pour des programmes d'amélioration génétique. Il serait possible de produire en relativement peu de générations des souches d'huîtres adaptées à différentes conditions environnementales. Ces méthodes de phénotypage pourraient également être utilisées pour la qualification de souches d'huîtres.

Dans un contexte de mortalités et pertes économiques importantes, pour les administrations de l'état, ces résultats pourront être une aide à la mise en place de nouvelles approches de production et de réglementation sur les transferts d'huîtres sources de stress et favorables à la dissémination des pathogènes. Face à la crise conchylicole, il est prioritaire d'adopter de nouvelles pratiques aquacoles. Notamment, la production de souches locales et adaptées aux conditions environnementales spécifiques aux différentes zones ostréicoles régionales permettrait à terme de sécuriser la filière en réduisant les risques zoosanitaires liés aux transferts.

6. Références

- Bachère, E., Rosa, R.D., Schmitt, P., Poirier, A.C., Merou, N., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol.* doi:10.1016/j.fsi.2015.02.040
- Dégremont, L., Garcia, C., Allen, S.K., 2015a. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 226–241. doi:10.1016/j.jip.2015.05.010
- Dégremont, L., Lamy, J.-B., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2015b. New Insight for the Genetic Evaluation of Resistance to Ostreid Herpesvirus Infection, a Worldwide Disease, in *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 10, e0127917. doi:10.1371/journal.pone.0127917
- Falconer, D.S., 1974. Introduction à la génétique quantitative, Lavoisier. ed. Paris.
- Hill, W.G., 1972a. Estimation of Realised Heritabilities from Selection Experiments. I. Divergent selection. *Biometrics* 28, 747–765.
- Hill, W.G., 1972b. Estimation of Realised Heritabilities from Selection Experiments. II. Selection in One Direction. *Biometrics* 28, 767–780. doi:10.2307/2528761
- Jang, J.S., Simon, V., Feddersen, R.M., Rakhshan, F., Schultz, D., Zschunke, M., Lingle, W.L., Kolbert, C.P., Jen, J., 2011. Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays. *BMC Genomics* 12, 144.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262

- Meng, J., Zhu, Q., Zhang, L., Li, C., Li, L., She, Z., Huang, B., Zhang, G., 2013. Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. PLoS One 8, e58563. doi:10.1371/journal.pone.0058563
- Roff, D., 1997. Evolutionary quantitative genetics. New-York.
- Rosa, R.D., Alonso, P., Santini, A., Vergnes, A., Bachère, E., 2015. High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence-absence gene variability (PAV) in the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 49, 231–8. doi:10.1016/j.dci.2014.12.002
- Rosa, R.D., de Lorgeril, J., Tailliez, P., Bruno, R., Piquemal, D., Bachère, E., 2012. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. BMC Genomics 13, 252. doi:10.1186/1471-2164-13-252
- Rosa, R.D., Santini, A., Fievet, J., Bulet, P., Destoumieux-Garzón, D., Bachère, E., 2011. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One 6, e25594. doi:10.1371/journal.pone.0025594
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J.J.J.J.J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S.S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y.Y., Li, N.N., Wang, J.J.J.J.J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H.H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S.S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J.J.J.J.J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N.N., Qian, L., Zhang, G.G., Li, Y.Y., Yang, H.H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, L., Li, L., Guo, X., Litman, G.W., Dishaw, L.J., Zhang, G., 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. Sci. Rep. 5, 8693. doi:10.1038/srep08693
- Zou J., Z., T., H., 2008. New Multicategory Boosting Algorithms Based on Multicategory Fisher-Consistent Losses. Ann Appl Stat 2, 1290–1306. doi:10.1214/08-AOAS198

ANNEXE 1

Liste des index de survie assignés à chaque huître géniteur

(en vert S+, en orange S0 neutre et en rose S-).

Individu	Index S+	Individu	Index S0	Individu	Index S-
124	-14.41	252	-3.47	222	-1.69
39	-10.88	169	-3.47	490	-1.68
71	-9.90	460	-3.44	97	-1.68
67	-9.37	378	-3.43	6	-1.67
523	-8.49	227	-3.43	182	-1.65
161	-8.38	596	-3.43	528	-1.64
133	-7.70	451	-3.40	69	-1.63
469	-7.14	395	-3.39	20	-1.61
286	-6.96	48	-3.39	471	-1.58
331	-6.93	258	-3.38	525	-1.56
16	-6.87	564	-3.35	453	-1.56
218	-6.86	225	-3.32	239	-1.53
414	-6.69	183	-3.29	433	-1.53
560	-6.69	522	-3.29	350	-1.48
476	-6.58	553	-3.27	123	-1.47
272	-6.53	592	-3.26	108	-1.46
488	-6.45	179	-3.25	118	-1.42
231	-6.45	478	-3.24	174	-1.39
481	-6.32	368	-3.24	240	-1.35
216	-6.22	542	-3.23	290	-1.35
445	-6.07	602	-3.23	593	-1.34
72	-6.03	171	-3.22	76	-1.33
241	-5.92	81	-3.22	211	-1.30
206	-5.88	439	-3.22	599	-1.29
103	-5.85	447	-3.20	228	-1.26
53	-5.84	180	-3.17	28	-1.21
234	-5.72	63	-3.16	405	-1.18
105	-5.70	138	-3.15	266	-1.12
501	-5.66	93	-3.15	382	-1.11
392	-5.63	190	-3.13	175	-1.09
357	-5.61	79	-3.13	398	-1.05
614	-5.49	495	-3.13	281	-1.00
364	-5.45	117	-3.12	418	-0.99
126	-5.45	109	-3.11	21	-0.99
111	-5.45	267	-3.09	162	-0.98
244	-5.39	492	-3.08	156	-0.97
263	-5.29	436	-3.06	530	-0.96
91	-5.26	391	-3.06	444	-0.95
302	-5.25	2	-3.05	280	-0.95
140	-5.16	612	-3.04	35	-0.91
595	-5.09	226	-3.03	301	-0.90
545	-5.06	112	-3.03	40	-0.83
371	-5.03	482	-3.03	477	-0.78
98	-5.02	601	-3.01	361	-0.78
529	-4.98	343	-3.00	233	-0.78
499	-4.93	402	-2.98	75	-0.77
274	-4.92	55	-2.97	353	-0.77
47	-4.92	376	-2.96	615	-0.75
42	-4.92	526	-2.96	199	-0.74
83	-4.86	399	-2.95	89	-0.69
3	-4.68	556	-2.93	572	-0.66
497	-4.68	285	-2.92	132	-0.65

450	-4.68	570	-2.90	119	-0.60
354	-4.67	168	-2.88	62	-0.59
283	-4.65	74	-2.88	597	-0.59
49	-4.62	372	-2.87	598	-0.57
61	-4.60	137	-2.83	434	-0.55
256	-4.59	110	-2.82	458	-0.47
551	-4.53	154	-2.82	57	-0.38
217	-4.53	356	-2.81	486	-0.38
424	-4.52	431	-2.77	219	-0.37
38	-4.51	310	-2.75	509	-0.36
543	-4.51	591	-2.75	608	-0.35
166	-4.50	82	-2.73	605	-0.30
485	-4.49	144	-2.71	311	-0.26
197	-4.46	84	-2.71	95	-0.25
375	-4.46	52	-2.70	192	-0.20
178	-4.45	611	-2.69	80	-0.18
303	-4.42	452	-2.68	143	-0.13
153	-4.40	150	-2.68	41	-0.12
588	-4.40	125	-2.67	92	-0.08
295	-4.33	214	-2.66	613	-0.08
134	-4.33	538	-2.65	4	-0.04
146	-4.33	369	-2.64	50	-0.04
309	-4.33	314	-2.64	201	-0.03
366	-4.26	15	-2.62	345	-0.01
237	-4.22	264	-2.62	459	0.08
421	-4.22	78	-2.56	367	0.09
521	-4.22	58	-2.56	253	0.09
406	-4.21	275	-2.55	114	0.11
502	-4.18	429	-2.54	208	0.12
325	-4.16	101	-2.54	122	0.12
389	-4.14	412	-2.53	533	0.13
221	-4.13	19	-2.52	33	0.17
359	-4.11	327	-2.50	319	0.19
257	-4.03	324	-2.42	316	0.25
186	-4.02	571	-2.42	616	0.30
209	-4.01	380	-2.39	355	0.35
45	-4.00	127	-2.38	329	0.35
235	-3.99	415	-2.34	23	0.36
503	-3.98	31	-2.32	534	0.38
430	-3.96	14	-2.30	30	0.42
393	-3.96	585	-2.29	470	0.46
260	-3.95	205	-2.27	187	0.66
332	-3.94	552	-2.24	121	0.67
148	-3.94	536	-2.21	409	0.70
321	-3.93	37	-2.21	408	0.73
300	-3.92	516	-2.20	85	0.76
145	-3.92	442	-2.16	494	0.84
306	-3.92	65	-2.15	561	0.91
12	-3.88	510	-2.14	437	1.07
160	-3.87	158	-2.13	164	1.13
557	-3.87	130	-2.12	504	1.22
322	-3.87	607	-2.12	181	1.31
307	-3.85	515	-2.10	512	1.32
390	-3.85	498	-2.10	155	1.33
247	-3.81	425	-2.09	623	1.38
468	-3.77	26	-2.09	493	1.39
549	-3.76	407	-2.09	268	1.43
191	-3.74	249	-2.08	342	1.54
363	-3.73	550	-2.07	532	1.57

519	-3.71	328	-2.07	59	1.58
620	-3.70	483	-2.03	29	1.67
188	-3.69	131	-2.02	370	1.72
87	-3.69	94	-2.01	159	1.74
251	-3.67	618	-2.01	349	1.82
293	-3.67	185	-1.99	273	1.87
558	-3.66	566	-1.98	360	1.88
167	-3.62	396	-1.98	248	2.13
195	-3.62	200	-1.97	246	2.43
230	-3.62	189	-1.95	428	2.66
213	-3.61	102	-1.89	262	2.78
308	-3.61	142	-1.88	365	2.82
279	-3.57	24	-1.84	559	2.89
270	-3.56	18	-1.84	224	2.92
589	-3.55	68	-1.83	341	3.07
609	-3.55	198	-1.82	44	3.48
288	-3.52	25	-1.79	7	4.42
569	-3.48	210	-1.78	243	5.09
202	-3.47	514	-1.73	472	5.20
		374	-1.70		

ANNEXE 2

Liste des individus sélectionnés pour la production des lignées [S+], [S-] et [T].

Date de ponte		01/03/2016	01/03/2016		02/03/2016		01/03/2016	
N°IND	index		N°IND	index	N°IND	index	N°IND	index
16	-6,874	Lignée_S++	7	4,42	Lignée_S-	38	-4,514	Lignée_S+
47	-4,921	Lignée_S++	29	1,67	Lignée_S-	49	-4,616	Lignée_S+
53	-5,838	Lignée_S++	30	0,42	Lignée_S-	61	-4,598	Lignée_S+
71	-9,901	Lignée_S++	44	3,48	Lignée_S-	134	-4,334	Lignée_S+
72	-6,027	Lignée_S++	59	1,58	Lignée_S-	146	-4,330	Lignée_S+
91	-5,261	Lignée_S++	85	0,76	Lignée_S-	153	-4,399	Lignée_S+
98	-5,016	Lignée_S++	121	0,67	Lignée_S-	166	-4,499	Lignée_S+
103	-5,853	Lignée_S++	155	1,33	Lignée_S-	178	-4,448	Lignée_S+
105	-5,700	Lignée_S++	159	1,74	Lignée_S-	197	-4,462	Lignée_S+
111	-5,446	Lignée_S++	164	1,13	Lignée_S-	217	-4,526	Lignée_S+
124	-14,414	Lignée_S++	181	1,31	Lignée_S-	221	-4,131	Lignée_S+
126	-5,451	Lignée_S++	187	0,66	Lignée_S-	237	-4,221	Lignée_S+
139	-10,875	Lignée_S++	224	2,92	Lignée_S-	256	-4,586	Lignée_S+
140	-5,157	Lignée_S++	243	5,09	Lignée_S-	257	-4,027	Lignée_S+
161	-8,378	Lignée_S++	246	2,43	Lignée_S-	283	-4,648	Lignée_S+
216	-6,222	Lignée_S++	248	2,13	Lignée_S-	295	-4,334	Lignée_S+
231	-6,453	Lignée_S++	262	2,78	Lignée_S-	303	-4,420	Lignée_S+
234	-5,724	Lignée_S++	268	1,43	Lignée_S-	309	-4,329	Lignée_S+
241	-5,916	Lignée_S++	273	1,87	Lignée_S-	325	-4,156	Lignée_S+
244	-5,389	Lignée_S++	341	3,07	Lignée_S-	354	-4,668	Lignée_S+
272	-6,527	Lignée_S++	342	1,54	Lignée_S-	359	-4,110	Lignée_S+
274	-4,923	Lignée_S++	349	1,82	Lignée_S-	366	-4,259	Lignée_S+
286	-6,959	Lignée_S++	360	1,88	Lignée_S-	375	-4,459	Lignée_S+
302	-5,248	Lignée_S++	365	2,82	Lignée_S-	389	-4,138	Lignée_S+
357	-5,608	Lignée_S++	370	1,72	Lignée_S-	406	-4,214	Lignée_S+
364	-5,453	Lignée_S++	408	0,73	Lignée_S-	421	-4,217	Lignée_S+
371	-5,027	Lignée_S++	409	0,70	Lignée_S-	424	-4,521	Lignée_S+
392	-5,628	Lignée_S++	428	2,66	Lignée_S-	450	-4,676	Lignée_S+
414	-6,693	Lignée_S++	437	1,07	Lignée_S-	485	-4,489	Lignée_S+
476	-6,584	Lignée_S++	470	0,46	Lignée_S-	497	-4,682	Lignée_S+
481	-6,323	Lignée_S++	472	5,20	Lignée_S-	502	-4,183	Lignée_S+
488	-6,455	Lignée_S++	493	1,39	Lignée_S-	521	-4,216	Lignée_S+
499	-4,928	Lignée_S++	494	0,84	Lignée_S-	543	-4,505	Lignée_S+
523	-8,491	Lignée_S++	504	1,22	Lignée_S-	551	-4,530	Lignée_S+
529	-4,978	Lignée_S++	512	1,32	Lignée_S-	588	-4,396	Lignée_S+
545	-5,056	Lignée_S++	532	1,57	Lignée_S-			
560	-6,688	Lignée_S++	559	2,89	Lignée_S-			
595	-5,094	Lignée_S++	561	0,91	Lignée_S-			
614	-5,492	Lignée_S++	623	1,38	Lignée_S-			

ANNEXE 3:

Index de survie individuels des naissains des différentes lignées.

naissain	index	naissain	index	name	index	name	index	name	index
S-44	-5.53	S++11	-5.40	S+90	-5.55	S30_77	-2.80	T-90	-4.15
S-31	-3.92	S++40	-5.14	S+39	-5.04	S30_80	-2.44	T-59	-3.93
S-75	-2.69	S++29	-4.81	S+68	-4.14	S30_04	-1.14	T-77	-3.72
S-68	-2.58	S++75	-4.75	S+71	-4.05	S30_73	-0.911	T-69	-2.89
S-01	-2.49	S++60	-4.65	S+08	-3.98	S30_15	-0.85	T-02	-2.80
S-85	-0.78	S++31	-4.59	S+66	-3.65	S30_32	-0.74	T-10	-2.75
S-43	-0.75	S++95	-3.86	S+17	-3.44	S30_03	-0.69	T-28	-2.43
S-77	-0.72	S++12	-3.81	S+28	-3.41	S30_56	-0.46	T-34	-2.07
S-89	-0.70	S++17	-3.64	S+88	-3.35	S30_86	-0.38	T-68	-1.98
S-86	-0.42	S++15	-3.43	S+34	-3.33	S30_06	-0.38	T-80	-1.95
S-19	-0.36	S++39	-3.16	S+43	-3.23	S30_19	0.01	T-60	-1.83
S-91	-0.35	S++34	-3.15	S+06	-3.09	S30_20	0.02	T-53	-1.71
S-39	-0.24	S++03	-3.06	S+09	-3.06	S30_31	0.05	T-76	-1.50
S-78	-0.08	S++20	-3.03	S+20	-3.05	S30_37	0.06	T-65	-1.40
S-41	0.02	S++41	-2.54	S+93	-2.85	S30_09	0.15	T-70	-1.17
S-13	0.46	S++81	-2.51	S+49	-2.75	S30_74	0.17	T-32	-1.15
S-64	0.53	S++38	-2.49	S+33	-2.75	S30_11	0.18	T-21	-1.10
S-70	0.57	S++26	-2.49	S+52	-2.57	S30_24	0.20	T-44	-1.03
S-06	0.72	S++04	-2.43	S+02	-2.49	S30_12	0.30	T-57	-1.00
S-11	1.12	S++43	-2.41	S+92	-2.43	S30_30	0.49	T-39	-0.96
S-83	1.37	S++76	-2.38	S+30	-2.41	S30_61	0.52	T-41	-0.95
S-72	1.51	S++82	-2.37	S+81	-2.35	S30_71	0.56	T-54	-0.94
S-56	1.65	S++59	-2.37	S+50	-2.27	S30_83	0.57	T-13	-0.92
S-53	1.73	S++70	-2.34	S+61	-2.16	S30_05	0.62	T-56	-0.88
S-79	1.88	S++91	-2.33	S+70	-2.05	S30_69	0.65	T-67	-0.87
S-82	2.01	S++86	-2.25	S+15	-1.97	S30_36	0.67	T-04	-0.84
S-36	2.01	S++07	-2.19	S+76	-1.81	S30_27	0.74	T-03	-0.69
S-76	2.16	S++28	-2.15	S+51	-1.69	S30_28	0.79	T-23	-0.64
S-40	2.16	S++08	-2.14	S+04	-1.69	S30_14	0.80	T-11	-0.61
S-58	2.18	S++37	-1.89	S+03	-1.64	S30_63	0.99	T-58	-0.58
S-81	2.23	S++51	-1.80	S+65	-1.64	S30_91	1.12	T-33	-0.52
S-24	2.25	S++14	-1.62	S+57	-1.58	S30_29	1.24	T-94	-0.50
S-14	2.31	S++02	-1.58	S+46	-1.58	S30_89	1.38	T-79	-0.45
S-55	2.34	S++13	-1.55	S+75	-1.57	S30_51	1.49	T-38	-0.44
S-57	2.43	S++55	-1.47	S+26	-1.48	S30_35	1.50	T-63	-0.43
S-35	2.49	S++42	-1.42	S+44	-1.48	S30_68	1.54	T-75	-0.41
S-51	2.61	S++92	-1.36	S+79	-1.46	S30_58	1.59	T-86	-0.38
S-88	2.79	S++45	-1.36	S+31	-1.32	S30_33	1.60	T-12	-0.37
S-62	2.81	S++84	-1.17	S+60	-1.32	S30_85	2.054	T-71	-0.36
S-74	2.93	S++52	-1.16	S+87	-1.30	S30_72	2.10	T-46	-0.34
S-61	2.94	S++68	-1.16	S+25	-1.20	S30_87	2.12	T-93	-0.34
S-34	3.08	S++22	-1.078	S+59	-1.19	S30_23	2.18	T-95	-0.322
S-26	3.40	S++24	-1.07	S+21	-1.068	S30_93	2.30	T-36	-0.301
S-30	3.41	S++36	-1.01	S+05	-0.95	S30_55	2.30	T-14	-0.289
S-29	3.42	S++53	-0.98	S+41	-0.919	S30_08	2.875	T-91	-0.28
S-37	3.44	S++87	-0.96	S+83	-0.83	S30_84	3.025	T-22	-0.269
S-67	3.47	S++25	-0.85	S+72	-0.78	S30_92	3.276	T-40	-0.211
S-93	3.59	S++01	-0.80	S+73	-0.78	S30_66	3.378	T-06	-0.19
S-80	3.77	S++78	-0.79	S+29	-0.62	S30_13	3.45	T-05	-0.14
S-50	4.06	S++32	-0.72	S+69	-0.54	S30_90	3.56	T-92	-0.137
S-66	4.07	S++57	-0.60	S+78	-0.505	S30_81	3.63	T-16	-0.13
S-47	4.10	S++79	-0.56	S+56	-0.39	S30_53	3.717	T-50	-0.12
S-15	4.14	S++64	-0.49	S+82	-0.379	S30_25	3.73	T-09	-0.121

S-02	4.54	S++93	-0.48	S+47	-0.341	S30_17	3.91	T-01	-0.102
S-18	4.55	S++73	-0.47	S+53	-0.29	S30_41	3.95	T-17	-0.012
S-38	4.63	S++49	-0.43	S+27	-0.25	S30_02	3.98	T-45	-0.0004
S-17	4.69	S++63	-0.37	S+63	-0.249	S30_78	4.037	T-51	0.042
S-59	4.72	S++83	-0.37	S+37	0.136	S30_60	4.087	T-08	0.0779
S-22	4.77	S++58	-0.35	S+80	0.269	S30_38	4.094	T-20	0.17
S-27	4.80	S++90	-0.34	S+48	0.397	S30_10	4.22	T-18	0.23
S-94	5.08	S++27	-0.32	S+85	0.429	S30_49	4.27	T-64	0.26
S-33	5.17	S++65	-0.24	S+64	0.462	S30_42	4.41	T-27	0.31
S-28	5.18	S++23	-0.18	S+18	0.53	S30_57	4.43	T-66	0.39
S-48	5.24	S++62	-0.153	S+24	0.63	S30_79	4.46	T-37	0.43
S-73	5.52	S++77	-0.014	S+10	0.64	S30_64	4.51	T-29	0.51
S-84	5.54	S++47	0.005	S+45	0.65	S30_44	4.62	T-42	0.57
S-07	5.74	S++10	0.14	S+19	0.78	S30_70	4.93	T-19	0.57
S-92	5.74	S++88	0.20	S+86	0.95	S30_39	4.95	T-24	0.66
S-45	6.12	S++67	0.30	S+91	0.99	S30_47	5.071	T-74	0.76
S-95	6.18	S++50	0.41	S+14	1.038	S30_45	5.072	T-55	0.81
S-32	6.54	S++05	0.43	S+95	1.048	S30_18	5.17	T-30	1.10
S-52	6.63	S++72	0.43	S+35	1.055	S30_01	5.299	T-26	1.11
S-46	6.86	S++30	0.51	S+11	1.21	S30_40	5.46	T-85	1.11
S-25	6.96	S++54	0.54	S+74	1.237	S30_67	5.59	T-87	1.22
S-23	7.36	S++89	0.54	S+13	1.27	S30_26	5.66	T-48	1.27
S-04	7.66	S++61	0.69	S+38	1.34	S30_48	5.739	T-81	1.32
S-54	7.77	S++80	1.06	S+55	1.85	S30_21	5.78	T-15	1.42
S-09	7.93	S++35	1.09	S+01	1.91	S30_34	5.79	T-84	1.42
S-20	8.29	S++09	1.16	S+54	1.95	S30_16	5.807	T-62	1.50
S-10	8.32	S++19	1.16	S+94	2.019	S30_46	5.946	T-72	1.81
S-69	8.43	S++06	1.31	S+32	2.052	S30_82	6.0019	T-07	1.91
S-49	8.60	S++85	1.56	S+67	2.115	S30_54	6.036	T-83	1.96
S-42	8.64	S++69	1.83	S+89	2.12	S30_22	6.49	T-88	2.21
S-71	8.93	S++48	1.87	S+16	2.66	S30_59	6.58	T-25	2.46
S-63	8.94	S++56	1.94	S+84	2.95	S30_76	6.66	T-82	2.64
S-21	9.27	S++74	2.27	S+58	2.99	S30_65	6.83	T-61	2.73
S-90	9.38	S++33	2.32	S+62	3.409	S30_52	6.939	T-52	2.82
S-60	9.44	S++66	2.36	S+77	3.59	S30_94	6.97	T-47	3.48
S-16	9.57	S++94	2.50	S+12	4.054	S30_50	6.989	T-35	3.83
S-03	9.61	S++71	2.70	S+23	6.24	S30_75	7.27	T-31	4.73
S-05	10.15	S++16	NA	S+40	6.60	S30_88	7.49	T-89	5.088
S-65	10.27	S++18	NA	S+07	NA	S30_07	7.503	T-73	5.189
S-12	11.41	S++21	NA	S+22	NA	S30_43	8.19	T-43	6.364
S-87	12.24	S++44	NA	S+36	NA	S30_95	8.23	T-78	6.628
S-08	13.34	S++46	NA	S+42	NA	S30_62	8.508	T-49	NA