



HAL
open science

**Caractérisation des paramètres génétiques de la
résistance à certains agents infectieux chez l'huître
creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités
massives**

Patrick Azema

► **To cite this version:**

Patrick Azema. Caractérisation des paramètres génétiques de la résistance à certains agents infectieux chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités massives. Génétique animale. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2018. Français. NNT : 2018IAVF0005 . tel-03392362

HAL Id: tel-03392362

<https://pastel.hal.science/tel-03392362>

Submitted on 21 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT: 2018IAVFF0005

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement
(AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Génétique Animale

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Patrick AZEMA

**Caractérisation des paramètres génétiques de la résistance à
certains agents infectieux chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*,
dans le cadre des mortalités massives**

Directeur de thèse : Tristan RENAULT

Co-directeur de thèse : Pierre BOUDRY

Co-encadrement de la thèse : Marie-Agnès TRAVERS et Lionel DEGREMONT

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 22 mai 2018

Composition du jury :

M. Etienne VERRIER, Professeur, AgroParisTech

Mme Carole MORENO-ROMIEUX, Directeur de recherche, INRA

M. Pierre BOUDINOT, Directeur de recherche, INRA

M. Pierrick HAFFRAY, Responsable section aquacole, SYSAAF

M. Lionel DEGREMONT, Chercheur, Ifremer

M. Pierre BOUDRY, Directeur de recherche, Ifremer

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-encadrant de thèse

Co-directeur de thèse

Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM)

IFREMER

17390 La Tremblade

AVANT-PROPOS

La préparation de cette thèse s'est inscrite dans un projet personnel visant à élargir mon horizon de connaissances et à enrichir mon parcours professionnel. Le Ministère de l'Agriculture offre la possibilité de réaliser une formation complémentaire par la recherche (FCPR) qui permet de doter ses services d'agents ayant une fonction de recherche, à la fois pour assurer le lien entre l'administration et le monde scientifique, et pour renforcer les délégations françaises dans les négociations internationales. C'est dans ce cadre institutionnel que cette thèse a été élaborée.

Je voudrais en tout premier lieu remercier chaleureusement Tristan Renault et Pierre Boudry, mes deux directeurs de thèse, qui m'ont soutenu, orienté et dirigé pendant les trois années de la préparation de cette thèse. Je tiens à les remercier tout particulièrement pour leur disponibilité, leur rapidité de réponse et leur soutien moral. Je souhaite les remercier pour la confiance qu'ils m'ont témoignée, pour leurs encouragements et pour m'avoir donné les clefs afin que je puisse m'épanouir dans ce travail.

Je veux remercier Agnès Travers et Lionel Dégremont, mes deux co-encadrants de thèse, la première pour la partie pathologie, le second pour la partie génétique quantitative. Votre expertise, vos conseils et votre disponibilité, la richesse des échanges que nous avons eus m'ont été indispensables pour avancer dans ce travail.

Je tiens à remercier Etienne Verrier pour avoir accepté de présider le jury de thèse et pour m'avoir permis de préparer un master de recherche « Génétique animale génome et diversité » au sein d'AgoParisTech.

Un grand merci aux membres du comité de suivi de thèse qui, par leur expertise, leurs idées, remarques et réflexions ont beaucoup apporté à la construction du projet.

Je suis également très reconnaissant aux membres de la commission Formation complémentaire par la recherche (FCPR) et notamment son Président Dominique Planchenault et pour leur confiance et pour m'avoir permis de préparer cette thèse dans le cadre du dispositif mis en place par le Ministère de l'Agriculture. J'exprime également ma gratitude au personnel de l'Ecole Nationale des Services Vétérinaires (ENSV) notamment son

directeur Olivier Faugère. Je remercie particulièrement et très chaleureusement Michel Mas pour sa confiance et son accompagnement depuis le tout début de ce projet.

Je tiens à remercier Olivier Cunin pour avoir proposé une thématique pouvant intéresser le bureau de la conchyliculture et des élevages marins à la direction de la pêche maritime et de l'aquaculture et pour avoir soutenu mon projet lors de sa présentation. Merci à Ginette Dambrine et Marc Van de Putte pour avoir également soutenu mon projet par leur lettre d'accompagnement à la commission FCPR.

Je voudrais remercier tout spécialement les équipes de l'Ifremer de La Tremblade : Christian Sylvie Véronique Christian Florence Jean ; l'équipe Ecloserie et génétique : Abdellah, Jean-Christophe, Stéphane (dommage pour le gros lot du loto !), Florence, Jean-Baptiste (un grand merci pour les conseils en calculs en génétique), Serge, Joël, Frédéric, Elise (merci pour les comptages), Pascal P., S. et R., Christophe ; l'équipe Pathologie et le Laboratoire national de référence : Isabelle, Nicole, Cyrille (merci pour les discussions lors des co-voiturages), Bruno, Delphine, Philippe, Coralie, Benjamin, Christine, Céline, Lydie. Merci également à l'équipe du Laboratoire environnement ressource du pertuis charentais : James, Mathilde, Cyrielle ; L'équipe de l'écloserie de Bouin : Christophe, Hubert. Un grand merci à Marie pour son coup de main magistral dans le cadre de son stage. Merci enfin aux doctorants qui ont partagé les bons comme les moments plus difficiles : Leila, Sandy, Ophélie, Amélie, Pierrick.

Le soutien moral de tous, la bonne humeur, les conseils toujours avisés, les discussions lors des repas du midi ont fait que cette période de ma vie a été d'une grande richesse.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je n'évoquais pas tous mes amis de La Rochelle, de Paris, de Toulouse et tous ceux éparpillés en France et dans le monde. J'ai toujours eu une attention bienveillante et chaleureuse qui m'a énormément encouragé lors des moments les moins faciles.

Enfin, je souhaite remercier du fond du cœur ma mère Annick, mon frère Yves et son épouse Sylvie. Je terminerais par Saliha et Emile, merci pour votre amour, votre patience et votre soutien constant.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
TABLE DES MATIERES	3
INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS	9
I. PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	19
I. EVOLUTION GENETIQUE DES ESPECES CULTIVEES : DE LA DOMESTICATION A LA SELECTION	21
I.1.1 LA DOMESTICATION DES ESPECES ANIMALES ET VEGETALES.....	21
I.1.2 LA SELECTION ET L'AMELIORATION GENETIQUE A L'ERE MODERNE	26
I.1.2.1 Du modèle génétique au modèle statistique.....	26
I.1.2.2 Programmes de sélection en production animale	30
I.1.2.2.1 Objectifs et critères de sélection.....	30
I.1.2.2.2 Evaluation génétique des reproducteurs.....	30
I.1.2.2.3 Croisements utilisés	31
I.1.2.2.3.1 Croisement d'absorption ou de substitution	31
I.1.2.2.3.2 Croisement d'amélioration	31
I.1.2.2.3.3 Croisement de production (vigueur hybride ou hétérosis).....	31
I.1.2.3 Sélection chez les animaux aquatiques.....	32
I.1.2.3.1 Amélioration chez les poissons	32
I.1.2.3.2 Amélioration génétique chez les huîtres	35
I.1.2.3.2.1 <i>Amélioration génétique pour la résistance aux maladies chez les huîtres</i>	35
I.2 PRESENTATION DE L'ESPECE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>.....	41
I.2.1 UNE ORGANISATION DE LA FILIERE OSTREICOLE COMPLEXE	42
I.2.1.1 La gouvernance administrative et réglementaire	42
I.2.1.2 Organisation de la recherche, de l'observation/surveillance et de l'expertise dans le domaine ostréicole.....	43
I.2.1.2.1 Surveillance du milieu et de la production ostréicole.....	43
I.2.1.2.1.1 Surveillance sanitaire	43
I.2.1.2.1.2 Surveillance zoosanitaire	44
I.2.1.2.2 Organisation de la recherche française en matière conchylicole	45
I.2.1.2.2.1 L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer).....	45
I.2.1.2.2.2 L'Agence Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).....	46

I.2.1.2.2.3	Le centre nationale de la recherche scientifique (CNRS) et les établissements d'enseignement supérieur	47
I.2.1.3	Les organisations professionnelles.....	47
I.2.1.4	Les assises de la conchyliculture en 2010	48
I.2.2	<i>CRASSOSTREA GIGAS</i> : ETUDE D'UN MODELE BIOLOGIQUE	50
I.2.2.1	Anatomie et biologie élémentaire	50
I.2.2.1.1	Anatomie et biologie élémentaire	50
I.2.2.1.2	Reproduction.....	51
I.2.2.1.3	Cycle biologique de l'huître creuse	54
I.2.2.2	Les mécanismes de défenses de l'huître.....	55
I.2.2.2.1.1	<i>Barrières mécaniques</i>	55
I.2.2.2.1.2	<i>Mécanismes de défenses immunitaires</i>	56
I.2.2.3	La structure du génome de <i>Crassostrea gigas</i>	58
I.2.2.3.1	Outils biomoléculaires disponibles	58
I.2.2.3.2	Modification de la ploïdie	59
I.2.3	LES MALADIES PRESENTES EN FRANCE CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	61
I.2.3.1	Bactéries pathogènes.....	61
I.2.3.1.1	Genre <i>Vibrio</i>	61
I.2.3.1.2	<i>Vibrio aestuarianus</i>	64
I.2.3.1.2.1	Distribution et diversité	64
I.2.3.1.2.2	Facteurs de virulence :	65
I.2.3.1.2.3	Influence des facteurs environnementaux sur l'infection bactérienne:.....	67
I.2.3.1.2.4	Infection bactérienne et facteurs physiologiques :.....	67
I.2.3.2	Virus pathogènes affectant <i>Crassostrea gigas</i>	67
I.2.3.2.1	Infections à OsHV-1 et épisodes de mortalités massives affectant <i>C. gigas</i>	67
I.2.3.2.2	Transmission de la maladie :	68
I.2.3.2.3	Influence des facteurs environnementaux dans l'infection virale.....	69
I.2.3.2.3.1	Influence de la température	69
I.2.3.2.3.2	Autres facteurs environnementaux	70
I.2.3.2.4	Facteurs de l'hôte.....	70
I.2.3.2.4.1	Facteurs génétiques	70
I.2.3.2.4.2	Réponse immunitaire antivirale.....	70
I.2.3.2.5	Co-détection de OsHV-1 et de <i>Vibrio</i>	71
I.3	CONCLUSION : LA LUTTE CONTRE LES MALADIES DES BIVALVES	72

II. DEUXIEME PARTIE ETUDE DES FAMILLES DE PLEIN-FRERES.....	75
II.1 INTRODUCTION.....	77
II.2 PREMIER CHAPITRE : ETUDE DES PARAMETRES GENETIQUES DE LA SURVIE DE L’HUITRE CREUSE DU PACIFIQUE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> , A L’INFECTION PAR OSHV-1 ET PAR <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i>	81
II.3 DEUXIEME CHAPITRE : INFLUENCE DE LA TAILLE ET DU PLACEMENT SUR ESTRAN SUR L’IDENTIFICATION DE FAMILLES D’HUITRES DU PACIFIQUE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> , RESISTANTES OU SENSIBLES A L’INFECTION PAR OSHV-1 μ VAR.	101
II.4 CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE.....	115
II.4.1 EVALUATION DES PARAMETRES GENETIQUES.....	115
II.4.2 UTILISATION DES FAMILLES DANS L’EVALUATION DES PARAMETRES GENETIQUES	116
II.4.3 CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L’EVALUATION DE PARAMETRES GENETIQUES	117
II.4.4 INFLUENCE DU PARCOURS DE VIE DANS L’ESTIMATION DES PARAMETRES GENETIQUES.....	118
III. TROISIEME PARTIE ETUDE DES LOTS GENETIQUEMENT DIFFERENCIES	121
III.1 INTRODUCTION.....	123
III.2 PREMIER CHAPITRE : EFFET DE LA SELECTION POUR UNE MEILLEURE RESISTANCE A L’INFECTION PAR OSHV-1 SUR LA SENSIBILITE A L’INFECTION PAR <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i>	125
III.3 DEUXIEME CHAPITRE : INFECTIONS EXPERIMENTALES SIMPLES OU DOUBLES AVEC <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i> ET OSHV-1 CHEZ DES HUITRES CREUSES DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES AU STADE DU NAISSAIN, JUVENILE ET ADULTE.	147
III.4 CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE	163
III.4.1 LES PROTOCOLES UTILISES ONT PERMIS DE DETERMINER UNE METHODE D’EVALUATION POUR LES INFECTIONS A <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i> PLUS EFFICACE	163
III.4.2 LES PROFILS DE MORTALITES SONT FONCTION DU STADE DE DEVELOPPEMENT DES LOTS ETUDIES	164
III.4.2.1 Primo-infection au stade juvénile	164
III.4.2.2 Une exposition simultanée induit de forts taux de mortalité chez les juvéniles	165
III.4.2.3 Primo-infection au stade adulte, influence du statut reproducteur.....	165
III.4.2.4 <i>C. gigas</i> peut être infecté successivement par <i>V. aestuarianus</i> ne protègent pas les huîtres d’infection ultérieures.....	166
III.4.3 IMPACT DE LA SELECTION SUR LES PROFILS DE MORTALITE	167
III.4.4 IMPACT DU NIVEAU DE PLOÏDIE SUR LA RESISTANCE AUX INFECTIONS.....	168
III.4.5 L’ANALYSE DE L’EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE PERMET DE DISCRIMINER LES LOTS ETUDIES SELON LEUR STATUT IMMUNITAIRE	168

IV. QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GÉNÉRALE	171
IV.1 SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS	173
IV.1.1 PARAMETRES GENETIQUES DE LA SENSIBILITE AUX INFECTIONS PAR <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i> ET PAR OSHV-1μVAR	173
IV.1.2 INFLUENCE DE LA SELECTION POUR UNE MEILLEURE RESISTANCE AUX INFECTIONS PAR OSHV-1 SUR LES INFECTIONS PAR <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i> A DIFFERENTS AGES	174
IV.1.3 LES INFECTIONS PAR OSHV-1 OU PAR <i>VIBRIO AESTUARIANUS</i> PEUVENT-ELLES ETRE CONSIDEREES ET GEREES COMME DES MALADIES ?.....	176
IV.1.3.1 Respect des principes de Koch et de Hill	176
IV.1.3.2 Quel sont les facteurs qui peuvent expliquer une plus forte mortalité lors d'une infection par OsHV-1 ?.....	177
IV.1.3.3 Comment expliquer l'absence d'établissement de sélection naturelle mesurable sur le terrain ?	178
IV.2 PERSPECTIVES	180
IV.2.1 COMPREHENSION DES MECANISMES SOUS-JACENTS DE RESISTANCE AUX INFECTIONS PAR OSHV-1 ET <i>V. AESTUARIANUS</i>	180
IV.2.1.1 Possibilité de création de lignées doublement résistantes à OsHV-1 et à <i>V. aestuarianus</i>	181
IV.2.1.2 Perspectives pour la gestion des maladies des mollusques	182
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	183

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

La production de mollusques marins est en augmentation constante et est devenue l'une des composantes principales des activités aquacoles à travers le monde. Les mollusques sont le deuxième groupe d'animaux produits en aquaculture en nombre et en valeur [1]. La production globale de mollusques a été estimée, en 2014, à 15,3 millions de tonnes pour une production aquacole totale de 73,8 millions de tonnes, soit en valeur 160,2 milliards de US\$. Le système de production des mollusques repose sur un nombre limité d'espèces. Sont principalement élevés des Ostréidés (huîtres), des Mytilidés (moules), des Pectinidés (coquilles Saint Jacques et pétoncles), des Vénéridés (coques et palourdes).

En volume, avec une production de 5,2 millions de tonnes, les huîtres (Ostreidae) représentent un groupe taxonomique important en aquaculture, loin derrière les cyprinidés (environ 27 millions de tonnes en 2014) mais à quasi égalité avec les Tilapias (4,8 millions de tonnes) et les Vénéridés (5,1 millions de tonnes) [2]. L'huître du Pacifique (*Crassostrea gigas*) est la première composante de cette production avec 625,9 millions de tonnes. La Chine est, de loin, le principal producteur d'huîtres au monde avec 4,2 millions de tonnes en 2013). Il est cependant difficile de distinguer les diverses espèces du genre *Crassostrea* produites en Chine (*C. gigas*, *C. hongkongensis*, *C. angulata*, *C. sikamea* ...). Viennent ensuite la Corée du Sud, le Japon et la France. La France produit 80% du total de la production européenne. Les autres pays européens producteurs sont l'Irlande, l'Espagne, les Pays Bas et le Royaume-Uni.

La production conchylicole est directement liée au cycle biologique des mollusques bivalves : l'approvisionnement en juvéniles repose, pour la plupart des espèces élevées, sur le captage naturel. Les larves issues de la reproduction des stocks présents dans le milieu naturel se métamorphosent à l'issue de leur phase pélagique et se fixent. La mise en place de collecteurs permet de leur offrir un support préférentiel à cette fixation, ce qui permet à l'éleveur d'obtenir le naissain, les jeunes animaux récemment fixés. Le naissain collecté est placé dans des structures adaptées à l'espèce (poches pour les huîtres par exemple) ou est semé directement sur le fond. Des écloséries peuvent également, grâce à la maîtrise de la reproduction de quelques espèces, assurer une production de naissain.

Actuellement, l'huître du Pacifique est la principale espèce produite en France, avec une production officielle de 79 220 tonnes en 2012 (contre 107 390 tonnes en 2001 soit une baisse de 26%), avec une valeur marchande en constante augmentation, s'élevant à environ 270 millions d'euros (Agreste – Recensements de la conchyliculture 2001 et 2012)). L'ostréiculture représente environ 2 900 exploitations pour environ 18 000 emplois. L'huître

creuse est une des espèces marines les plus achetées en France, après le saumon et la morue. L'ostréiculture est une composante majeure de l'aquaculture française et demande des mesures de gestion spécifiques. L'huître creuse est élevée en milieu ouvert, le plus souvent en monoculture, dans des écosystèmes largement modifiés par les activités humaines, conditions qui rendent fragile l'élevage ostréicole et limitent les possibilités de diversification et d'adaptation.

L'ostréiculture française a une organisation originale fondée sur un système complexe de transferts des animaux depuis les bassins de captage (principalement Arcachon et Marennes-Oléron) vers des lieux d'élevage et vers des lieux d'affinage. Les autres lieux d'élevages se fournissent soit en naissains naturels issus de ces deux bassins, soit en naissains nés en éclosion. Le naissain capté est élevé dans ces sites de captage ou transféré dans les autres sites d'élevage français (Normandie, Bretagne, Pays de Loire et Méditerranée). Des transferts peuvent également avoir lieu au cours de la période d'élevage entre sites d'élevage. Enfin, les animaux prêts à être consommés peuvent être finalement transférés pour une dernière phase d'affinage. Cette phase permet aux huîtres d'acquérir des qualités organoleptiques différentes comme par exemple en renforçant le muscle adducteur ou en verdissant les branchies. C'est le cas pour les huîtres affinées en claires dans le bassin de Marennes-Oléron. Cette pratique présente un avantage dans la mesure où une appellation d'origine peut être délivrée et ainsi permettre une meilleure valorisation commerciale. Cependant, ces nombreux transferts présentent deux inconvénients majeurs. D'une part, les populations présentent une grande homogénéité génétique et il n'existe pas de populations d'huîtres significativement différenciées et adaptées aux différents sites d'élevage [3]. D'autre part, les agents pathogènes peuvent également être transférés avec les cheptels et peuvent être rapidement et largement diffusés. De plus, le stress induit par le changement de milieu peut également être un élément déclencheur dans le développement d'une maladie, bien que l'espèce soit bien adaptée à l'exondation et aux changements brutaux de conditions environnementales du fait de son habitat naturel intertidal.

La production ostréicole a été modifiée avec l'apparition des techniques permettant de produire des naissains d'huîtres en éclosion. L'élevage et la production d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, en France repose, aujourd'hui, pour environ 70 %, sur le captage de naissain en milieu naturel et pour environ 30% sur la production de naissain en éclosion. Par ailleurs, des techniques pour produire des huîtres triploïdes ont été développées modifiant

également la façon de produire les huîtres. Les huîtres triploïdes ($3n$) sont aujourd'hui obtenues par croisement entre des huîtres femelles diploïdes ($2n = 20$ chromosomes) et des mâles tétraploïdes ($4n = 40$), elles ne produisent pas ou peu de produits génitaux (spermatozoïdes et ovocytes). Dans ces conditions, l'énergie dépensée habituellement par l'huître pour sa reproduction (environ $2/3$ de son énergie en utilisant ses réserves en sucre - glycogène et glucose) est réorientée vers d'autres fonctions comme la croissance. Cela confère à l'huître triploïde un avantage commercial avec la possibilité de la proposer à la vente pendant la période de reproduction, concrètement en été, pendant la saison touristique. Pour cette raison, on les désigne sous la dénomination « huîtres des quatre saisons ».

Les mortalités massives peuvent affecter les larves, les juvéniles et les adultes d'huître creuse *C. gigas*. Elles sont considérées comme l'un des principaux dangers pour l'exploitation cette espèce. Ces mortalités ont été reportées dès le début du XX^{ème} siècle au Japon [4], puis dans les années 50 aux Etats-Unis [5] affectant les animaux adultes et ont été décrites sous le vocable « mortalités estivales ». En France, les mortalités ont été décrites dans les années 80 également chez des animaux adultes et chez des jeunes huîtres [6, 7]. Ces mortalités n'ont pas pu être expliquées par une seule cause : elles font intervenir une combinaison de plusieurs facteurs. Aucun agent pathogène n'avait pu être détecté et des aspects écophysiologiques avaient été mis en évidence. En particulier un développement gonadique rapide et important avait été décrit pour les mortalités au Japon et aux Etats-Unis tandis que la température semblait être un élément déterminant dans les mortalités décrites en France dans les années 1980, mais sans être suffisant pour expliquer à lui seul le phénomène.

Au début des années 90, des mortalités ont été rapportées en France touchant plus particulièrement le naissain et un virus a été mis en évidence, le virus ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) [8, 9]. A la même période, des mortalités massives ont également été observées dans différentes éclosiers françaises en association à la détection du virus OsHV-1 [10].

Au début des années 2000, un vaste programme pluridisciplinaire – MOREST pour « MORtalités ESTivales » – a été développé par l'Ifremer pour clarifier les différentes composantes d'apparition de ces mortalités plus particulièrement chez des animaux âgés de deux ans. Plusieurs facteurs ont été proposés par le programme « MOREST » pouvant expliquer le déclenchement des mortalités estivales : des facteurs environnementaux (température de l'eau, pollutions des eaux des estuaires, pratiques culturelles), des facteurs de l'hôte (déterminisme génétique, déséquilibre métabolique) et l'intervention d'agents

pathogènes. Toutefois, des épisodes particulièrement sévères sont observés depuis 2008. La production française a baissé en 2010 de 30% pour s'établir à 80 000 tonnes. Un agent viral (OsHV-1), et notamment un nouveau variant, nommé OsHV-1 μ var, a été identifié comme la principale cause de ces mortalités précoces [11].

Concernant les mortalités observées chez les huîtres adultes, l'étiologie semble plus complexe. En effet, différents agents infectieux ont pu être mis en évidence sur les animaux moribonds analysés lors des épisodes de mortalités. Des bactéries du genre *Vibrio* ont pu être isolées, notamment du groupe *Vibrio splendidus* et de l'espèce *Vibrio aestuarianus*, parfois en association [12, 13]. Cependant, depuis 2012, des épisodes plus sévères ont été déclarés par les professionnels et *V. aestuarianus* est quasi systématiquement détecté lors des recherches diagnostiques dans le cadre du réseau de surveillance des mortalités des mollusques marins [14-16].

Le vocable « mortalités estivales » a largement été utilisé pour décrire des mortalités massives chez l'huître creuses. Cependant, il est nécessaire de différencier celles touchant les larves et le naissain et celles touchant les animaux adultes [17]. Ainsi, les mortalités au stade naissain sont-elles plus explicitement qualifiées de mortalités massives. Les équipes australiennes ont introduit la notion de syndrome de mortalité de l'huître du Pacifique (POMS, pour Pacific Oyster Mortality Syndrom) qualifiant plus spécifiquement les mortalités ayant pour étiologie OsHV-1, quel que soit le stade affecté.

La gestion des maladies des bivalves marins est particulièrement délicate. Le milieu marin est un milieu dit ouvert dans lequel sont présents de très nombreux agents biologiques [18]. Les mollusques cultivés côtoient une large biodiversité dont les mollusques sauvages et ces deux types de populations peuvent facilement échanger des agents pathogènes. De plus, l'utilisation de médicaments n'est pas possible dans le milieu marin. Les huîtres, comme les autres invertébrés, ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif et dépendent de leur système immunitaire inné pour combattre les maladies ce qui ne permet pas la vaccination au sens conventionnel du terme. La présence d'une coquille limite très fortement l'observation de signes cliniques précoces d'une maladie. De plus, chez les invertébrés, ces signes restent très frustrés et restent d'une aide limitée pour porter un diagnostic. Les maladies sont-elles ainsi découvertes après la mort des individus. Enfin, la traçabilité limitée des mouvements d'animaux rend très difficile la mise en place de méthode de contrôle des maladies infectieuses à l'échelle des différents bassins ostréicoles.

Différentes études menées sur plusieurs espèces d'huîtres ont conclu qu'une amélioration de la survie aux mortalités (ainsi que d'autres caractères d'intérêt pour la production) pouvaient être obtenue par la mise en œuvre de programmes de sélection. Ainsi, Il a été montré que la composante génétique de la résistance de *C. gigas* à l'infection par OsHV-1 est importante [19]. Aussi, des programmes de sélection ont pu être mis en place afin d'obtenir des animaux plus résistants à cette infection. Ainsi, des gains de survie importants ont été obtenus après quatre générations de sélection massale sur estran au stade naissain [7].

L'étude de la variabilité génétique de la résistance à deux maladies infectieuses touchant l'huître creuse, l'infection virale à OsHV-1 et l'infection bactérienne à *V. aestuarianus* est apparue comme particulièrement pertinente. D'une part dans la mesure où la lutte contre les maladies des mollusques marins est difficile, la possibilité de sélectionner des « lignées » d'animaux résistants apparaît comme une solution potentielle. D'autre part la sélection de lignées, notamment de lignées divergentes, présente un intérêt scientifique dans la mesure où elle permet la comparaison de ces lignées [20, 21] et de déterminer si la sélection peut avoir des conséquences sur d'autres caractères.

L'objectif général de cette étude était d'estimer les paramètres génétiques de la résistance aux maladies provoquées par OsHV-1 ou par *Vibrio aestuarianus* à différents stades de développement et dans différents contextes. Nous avons cherché à répondre aux questions de recherche suivantes :

1. Quel est l'importance de la variance génétique pour la sensibilité aux infections par OsHV-1 et par *V. aestuarianus* ?
2. Quelles sont les évolutions de ces sensibilités avec l'âge et/ou la taille des animaux?
3. Quelles sont les corrélations qui peuvent exister entre la sensibilité à l'infection par OsHV-1 et la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* ? La survie dépend-elle d'une robustesse générale ?
4. Quelles sont les évolutions de ces sensibilités avec l'âge et/ou la taille des animaux?

Pour cela, nous avons également considéré :

1. les mortalités observées aux stades naissains, juvéniles et adultes pour des animaux ayant une même origine génétique ;

2. le caractère spécifique (à un agent infectieux) ou global (multi-agent) de la résistance ;
3. Les potentiels liens entre sensibilité aux agents infectieux et réponses physiologiques et immunitaires.

Cette étude s'organise en quatre parties qui suivent cette introduction.

Une **première partie** développe des rappels bibliographiques permettant de contextualiser et de mettre en perspective les résultats présentés.

Une **deuxième partie** présente dans une première partie le travail réalisé sur les quarante familles de plein-frères et estime les paramètres génétiques de la résistance aux infections à *V. aestuarianus* et à OsHV-1 par des infections en conditions expérimentales. Ces mêmes familles ont également été déployées sur le terrain dans différents lieux d'élevage où les agents pathogènes étudiés peuvent être mis en évidence. Dans une deuxième partie, une étude a été consacrée à l'influence du poids initial des animaux déployés sur estran sur les mortalités impliquant OsHV-1 et à l'influence du placement initial du naissain selon différentes hauteurs lors du déploiement sur estran.

Dans une **troisième partie** des lots déjà génétiquement différenciés après trois ou quatre générations de sélection massale pour la résistance du naissain aux mortalités sur estran, c'est-à-dire vis-à-vis d'OsHV-1, ont été utilisées selon des protocoles similaires à ceux utilisés sur les familles de plein-frères. Il s'agissait de caractériser la sensibilité à une infection par *Vibrio aestuarianus* des lignées sélectionnées ou non pour une plus grande résistance à l'infection par OsHV-1, c'est-à-dire de déterminer si les animaux ayant été sélectionnés sur estran au cours des épisodes de mortalité au stade naissain présentaient une plus grande sensibilité à l'infection par *Vibrio aestuarianus* au stade adulte.

Nous avons également étudié les effets d'une double infection par OsHV-1 et par *V. aestuarianus* ainsi que l'influence de la ploïdie dans le cadre d'infections en conditions expérimentales sur les lots issus de la quatrième génération de sélection sur estran. Ces expériences ont été reproduites à cinq reprises, depuis le stade naissain jusqu'au stade adulte. Dans une deuxième étude, nous avons cherché à mettre en évidence les effets de la sélection massale après une infection expérimentale à *Vibrio aestuarianus* et nous avons étudié les effets d'une double infection par OsHV-1 et *V. aestuarianus* ainsi que l'influence de la ploïdie dans le cadre d'infections en conditions expérimentales.

Enfin, une **quatrième partie** discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse pour en dégager des perspectives de recherche concernant l'épidémiologie et la pathogénèse des infections par *V. aestuarianus* et par OsHV-1 et des perspectives dans la gestion délicates de ces deux maladies par les différents acteurs de la filière ostréicole.

I. PREMIERE PARTIE :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES



La relation des hommes avec les animaux et les végétaux est de façon primaire liée à son alimentation. Avec la révolution néolithique, les populations humaines de chasseurs-cueilleurs se sont sédentarisées et les premières espèces animales et végétales ont été domestiquées. Les agriculteurs ont alors patiemment sélectionné les animaux et les plantes les mieux adaptés à leurs besoins, qu'ils soient alimentaires ou pratiques [22].

Parmi les différents groupes d'animaux ayant été sélectionnés, peu appartiennent aux animaux aquatiques [23]. L'aquaculture est actuellement plus proche, par son caractère récent, de l'élevage d'animaux apprivoisés que de l'élevage d'animaux domestiqués et sélectionnés, c'est-à-dire que les populations élevées ne possèdent pas de caractères différenciés par rapport aux populations sauvages.

I. Evolution génétique des espèces cultivées : de la domestication à la sélection

I.1.1 La domestication des espèces animales et végétales

La domestication est un processus d'adaptation ancien et inconscient à la culture des plantes et des animaux. Elle permet de maîtriser l'ensemble du cycle de reproduction et seule une infime proportion parmi les espèces sauvages sont « domesticables ». Selon Price (1984) la domestication des animaux est « le processus par lequel une population d'animaux devient adaptée à l'homme et à l'environnement captif par une ou des combinaisons de modifications génétiques au long des générations et d'événements de développement induits par l'environnement, récurrents à chaque génération » [24]. Une fois domestiquée, il est possible d'améliorer certains caractères utiles d'une espèce par sélection génétique avec l'intention de mieux adapter encore les animaux et les plantes à l'usage qui en est attendu. L'homme exploite pour cela la variabilité génétique de certains caractères d'intérêt dans le but d'accumuler les meilleurs gènes parmi les individus sélectionnés.

Le loup (*Canis lupus*) fut le premier animal à être domestiqué par l'homme, dès le Paléolithique [25]. Les premières traces de différenciation génétique entre le loup et le chien remontent à 100 000 ans BP. Le chien servait d'auxiliaire de chasse dans la société nomade des chasseurs-cueilleurs.

À partir de la révolution agricole du Néolithique, les hommes se sont sédentarisés et ont commencé à développer des techniques agricoles et d'élevage. Cette période, dont les développements les plus importants ont eu lieu de 9000-7000 av. J.-C., s'est accompagnée de plusieurs formes de domestication de plantes et d'animaux dans plusieurs régions séparées du monde appelées foyers de domestication [22]. Les origines de la domestication et les raisons qui y ont conduit font l'objet de différentes théories qui considèrent des facteurs tels que des changements climatiques, l'expansion de la démographie, les pratiques culturelles ou les croyances religieuses.

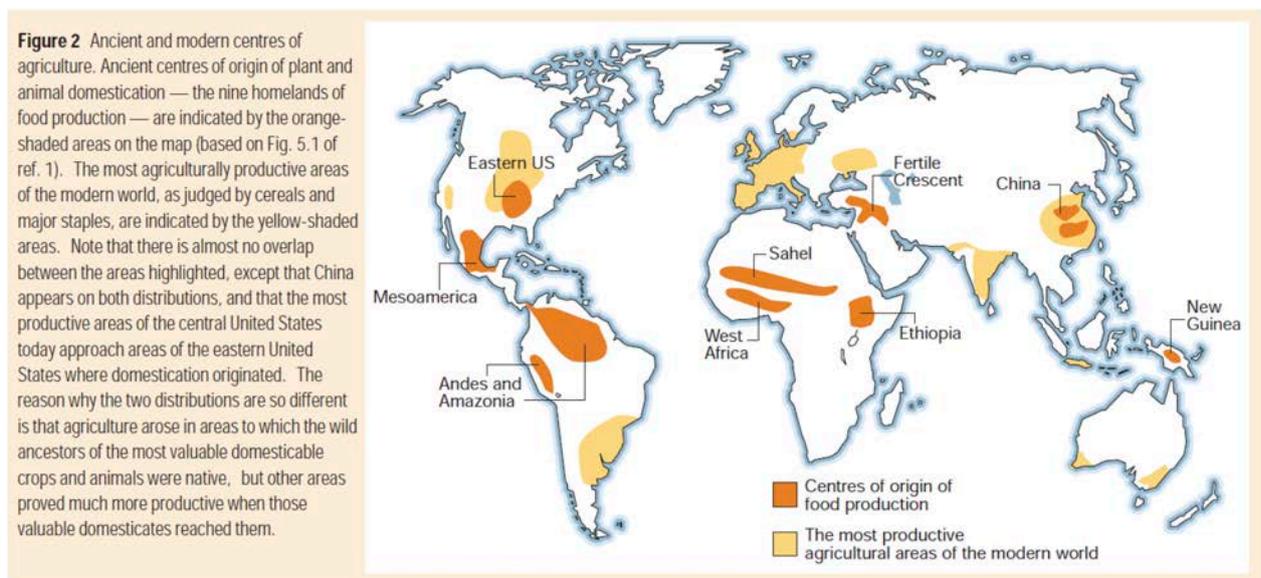


FIGURE 1 Anciens centres de domestication des plantes et des animaux indiqués en orange et zones actuelles les plus productrices, indiquées en jaune, d'après Jared Diamond [26]

La domestication des animaux a permis de produire des ressources alimentaires durables, telles que la viande, le lait et les œufs, mais a permis également de produire des dérivés présentant des usages secondaires utiles pour l'habillement et l'habitat (cuirs, laine, cornes), pour les travaux agricoles (traction animale) et pour la fourniture d'engrais aux plantes cultivées.

La domestication des plantes est contemporaine de la domestication des animaux et a accompagné la transition des sociétés de chasseurs cueilleurs vers les sociétés agricoles sédentaires. Les plantes représentent une part plus importante en nombre et en variété d'espèces domestiquées et on estime à environ 2500 espèces parmi 160 familles qui ont été domestiquées à travers le monde.

TABLE 1 : apparition des foyers de domestication pour les principales espèces animales et végétales domestiquées.

Espèce	Date	Foyer de domestication
Chien	Divergence génétique chien/loup gris il y a environ 100 000 ans. Plus anciens restes confirmés par ADN vieux de 33 000 ans.	Eurasie
Chèvre	10 000 av. J.-C.	Iran
Mouton	8500 à 6500 av. J.-C.	Moyen-Orient
Bœuf et Zébu	8000 av. J.-C.	Moyen-Orient et Inde
Porc	7000 av. J.-C.	Chine, Europe
Chat	7000 av. J.-C.	Bassin méditerranéen
Poule (Gallus gallus)	6000 av. J.-C.	Asie du Sud-Est
Âne commun	5000 av. J.-C.	Afrique du Nord
Cheval	4500 av. J.-C.	Kazakhstan
Buffle	4000 av. J.-C.	Chine
Lama	3500 av. J.-C.	Pérou
Ver à soie	3000 av. J.-C.	Chine
Pigeon biset	3000 av. J.-C.	Égypte, Bassin méditerranéen
Chameau de Bactriane	3000 av. J.-C.	Asie centrale
Dromadaire	2500 av. J.-C.	Arabie
Yak	2500 av. J.-C.	Tibet
Oie cendrée	1500 av. J.-C.	Europe
Oie de Guinée	1500 av. J.-C.	Chine
Alpaga	1500 av. J.-C.	Pérou
Canard	1000 av. J.-C.	Chine
Canard de Barbarie	NC	Amérique du Sud

Espèce	Date	Foyer de domestication
Renne	1000 av. J.-C.	Sibérie
Pintade	NC	Afrique
Carpe commune	NC	Asie de l'Est
Cobaye	500 av. J.-C.30	Pérou
Furet	500 av. J.-C.	Europe
Dinde	500 av. J.-C.	Mexique
Poisson rouge	+ plus de 1000	Chine
Lapin	1600	Europe
Blé, pois, olivier, orge	8500 avant J.-C.	Sud-ouest asiatique
Riz, millet env.	7500 avant J.-C.	Chine
Maïs, haricots, courges	env. 3500 avant J.-C.	Amérique centrale
Pomme de terre, manioc	env. 3500 avant J.-C.	Andes et Amazonie
Tournesol, quinoa	env. 2500 avant J.-C.	Est des Etats-Unis
Sorgho, riz africain	env. 5000 avant J.-C.	Sahel
Igname, palmier à huile	env. 3000 avant J.-C.	Afrique tropicale de l'ouest
Caféier, teff (céréale)	?	Éthiopie
Canne à sucre, bananier	7000 avant J.-C. ?	Nouvelle Guinée
Pavot, avoine	6000-3500 avant J.-C.	Europe de l'Ouest*
Sésame, aubergine	7000 avant J.-C.	Vallée de l'Indus*
Figue de sycomore	6000 avant J.-C.	Égypte*

La domestication s'accompagne de modifications génétiques des populations. Les espèces sélectionnées acquièrent des caractères favorables à leur culture : des caractères morphologiques (taille, coloris, quantité de poil ou laine, présence de cornes), physiologiques (prolificité, précocité, vitesse de croissance), physiques (diminution de la vitesse de course ou de l'aptitude au vol) ou comportementaux (diminution de la distance de fuite, attachement, caractère social). Dans le même temps, les populations domestiquées perdent des caractéristiques indispensables à la vie en milieu naturel tels que la fuite devant les prédateurs. On appelle syndrome de domestication l'ensemble des caractères qui distinguent une espèce cultivée des espèces sauvages proches. Les processus génétiques liés à la domestication comprennent la sélection volontaire ou involontaire, la relaxation de la sélection naturelle et la dérive génétique [27].

I.1.2 La sélection et l'amélioration génétique à l'ère moderne

Avec le développement de l'agriculture, construite à partir de la domestication de différentes espèces animales et végétales, le premier mode empirique de sélection utilisé fut la sélection massale fondée sur le phénotype : les premiers agriculteurs ont intuitivement choisi les individus les plus intéressants sur divers caractères d'intérêt dépendant de l'utilisation de l'espèce ciblée (productivité, goût, qualités nutritionnelles, résistance aux maladies...etc.).

L'élevage sélectif des animaux a pris un essor particulier au cours du XIXème siècle par la rationalisation des conduites de reproduction et ont permis l'apparition de lignées dont les individus présentent des phénotypes très proches entre eux. Ces lignées sont les races pour les chiens, les ruminants ou les chevaux, sont des lignées pour les volailles et les porcs, des cultivars pour les plantes. Une sélection sur ascendance ou sur descendance s'est-elle ainsi mise en place.

I.1.2.1 Du modèle génétique au modèle statistique

A partir du début du XXème siècle, les principales lois de la génétique sont élaborées. Avec la redécouverte des lois de Mendel qui définissent la manière dont se transmettent les gènes de génération en génération, puis avec les expériences menées sur les souris par Cuénot et les expériences de Morgan sur les drosophiles, les lois de l'hérédité sont considérées comme communes au monde végétal et au monde animal. Avec ces expériences, les notions de gènes et d'allèles vont être affinées. Ces notions pouvant s'appliquer facilement sur des caractères

discrets étaient plus difficiles à mettre en évidence pour des caractères à variation continue tels la taille, le poids corporel, la quantité de lait, la teneur en éléments nutritifs, la précocité de maturité sexuelle...etc.

Le statisticien Ronald Fisher a proposé un modèle de synthèse avec l'introduction du modèle infinitésimal : de nombreux gènes apportent, indépendamment les uns des autres, leurs contributions à l'expression d'un caractère [28]. Ce modèle est apparu particulièrement opérationnel. La génétique quantitative, qui se propose de rendre compte de l'hérédité des caractères à variation continue – les caractères quantitatifs – était née. L'amélioration des espèces domestiques s'est ainsi accélérée avec de l'essor de méthodes rationnelles regroupant les modèles de la génétique quantitative, le développement des expérimentations et l'usage des statistiques.

Après la seconde guerre mondiale, les méthodes de calculs de la valeur génétique des individus reproducteurs ont bénéficié des apports théoriques en science des statistiques développées par les statisticiens tels que Kempthorne [29], Lush [30], Hazel [31] ou Henderson [32]. Ainsi des programmes de sélection intégrés ont-ils pu être optimisés par ces méthodes statistiques.

La sélection des animaux, pour un caractère donné, se base alors sur une évaluation de la valeur génétique transmissible des animaux, corrigée des effets non génétiques. L'évaluation génétique des animaux s'effectue à partir des phénotypes (ou performances) observés. Le phénotype (P) d'un animal se décompose traditionnellement de la manière suivante : $P = E + G$ où E est l'effet de l'environnement (ou milieu) sur la performance de l'animal et G est l'effet du génotype de l'animal. Chaque composante du modèle est décomposée dans le but de représenter les effets des gènes et des conditions d'élevage de la manière la plus précise possible. Génotype et environnement sont supposés agir de façon additive.

La mesure des performances d'individus apparentés ont permis la mesure des paramètres génétiques d'un caractère. En combinant plusieurs caractères, il est possible d'élaborer des index [31, 32]. Les modèles statistiques de la génétique quantitative sont des modèles mixtes à effets fixes et à effets aléatoires. Les effets de milieu (troupeau, année, saison, rang de vêlage, etc.) sont généralement considérés comme fixes alors que les valeurs génétiques sont supposées aléatoires.

A partir 1975, Henderson, introduisit la notion de Best Linear Unbiased Predictor (BLUP), méthode qui permet de tirer au mieux parti de l'ensemble des informations disponibles dans une population apparentée, notamment à travers les dispositifs de contrôle des performances [33].

Des moyens de mesure ont été mis en œuvre à grande échelle pour les principales espèces cultivées. Les schémas de sélection des bovins par exemple mettent en œuvre des stations de sélection avec de nombreux taureaux dont la semence est testée sur de nombreuses femelles dans les élevages. Les performances des descendants sont précisément mesurées et centralisées pour choisir les meilleurs animaux reproducteurs [34].

La prédiction de la valeur génétique d'un individu à l'aide du BLUP-modèle animal prend en compte l'ensemble des performances mesurées sur tous les animaux apparentés. Les valeurs génétiques de tous les animaux sont prédites quelle que soit la quantité d'information disponible pour chaque animal, en résolvant les équations du modèle mixte. Le BLUP-modèle animal constitue actuellement la référence internationale. Il assure une évaluation individuelle de tous les animaux, qu'ils soient issus d'une ou plusieurs générations, qu'ils aient ou non des données et quelle que soit la structure des apparentements en jeu [35].

En France, la méthode des BLUP a été étendue à de nombreuses espèces de rente au cours des années 1990. Les bovins laitiers [36] et les ovins et caprins laitiers [37] ont été les premiers à bénéficier de cette approche. Pour les animaux allaitants des caractères particuliers tels l'importance des effets directs et maternels ont été pris en compte. Pour les espèces dont les modes de production sont plus industrialisés, essentiellement les porcins et les volailles, des firmes de sélection spécialisées ont vu le jour et ont mis en œuvre des méthodes de sélection pour des lignées détenues en propre.

Cette méthode a permis un gain génétique certain ces dernières années dans de nombreuses filières. Cependant, elle peut être complexe et coûteuse, en particulier quand le phénotype ne peut pas être mesuré sur le candidat à la sélection comme chez les taureaux laitiers. Ce dispositif de sélection demande de longues années d'observation et de mesures sur descendance pour identifier les animaux candidats à la reproduction. De plus, même quand le caractère est observable, la sélection a une efficacité limitée quand le phénotype dépend essentiellement du milieu, c'est-à-dire quand l'héritabilité est faible. C'est avec le séquençage de l'ADN que de nouvelles perspectives pour la sélection se sont ouvertes.

L'utilisation des marqueurs ADN pour la sélection animale présente l'avantage d'augmenter la précision des valeurs génétiques (ou EBV : Estimated Breeding Values) notamment sur les jeunes animaux et sur des caractères difficilement mesurables.

Depuis le milieu des années 1990, la génomique appliquée aux espèces d'élevage a permis de détecter des marqueurs moléculaires de régions chromosomiques ayant un effet quantitatif significatif sur les caractères d'intérêt appelés QTL (Quantitative Trait Loci). Un marqueur génétique peut être défini comme un endroit du génome (locus) se présentant sous différentes formes (allèles) dans une population. Ils constituent les outils élémentaires pour « baliser » le génome et sont aussi de véritables traceurs de l'information génétique entre générations. Les deux grands types de marqueurs utilisés en génomique sont les microsatellites et les SNP (Single Nucleotide Polymorphisms).

Les marqueurs microsatellites sont mis en évidence par la répétition de séquence d'un faible nombre de bases (de 2 à 5 paires de bases). Ils ont l'avantage d'être très polymorphes donc très informatifs.

Les marqueurs SNP correspondent quant à eux au polymorphisme d'une seule paire de bases (A, G, T, C). Contrairement aux marqueurs microsatellites, ils sont très abondants (1 SNP toutes les 100 à 1 000 bases soit plusieurs millions de SNP dans une population donnée) et peuvent être présents dans les gènes. Ils sont le plus souvent bi-alléliques ce qui les rend peu informatifs individuellement : cela est compensé par leur grand nombre.

La sélection génomique est basée sur les mêmes principes que la sélection classique : à partir de mesures phénotypiques, on prédit à l'aide d'une méthode statistique appropriée la valeur génétique des individus, y compris de ceux qui n'ont pas de phénotypes ou de descendance [38]. Les progrès technologiques récents en matière de génotypage (disponibilité de puces SNP chez plusieurs de nos espèces d'intérêt) ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de la sélection animale. L'information moléculaire dense de ces marqueurs permet une estimation plus précise de la valeur génétique d'un individu dès la naissance. Les programmes d'évaluation génétique des reproducteurs ont dû être revisités pour prendre en compte ces nouvelles informations [39].

I.1.2.2 Programmes de sélection en production animale

L'amélioration des productions animales met en œuvre trois voies principales : l'amélioration des individus par l'amélioration génétique, l'amélioration des conditions de milieu dans lesquelles les animaux sont entretenus (pratique d'élevage, alimentation, maîtrise des conditions sanitaires) et l'amélioration de l'organisation des filières de production animale. Ces trois conditions interdépendantes sont prises en compte dans les programmes de sélection génétique. Selon Harris et Newman (1994), la mise en place d'un programme de sélection efficace repose sur quatre étapes fondamentales : (i) la détermination d'objectifs et de critères de sélection, (ii) la réalisation d'évaluations génétiques permettant un choix objectif des reproducteurs, (iii) l'organisation et l'optimisation des différentes actions de création du progrès génétique et (iv) la diffusion de ce progrès génétique dans la population via diverses stratégies d'utilisation des reproducteurs [40].

I.1.2.2.1 Objectifs et critères de sélection

Des objectifs de sélection doivent être élaborés pour les caractères dont on souhaite obtenir l'amélioration. Ces objectifs doivent pouvoir être mesurés directement ou indirectement. S'il n'est pas possible de mesurer directement le caractère que l'on souhaite sélectionner, on établit des critères de sélection qui vont être introduits et pondérés dans des index de sélection. Les index incluent la valeur génétique d'un individu pour un ou plusieurs caractères permettant le classement des candidats à la sélection. Ces critères doivent être corrélés avec les objectifs de sélection. Par exemple, la mesure d'un indice de consommation entre 30 et 95 kg n'est pas mesurable chez les cochettes et les jeunes verrats en élevage. On utilise alors le gain moyen quotidien qui est fortement corrélé avec l'indice de consommation. Les critères de pondération des index doivent être déterminés et révisés régulièrement en fonction des objectifs de sélection fixés.

I.1.2.2.2 Evaluation génétique des reproducteurs

L'évaluation des reproducteurs est une phase essentielle dans la mise en œuvre d'un programme de sélection. Elle dépend du caractère choisi (production, fertilité, résistance, etc.) et des moyens mis en œuvre pour la mesure du phénotype. Des stations de contrôle des reproducteurs ont été créées à partir du début du vingtième siècle pour les principales espèces terrestres. Le recours au BLUP/modèle animal a été généralisé dans tous les programmes récents à partir des années 1990 permettant de mieux corriger les effets du milieu et de

prendre en compte le progrès génétique sous-jacent, en premier lieu sur les bovins laitiers [36, 41].

1.1.2.2.3 Croisements utilisés

Différents croisements sont utilisés pour diffuser un gène ou des caractères d'intérêts dans une population. La Sélection et le croisement sont des voies complémentaires d'amélioration, par la première on exploite la variabilité intra-race, par la seconde la variabilité inter-race. Les deux types majeurs de plans de croisement sont d'une part les croisements permettant de modifier une population existante ou de créer une nouvelle population et d'autre part d'obtenir une génération terminale d'animaux croisés à partir des mêmes races parentales [42]. Pour pouvoir optimiser les différents types de croisement, des races pures de qualité doivent être disponibles.

1.1.2.2.3.1 Croisement d'absorption ou de substitution

L'objectif du croisement d'absorption ou de substitution est d'améliorer une race en opérant des croisements avec une race améliorante. Les croisements sont répétés pendant plusieurs générations afin d'introduire un ou des caractères d'intérêt dans la race à améliorer. A priori tous les individus d'une race à améliorer ne sont pas utilisés dans le schéma de sélection mais le risque est de voir une race locale de faible effectif être absorbée en totalité par une race améliorante à fort effectif.

1.1.2.2.3.2 Croisement d'amélioration

L'objectif du croisement d'amélioration est d'améliorer une race donnée par des croisements avec une race extérieure sans aller jusqu'au remplacement de la race originelle. On peut alors accélérer le progrès dans une direction donnée ou augmenter la variabilité génétique. Les objectifs doivent être clairement définis si on ne veut pas que le croisement d'amélioration ne se transforme en croisement d'absorption.

1.1.2.2.3.3 Croisement de production (vigueur hybride ou hétérosis)

Les croisements de production peuvent être réalisés sur une seule génération, entre deux races pures, tous les produits seront abattus à l'issue de ce croisement. On peut également réaliser des croisements sur deux générations avec des croisements à double étages à trois ou quatre voies impliquant trois ou quatre races pures. Le croisement entre plusieurs races présence un

double intérêt. D'une part, cela permet de combiner les qualités de chacune des races parentales. En races allaitantes par exemple, on utilise généralement une race maternelle présentant de bonnes aptitudes d'élevage et une race paternelle présentant de bonnes aptitudes bouchères. D'autre part, ce croisement permet de bénéficier de l'effet hétérosis, ou vigueur hybride, qui est la supériorité phénotypique moyenne de la progéniture croisée par rapport à la moyenne des performances parentales. C'est l'expression de phénomènes d'interaction entre les gènes (essentiellement dominance et épistasie) qui sont amplifiés avec le croisement de races ou de lignées génétiquement différentes. L'hétérosis présente plusieurs facteurs de variation dont le déterminisme génétique des caractères, l'éloignement génétique des populations croisées, la nature du croisement réalisé, le sens du croisement et les conditions du milieu [43]. Les croisements augmentent l'hétérozygotie des descendants et génèrent un hétérosis d'autant plus élevé que les effets d'interaction sont importants. Ainsi l'hétérosis varie en sens inverse de l'héritabilité [44].

I.1.2.3 Sélection chez les animaux aquatiques

Les organismes terrestres ont été domestiqués les plus tôt et la sélection génétique a conduit à des gains de productivité et de viabilité substantiels [45]. Les animaux aquatiques ont été domestiqués plus tardivement puisqu'il a été estimé que 97 % de toutes les espèces aquatiques cultivées ont été domestiquées depuis le début du XXème siècle [46] et le développement aquacole s'est largement appuyé sur l'élevage de nouvelles espèces [47]. Aujourd'hui, l'aquaculture est une des activités de production animale parmi les plus diversifiées en ce qui concerne le nombre d'espèces élevées, les écosystèmes concernés et les niveaux d'intensification.

I.1.2.3.1 Amélioration chez les poissons

Les premiers essais de sélection en aquaculture remontent aux années 1920. Ils ont été notamment réalisés sur une espèce de truite (truite mouchetée, *Salvelinus fontinalis*) et visaient à améliorer la survie à une maladie, la furonculose. Les premiers programmes reposaient sur une sélection massale individuelle, rendue possible dans la mesure où les caractères améliorés pouvaient représenter un gain économique important et qu'ils pouvaient être facilement mis en œuvre. Toutefois, les nombreuses expériences menées sur différentes espèces de poissons ont montré une très faible efficacité de ces programmes. En effet, l'accumulation incontrôlée de la consanguinité a rapidement limité les progrès obtenus [48].

En effet, le fait que les animaux aquatiques aient une très grande fertilité et que seuls quelques reproducteurs puissent réellement participer à la reproduction lors de pontes en masse peut rapidement amener à un taux élevé de consanguinité. Les croisements consanguins vont avoir pour conséquence un phénomène de dépression de consanguinité avec une réduction de la valeur sélective (fitness) des individus par rapport à la population concernée [49].

Afin de limiter ces effets, des programmes plus élaborés, reposant notamment sur une sélection familiale ont vu le jour. Le premier programme basé sur la sélection familiale n'a été mis en place qu'à partir de 1975 suite aux résultats encourageants obtenus par les fermes aquacoles le long des côtes norvégiennes [50]. Toutefois, les programmes de sélection familiale nécessitent de mettre en place une séparation stricte de chaque famille avant l'évaluation génétique des géniteurs. Pour cela, chaque famille doit être élevée séparément avant que les individus ne puissent être identifiés individuellement. Dans ce cas, les effets maternels initiaux, généralement importants pour les espèces pondant des œufs, peuvent masquer la valeur génétique des individus. Une autre méthode consiste à réaliser des assignations de parenté *a posteriori* et ainsi limiter le taux de consanguinité. Cette méthode a pour inconvénient un coût important de réalisation des analyses de reconstruction du pedigree des animaux.

En France, un programme mixte de sélection familiale et de sélection massale a été développé par Chevassus en 1986, la méthode PORSPER (PROcédure de Sélection individuelle optimisée par Epreuves Répétées), pour proposer une alternative moins coûteuse à la sélection familiale et pour prendre en considération les facteurs pouvant limiter l'efficacité de la sélection massale [23, 51]. Cette méthode prend notamment en compte les interactions sociales entre individus de taille différente en éliminant les individus les plus petits lors d'épreuves répétées sur groupes triés.

Aujourd'hui, à l'exception de quelques espèces de poissons, essentiellement des salmonidés et des tilapias, l'utilisation de programmes d'amélioration génétique en aquaculture reste cependant limitée dans la mesure où seuls 8% des géniteurs utilisés en aquaculture sont actuellement issus de programmes de sélection [48]. La plupart des espèces actuellement cultivées sont encore très proches des populations sauvages non domestiquées [27]. Il existe donc un important potentiel d'amélioration de la productivité de l'aquaculture à travers l'application de programmes de sélection, la diversité génétique présente dans les populations sauvages étant large.

Toutefois, à cause de la domestication parfois incomplète des espèces aquatiques, il est important de prendre en compte certains aspects liés à une sélection génétique appliquée sur une espèce aquatique. Il faut d'abord s'assurer que l'amélioration est viable, productive et permet de maintenir une variabilité génétique dans les populations sélectionnées. Ensuite, il faut tenir compte des impacts sur les populations sauvages qui peuvent être géographiquement proches. L'introduction d'espèces non indigènes, dites allochtones, peut conduire à des invasions et à la perturbation des écosystèmes et des habitats. Elle peut également mener à des transferts et à la multiplication d'agents pathogènes. Il existe donc des risques importants lors de l'introduction d'espèces non indigènes. Lorsque ces risques sont mis en évidence il est généralement trop tard pour mettre en œuvre des méthodes de lutte, d'autant plus dans un milieu ouvert tel que le milieu aquatique, où les contacts entre populations sauvages et populations cultivées sont étroits et permanents.

Sélectionner pour améliorer la résistance à une maladie offre de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes de contrôle. C'est un moyen relativement facile et peu coûteux pour améliorer la santé, le bien-être et la productivité des animaux. Les organismes pathogènes développent des résistances aux médicaments utilisés pour les contrôler et le coût des traitements augmente plus vite que la valeur des animaux. Aussi, la sélection pour une meilleure résistance à une maladie se développe pour de nombreuses espèces animales, qu'elles soient terrestres ou aquatiques [52]. Dans la mesure où l'environnement marin est un milieu ouvert difficilement contrôlable, la sélection génétique pour améliorer la survie à des maladies est une option intéressante pour réduire l'impact de ces maladies sur la production aquacole.

Les maladies – qu'elles soient d'origine infectieuses, dues à des stress environnementaux ou d'origine génétique – sont des facteurs limitant fortement le développement de l'aquaculture dans le monde. Les méthodes de contrôle de ces maladies diffèrent selon qu'il s'agit d'espèces vertébrées ou invertébrées. Chez les poissons, pour contrôler – ou éradiquer – une maladie, on peut utiliser des médicaments, la vaccination, la désinfection des installations ou la sélection génétique pour la résistance. Là encore, dans la mesure où l'utilisation à grande échelle de substances chimiques dans l'eau n'est pas envisageable, la sélection génétique présente des atouts intéressants.

Il est intéressant de constater qu'une grande variabilité génétique a été constatée pour la résistance aux principales maladies affectant les animaux aquatiques. En reproduisant les

maladies en conditions expérimentales il est possible de réaliser des gains génétiques moyens de 12,5% en moyenne [48]. Il est ainsi possible de produire des lignées de poissons ou de coquillages possédant une résistance notable pour des maladies importantes.

1.1.2.3.2 Amélioration génétique chez les huîtres

Les différentes espèces d'huîtres ne sont pas considérées comme domestiques mais plutôt comme des espèces « apprivoisées » que l'homme met en culture dans des conditions favorables à leur développement. En Europe, des populations sauvages d'huîtres du Pacifique, issus des animaux déployés en France dans les années 1970 au cours de l'opération RESUR, ont colonisé tous les estrans de la façade Atlantique du Portugal jusqu'à la Suède. Toutefois, les études génétiques en phylogénie menées sur les populations sauvages et sur les populations cultivées n'ont pas mis en évidence des différences entre elles [53]. Depuis le début des années 80, le cycle de vie des huîtres est complètement maîtrisé en éclosion. Des objectifs de sélection ont été définis dans différents pays au travers de programmes de sélection privés essentiellement, même si des programmes de sélection publics ont également été mis en place.

L'importance économique de la production ostréicole, le contrôle des cycles biologiques, la grande fécondité et la variabilité génétique sont les facteurs particuliers qui permettent de facilement mettre en œuvre des programmes de sélection. Les premiers programmes de sélection se sont concentrés sur des caractères d'importance économique tels que la croissance et les programmes relatifs à la résistance aux maladies ne représentent que 10% des programmes mis en œuvre [54].

Une des particularités utilisées dans la production ostréicole est la possibilité de modifier la ploïdie et d'obtenir des animaux tétraploïdes et des animaux triploïdes lesquels présentent des caractéristiques zootechniques apportant des avantages substantiels aux éleveurs.

1.1.2.3.2.1 Amélioration génétique pour la résistance aux maladies chez les huîtres

Les huîtres sont soumises aux variations du milieu marin et sont en contact avec de nombreux agents potentiellement infectieux. Les huîtres peuvent développer des maladies aux origines variées ce qui peut aboutir à des épisodes de mortalité sévères. L'environnement marin ne peut pas être directement contrôlé et les méthodes de prophylaxie médicales ne sont pas disponibles, d'une part parce que le déversement massif de produits de traitement n'est pas

possible et d'autre part parce que le système immunitaire inné des invertébrés ne permet pas de vacciner les animaux. Aussi, des programmes de sélection ont-ils été développés dans différents pays pour différentes espèces d'huîtres dont la production était impactée par des maladies afin d'améliorer la survie des animaux. Pour l'ensemble des programmes des gains significatifs de survie ont été observés. Ainsi, le caractère de la résistance pour les différentes maladies étudiées présente une variance génétique. Cependant, les paramètres génétiques ont rarement pu être correctement estimés. Il est en effet intéressant de connaître les éventuelles corrélations génétiques qui peuvent exister entre la résistance à deux maladies différentes. De manière générale, il semble toutefois que la sélection pour la résistance à une maladie n'améliore pas la résistance à une autre maladie.

1.1.2.3.2.1. Mortalités estivales et résistance à OsHV-1 chez C. gigas

Les mortalités estivales sont considérées comme un des principaux dangers pour la production ostréicole. Ces phénomènes se caractérisent par des mortalités massives et soudaines d'individus, généralement en période estivale. Ces mortalités ont été reportées dès 1915 au Japon [4] puis au cours des années 50 aux USA [5] puis des années 80 en France [6]. Les mortalités estivales peuvent affecter les animaux juvéniles comme les adultes, les animaux diploïdes comme les triploïdes [55]. De manière générale, les mortalités constatées ne peuvent être expliquées par un seul facteur mais par une combinaison de paramètres incluant la qualité de l'environnement, des facteurs saisonniers, les pratiques culturales [56-58], les conditions physiologiques, la présence d'agents infectieux [59] ou des prédispositions génétiques. La désignation de ces mortalités peut être variable d'une région du monde à l'autre : on parle de mortalités massives, mortalités estivales, POMS. Les moyens pour limiter l'apparition de ces mortalités sont très limités. Il s'agit le plus souvent de pratiques culturales adaptées localement à un environnement donné et qui peuvent difficilement être mises en œuvre de manière systématique.

Des expériences de sélection pour améliorer la survie à des mortalités ont été menées, souvent couplées avec un effort de sélection sur la croissance des animaux. Afin de mesurer le progrès en termes de survie, il est habituel de comparer les taux de mortalité des animaux sélectionnés avec ceux d'animaux témoins issus des mêmes populations initiales, ce qui demande un effort particulier de traçabilité.

Les premières études d'amélioration à la survie aux mortalités estivales ont été conduites aux USA en se basant d'abord sur des challenges en laboratoire de stress thermique (21°C)

réalisés sur des adultes en se fondant sur la relation supposée entre température et mortalités [60, 61] puis sur des challenges réalisés sur dans des fermes ostréicoles ayant subi des mortalités estivales. La survie des familles sélectionnées a été améliorée mais cependant les paramètres génétiques n'ont pas été estimés.

En France, le défi MOREST (MORTalités ESTivales) a été mis en œuvre pour mieux comprendre le phénomène de mortalité estivale chez *Crassostrea gigas* par une approche multidisciplinaire alliant études en pathologie, en génétique, en physiologie, en immunologie. Un des principaux objectifs était de déterminer si la sélection pouvait améliorer la survie. Les différences de survie des différentes familles ont révélé une base génétique forte pour la survie aux mortalités estivales [62]. Une sélection divergente, en reproduisant entre elles d'un côté les meilleures familles et de l'autre les plus mauvaises en terme de survie a permis de mettre en évidence une réponse importante à la sélection. Les paramètres génétiques ont pu être estimés pour le caractère de survie sans que l'agent étiologique puisse être précisément déterminé. La survie des animaux était toutefois fortement corrélée à la résistance à l'infection par OsHV-1. Ainsi, les mortalités observées pouvaient être liées à la présence d'agents pathogènes tels que OsHV-1 [63] ou *V. splendidus* [64]. Les résultats obtenus ont montré que la sélection pour une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 ne permettait d'améliorer la résistance à *V. splendidus*.

Un programme récent de sélection a été mené à la station Ifremer de La Tremblade [7] entre 2009 et 2013. Ce programme de sélection massale a été conduit sur le terrain. La cinétique de mortalité et les fortes concentrations d'ADN d'OsHV-1 suggèrent que les mortalités observées avaient pour facteur principal l'infection par OsHV-1, bien que d'autres agents pathogènes aient pu également intervenir. En effet, OsHV-1 peut être considéré comme le principal facteur de mortalité lorsque les concentrations en ADN viral dépassent 10^5 copies par mg de tissus frais [65-68].

Ce programme expérimental de sélection a fourni de très bons résultats après 4 générations de sélection massale, avec un gain de survie de 10 à 15 % par an, ce qui a permis de ramener les taux de mortalité sur le naissain sélectionné à des taux habituellement observés sur le naissain en dehors d'épisode de mortalité. De plus, le rendement des animaux sélectionnés étaient 10 à 15 fois supérieur par rapport aux animaux témoins.

Les animaux issus de la troisième génération de sélection de ce programme ont été utilisés dans le présent travail de thèse afin de mesurer l'impact de la sélection pour une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 au stade naissain sur la résistance à l'infection par *Vibrio aestuarianus* à différents stade de développement, et présenté dans le chapitre II.

Des programmes de sélection pour la résistance aux maladies ont également été mis en œuvre dans d'autres espèces d'huîtres.

1.1.2.3.2.1. Programmes de sélection chez les autres espèces d'huîtres

Différentes espèces d'huîtres ont fait l'objet de programme de sélection afin d'améliorer la résistance de différentes maladies, notamment pour des maladies parasitaires. Dégremont et al. ont fait une revue de ces différents programmes dans le monde [54]. Ces programmes ont été menés soit de façon expérimentale, soit par des déploiements sur le terrain. Ils ont tous été menés par sélection massale, c'est-à-dire en reproduisant les survivants aux maladies étudiées. Ces études se sont concentrées sur les gains de survie et non sur leur déterminisme. Aussi, dans la plupart des études, les estimations de l'héritabilité n'ont pas été menées.

Pour la résistance à *B. ostreae* chez *O. edulis*, plusieurs programmes ont été menés aux Etats-Unis [69], en France [70] et en Irlande [71]. Ces différents programmes ont permis d'améliorer de manière significative la résistance à la bonamiose. En France, toutefois, les résultats de ces programmes de sélection ont donné des résultats contrastés, vraisemblablement pour des problèmes de consanguinité [72, 73]. Par ailleurs, les professionnels n'ont pas souhaité bénéficier des améliorations de survie, la possibilité de commercialiser les animaux avant l'apparition de la maladie restant possible.

Certains programmes de sélection se sont intéressés à la résistance à deux maladies parasitaires qui infecteraient simultanément des individus au cours de leur cycle de production. C'est le cas pour le programme de sélection pour la résistance aux infections à *B. roughleyi* et *M. sydneyi* mené sur l'huître *S. glomerata* en Australie. C'est également le cas pour un programme de sélection pour la résistance aux infections à *H. nelsoni* et à *P. marinus* chez l'huître de Virginie, *C. virginica*, aux États-Unis. La bactérie *R. crassostrea* est responsable d'une maladie chez les juvéniles de *C. virginica* aux Etats-Unis (Juvenile Oyster Disease - JOD), généralement pendant l'été [74, 75]. La maladie est négativement corrélée avec la longueur de la coquille et un programme de sélection a été mené sur la croissance afin

de prendre de vitesse la maladie et de pouvoir commercialiser les animaux avant son déclenchement.

Les programmes de sélection menés sur la résistance aux maladies des huîtres ont comme point commun d'augmenter la productivité des productions et ils ne visent généralement pas à expliciter les causes des mortalités. La plupart des études de sélection ont montré des résultats probants dès quatre générations de sélection. L'étude des programmes de sélection montre également que de manière générale la sélection pour une maladie donnée n'améliore pas la résistance à une autre maladie. Il est toutefois possible de mener une sélection pour deux caractères de résistance.

I.2 Présentation de l'espèce *Crassostrea gigas*

La pêche et la consommation des coquillages sont des activités apparues dès la Préhistoire. En Occident, la consommation des huîtres est rapportée chez les grecs. A Athènes, l'utilisation d'une coquille d'huître comme bulletin de vote, pour bannir les citoyens jugés indésirables, est à l'origine du terme d'ostracisme. Les romains ont organisé l'exploitation et le commerce des huîtres à travers l'Empire Romain et des amoncellements importants de coquilles ont été découverts dans des zones éloignées des zones côtières. Il s'agissait alors de l'huître autochtone *Ostrea edulis*, l'huître plate européenne.

En France, à partir du XVIIème siècle, les huîtres ont eu de plus en plus de succès. La culture des huîtres s'est développée sur la côte atlantique. Les animaux pêchés étaient placés dans les claires ou parc à verdir les huîtres, comme en témoigne les illustrations de l'Encyclopédie. Au XVIIIème siècle, ce formidable engouement aboutit à la surexploitation des bancs naturels. Le développement du transport ferroviaire, pouvant emmener les huîtres dans les villes et les touristes dans les stations balnéaires, a créé une demande grandissante que la simple cueillette ne pouvait satisfaire [76]. Ainsi, sous Napoléon III, la culture organisée s'est-elle développée en France avec l'extension du captage du naissain sur différents supports et la création des premiers parcs en 1866. Pour reconstituer les bancs naturels d'huîtres, le gouvernement encouragea l'importation d'huîtres d'autres pays. On cultivait alors l'huître plate et l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, introduite d'Asie quelques siècles auparavant et qui provenait de l'embouchure du Tage (Portugal). Cette nouvelle huître était cultivée à Arcachon puis arriva accidentellement dans l'estuaire de la Gironde, suite au rejet de sa cargaison d'huîtres par le bateau « Le Morlaisien ». L'espèce s'est implantée alors rapidement sur les côtes atlantiques.

Au début du vingtième siècle, l'huître plate fut touchée par de fortes mortalités, de plus en plus sévères. La situation devint véritablement critique dans les années 1920-21 où l'ampleur des mortalités ne permit plus une production suffisante. L'élevage de l'huître portugaise rendit possible la survie des exploitations ostréicoles. Cette huître fut à son tour frappée par des mortalités massives liées à la détection de virus de type iridovirus aboutissant à la quasi-

disparition de l'espèce le long du littoral atlantique au début des années 1970. Devant ce phénomène, les ostréiculteurs ont repeuplé les côtes avec une espèce exotique en provenance du Japon et du Canada, *Crassostrea gigas*, dite huître japonaise, huître creuse ou encore huître du Pacifique, au cours de l'opération RESUR. Cette huître s'est rapidement acclimatée sur les côtes françaises (comme c'est le cas dans de nombreuses régions tempérées du monde) et reste la creuse qui garnie nos assiettes. Depuis, des études génétiques ont montré que les deux huîtres sont proches, elles peuvent se croiser et leurs hybrides sont pleinement fertiles, mais qu'une différence génétique significative existe même si elle est faible.

L'histoire de l'ostréiculture française montre que les introductions d'espèces non autochtones, parfois considérées comme des espèces invasives, a été successivement utilisées par les hommes pour conserver la pérennité de cette activité aquacole et s'adapter aux crises successives.

I.2.1 Une organisation de la filière ostréicole complexe

I.2.1.1 La gouvernance administrative et réglementaire

Les Ministères en charge de l'Ecologie et de l'Agriculture exercent la gouvernance administrative et réglementaire relative à la conchyliculture. Historiquement, cette gouvernance était organisée en deux niveaux bien distincts selon que les huîtres sont au stade de l'élevage ou au stade de leur commercialisation. Cette dichotomie s'observait aussi bien au niveau national qu'au niveau local. La gestion zoosanitaire, au niveau de l'élevage conchylicole, a été transférée en 2008 à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du Ministère de l'Agriculture. La Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA), reste chargée de la partie élevage de l'huître dans ses composantes socio-économiques ; dépend actuellement du Ministère en charge de l'Agriculture.

Le DPMA exerce la tutelle de l'organisation interprofessionnelle des pêches maritimes et des élevages marins (comités national, régionaux et locaux des pêches maritimes et des élevages marins), de l'organisation interprofessionnelle de la conchyliculture (comité national et sections régionales de la conchyliculture), des organismes de coopération maritime et du crédit maritime mutuel.

Au niveau local, les missions des services déconcentrés sont partagées entre les directions départementales des territoires et de la mer (DDTM – ex-Affaires Maritimes) pour la partie

élevage dans ses composantes zoosanitaires et socio-économiques et les directions départementales en charges de la protection des populations (DDcsPP – ex-Services Vétérinaires) au stade de la purification et de la commercialisation. Toutefois des convergences s'opèrent au niveau local entre ces deux niveaux d'intervention.

I.2.1.2 Organisation de la recherche, de l'observation/surveillance et de l'expertise dans le domaine ostréicole

I.2.1.2.1 Surveillance du milieu et de la production ostréicole

La mise en œuvre de la surveillance du milieu et des animaux dans leur environnement est actuellement portée par l'Ifremer pour le compte des Ministères en charge de l'Ecologie et de l'Agriculture. Cette surveillance est opérée par différents réseaux qui ont en charge le suivi de la qualité des productions conchylicoles soit d'un point de vue sanitaire (santé humaine), soit d'un point de vue zoosanitaire (santé des mollusques).

I.2.1.2.1.1 Surveillance sanitaire

Trois réseaux ont un rôle de surveillance de la qualité sanitaire. Le REMI, réseau de contrôle microbiologique des zones de production conchylicoles a été mis en place par l'Ifremer en vue de préparer les propositions de classement des zones et d'effectuer la surveillance sanitaire des dites zones dans les conditions prévues par la réglementation. En 2016, la surveillance respective du phytoplancton et des phycotoxines est assurée en deux réseaux distincts pour séparer les deux composantes environnementale et sanitaire. Le phytoplancton est surveillé par le réseau REPHY, pour la composante environnementale et par le REPHYTOX, pour la composante sanitaire. Bien que distincts, les deux réseaux REPHY et REPHYTOX restent étroitement associés, puisque la surveillance du phytoplancton toxique, toujours assurée par le REPHY, est utilisée pour le déclenchement d'analyses de toxines dans le REPHYTOX, et pour une meilleure compréhension des épisodes de contamination des organismes marins. Le Réseau d'Observation des Contaminants Chimiques de la qualité du milieu marin (ROCCH) a pour objectif l'évaluation des niveaux et des tendances des contaminants chimiques et des paramètres généraux de la qualité du milieu, ainsi que la surveillance des effets biologiques des contaminants.

I.2.1.2.1.2 Surveillance zoosanitaire

Depuis 2015, les modalités de surveillance zoosanitaire mise en œuvre par l’Ifremer pour le compte du ministère chargé de l’agriculture ont évolué afin de détecter précocement les infections dues à des organismes émergents et les infections dues à des organismes pathogènes exotiques. Pour cela, deux types de surveillance sont mises en place : une surveillance planifiée des mortalités (avec pour l’huître creuse *Crassostrea gigas*, le réseau RESCO2 et pour la moule bleue *Mytilus edulis*, le réseau MYTILOBS2) et une surveillance événementielle des mortalités des autres espèces de mollusques avec le réseau REPAMO2.

Des animaux sentinelles sont déployés sur des sites ateliers pour la surveillance planifiée tandis que la surveillance événementielle repose sur la déclaration de mortalités des conchyliculteurs ou des pêcheurs professionnels.

Un réseau expérimental de surveillance vise la surveillance planifiée, ciblée et fondée sur le risque d’introduction et d’installation de *Mikrocytos mackini* chez l’huître creuse *C. gigas*. Il s’appuie sur une recherche régulière de cet organisme pathogène chez des individus sentinelles déployés sur le site atelier de Loix-en-Ré (17) site qui a la plus forte probabilité de voir introduit l’agent pathogène en raison de sa proximité avec des ports de commerces, au cours des mois de mars et d’avril.

Enfin, une étude originale est actuellement conduite dont l’objectif est de détecter et de localiser précocement des regroupements de mortalités de mollusques (clusters) signalés par les conchyliculteurs par SMS, en temps quasi-réel. Cette étude a été conduite en Normandie, sur la période de juin à décembre 2016. Les premiers résultats sont attendus afin d’étudier la possibilité d’étendre ce dispositif à d’autres bassins de production et à d’autres espèces de mollusques, dans le cadre de l’évolution de la surveillance de la santé des coquillages marins

L’Ifremer assure également une surveillance de la détection de naissains polyploïdes dans les zones de production d’huîtres creuses (réseau « Biovigilance »). En effet, dans le contexte du développement de la production de naissain d’écloserie de type triploïde à partir de géniteurs tétraploïdes, ce réseau a pour objectif fournir des informations sur la possible détection d’huîtres polyploïdes (triploïdes ou tétraploïdes) dans les deux principaux bassins de captage (Arcachon et Marennes-Oléron) où un recrutement naturel des naissains sauvages se produit.

Cette organisation est en pleine restructuration suite au souhait de l'Ifremer de ne plus s'impliquer directement dans les prélèvements de routine des différents réseaux de surveillance mais en assurerait l'assistance à maîtrise d'ouvrage à partir du 1^{er} janvier 2018. Des discussions sont en cours avec les ministères de tutelles pour organiser l'évolution de ces réseaux.

1.2.1.2.2 Organisation de la recherche française en matière conchylicole

1.2.1.2.2.1 L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer)

L'Ifremer est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC). Il est décentralisé au plan géographique : un siège à Issy-les-Moulineaux, quatre centres régionaux (Boulogne, Brest, Nantes et Toulon) et un réseau de d'implantations côtières ou stations. Dans le domaine conchylicole, les travaux de l'institut repose sur :

- des activités de surveillance réalisées par 8 laboratoires «Environnement Ressources»
- des activités de recherche développées au sein de 4 laboratoires « thématiques » en physiologie, génétique, pathologie et immunologie : Plouzané, Nantes, La Tremblade et Montpellier ;
- des activités de référence à La Tremblade dans le cadre réglementaire de la santé animale en conchyliculture : depuis 1995, Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) pour les maladies des mollusques bivalves, il est laboratoire de référence depuis 2006 pour l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE) pour deux maladies parasitaires (la bonamiose et la marteiliose)
- le Laboratoire National de Référence (LNR) à Nantes depuis 2009 dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire.
- des installations aquacoles : 4 stations expérimentales spécialisées en éclosion, nurserie et circuits recyclés: Argenton, Bouin et La Tremblade.
- L'Ifremer conduit des activités de recherche avec de nombreux partenaires,

L'Ifremer est conduit à exercer vis-à-vis de la filière conchylicole au moins trois métiers sensiblement distincts :

- la recherche d'amont, pouvant conduire à moyen terme à des innovations. L'Ifremer est parfois amené à poursuivre le développement, voire la diffusion de ces innovations (cas des huîtres tétraploïdes) ;
- l'expertise et l'appui aux politiques publiques, avec en particulier les missions de surveillance de la qualité de l'environnement, pouvant aboutir à la prise de mesures réglementaires (classement des zones conchylicoles, suspension de la commercialisation... etc.) par la puissance publique;
- l'appui technique aux professionnels, avec en particulier les suivis des croissances ou des captages et l'appui à la production d'huîtres triploïdes par les écloséries commerciales.

Au total, on peut estimer à environ 120 ETP (dont environ 60 cadres) le personnel permanent impliqué dans la recherche, l'expertise et le soutien à la filière conchylicole.

1.2.1.2.2.2 L'Agence Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)

L'Anses est issue, depuis janvier 2010, de la fusion de l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) et de l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail). Elle reprend toutes les missions de chacune de ces deux agences.

Dans le domaine de l'expertise, la DER (Direction de l'Évaluation des Risques) intervient dans l'évaluation des risques relatifs aux mortalités massives des huîtres (unité d'évaluation des risques liés à la santé et à l'alimentation animales – UERASA) et dans l'évaluation des risques pour la santé des consommateurs (Unité d'évaluation des risques physico-chimiques UERPC).

Dans le domaine de la recherche, l'Anses n'a pas de travaux ou d'équipes impliquées dans l'étude des mortalités des huîtres creuses. En revanche, l'Anses est très impliquée dans le problème des biotoxines marines.

I.2.1.2.2.3 Le centre nationale de la recherche scientifique (CNRS) et les établissements d'enseignement supérieur

De nombreuses Universités (Paris VI, Nantes, Brest, Caen, La Rochelle, Le Havre, Montpellier, Poitiers, Angers, Polynésie française, Orsay, Bordeaux) et Grandes Écoles (ENITIAA et ENV de Nantes, AgroCampus Ouest) interviennent de manière plus ou moins importante sur des problématiques liées à la conchyliculture. Les opérateurs les plus impliqués sont les universités de Caen (physiologie et écophysiologie des mollusques), de Montpellier (écologie lagunaire, immunologie des mollusques), de Brest (AMR AMURE) et de Bordeaux (Laboratoire d'Océanographie biologique d'Arcachon).

Le CNRS (en particulier la station biologique de Roscoff) a également été amené à développer des travaux, en particulier sur les mortalités d'huîtres.

I.2.1.3 Les organisations professionnelles

Les professionnels de l'ostréiculture sont regroupés en interprofession – le regroupement de plusieurs acteurs économiques engagés dans une filière de commercialisation commune. Cette interprofession est organisée au niveau national (le Comité National de la Conchyliculture) et au niveau régional (sept Comités Régionaux de la Conchyliculture). Les comités régionaux regroupent des syndicats locaux correspondant aux différents sites de productions, des coopératives, des organisations professionnelles.

Le Comité National de la Conchyliculture (CNC) assure la représentation de l'ensemble des éleveurs, transformateurs et distributeurs de coquillages et défend leurs intérêts généraux. Il est l'interlocuteur obligatoire des pouvoirs publics pour toute réglementation relative à la conchyliculture. Il est tenu informé des orientations de la politique communautaire en ce domaine. Il propose, participe ou mène des actions relatives à l'organisation de la filière (gestion du marché, information de l'inter profession, promotion des produits conchylicoles), à la réglementation (protection du littoral, défense de la qualité des eaux, normes sanitaires, réglementation sociale et fiscale des conchyliculteurs) et l'organisation de la recherche, de la formation et de l'enseignement. Il est placé sous la tutelle du Ministère en charge de l'Ecologie

Reconnu comme organisation interprofessionnelle agricole, le CNC peut passer des accords interprofessionnels entre tout ou partie des opérateurs de la filière. Le CNC s'appuie en

régions sur sept Comités Régionaux de la Conchyliculture (CRC) qui sont des structures de droit privé (au même titre que les Chambres d'Agriculture ou de Commerce). Les comités régionaux assurent la représentation des intérêts généraux des professionnels des métiers de la production conchylicole de leur circonscription territoriale.

L'interprofession conchylicole est parcourue par des courants et des approches qui peuvent être radicalement différentes. Ainsi, une partie de la profession est-elle favorable à une ostréiculture plus traditionnelle qui s'appuie sur le captage des jeunes huîtres dans le milieu naturel. L'indépendance économique vis-à-vis des écloseries est clairement revendiquée. Une autre partie de la profession est plus favorable au développement d'une ostréiculture qui se rapproche de l'élevage aquacole avec l'achat de naissains aux écloseries. Parmi les naissains achetés en écloserie, 90% sont des huîtres triploïdes dites « huîtres des quatre saisons ». Cette production est augmentée depuis une dizaine d'années. Il lui est régulièrement reproché de se développer sans information préalable du consommateur, peu au fait des évolutions de la filière ostréicole. Il lui est également reproché d'influencer négativement le patrimoine génétique de l'espèce, soit volontairement (triploïdie et/ou sélection génétique) ou involontairement (faible diversité génétique des lots issus d'écloserie).

I.2.1.4 Les assises de la conchyliculture en 2010

La conchyliculture fait face à de nombreux défis dans un contexte économique difficile : dépendance forte du secteur à la qualité de l'eau et de son environnement, compétition pour l'accès à l'espace sur le littoral, complexité de la recherche et de l'appui technique... De plus, l'ensemble de la filière ostréicole se trouve aujourd'hui confrontée aux phénomènes de mortalités massives de jeunes huîtres et d'animaux adultes qui affectent fortement les entreprises ostréicoles et les capacités de production.

Face à l'ensemble de ces défis, les premières Assises de la Conchyliculture ont eu lieu en 2010. L'objectif de ces Assises consistait à donner la parole à l'ensemble des interlocuteurs concernés en organisant des concertations locales sur les quatre grandes façades maritimes françaises.

Près de 800 personnes se sont ainsi réunies pour débattre de quatre thématiques :

- L'avenir de la filière conchylicole, en particulier dans le contexte des mortalités massives de jeunes huîtres ;

- L'organisation de la recherche et de l'appui technique dans la filière conchylicole ;
- Les enjeux environnementaux et sanitaires ;
- Le marché des produits conchylicoles et la communication.

Les débats engagés en région ont permis de faire émerger une cinquantaine de recommandations. Parmi ces recommandations, certaines concernent plus particulièrement les axes pour remédier aux difficultés liées, notamment en recherchant de nouvelles voies d'approvisionnement de jeunes huîtres. En particulier, la recommandation n°11 demandait d'engager rapidement, en concertation avec l'ensemble des partenaires (profession – producteurs et écloseurs ; scientifiques – Ifremer et autres ; État ; régions...) un programme de sélection génétique collectif en vue d'un repeuplement du milieu avec une souche « rustique » ; ce programme devant recevoir l'appui financier de l'État et des régions, aux côtés des professionnels

D'autres recommandations s'attachent à mieux définir l'organisation de la recherche dans le domaine conchylicole ainsi que l'appui technique de la filière : la recommandation n°17 vise à favoriser les interactions entre l'Ifremer et les autres acteurs de la recherche et confier à l'institut la coordination du dispositif de recherche dans le domaine conchylicole afin d'optimiser sur le plan national les compétences en synergie et complémentarité, en premier lieu sur le sujet des mortalités pour améliorer la connaissance du phénomène et trouver les sorties de crise.

L'organisation de la filière ostréicole française apparaît comme particulièrement complexe avec une gouvernance parfois peu cohérente des processus décisionnels mis en œuvre par l'Etat, par la recherche et par les professionnels. En conséquence, cette organisation rend difficile la gestion des maladies qui affecte actuellement les huîtres, gestion qui met en lumière les intérêts parfois contradictoires des différents intervenants de cette filière. La capacité de résilience des ostréiculteurs lui ont toutefois permis de se maintenir malgré les crises graves qui ont affecté cette profession et de s'adapter à un environnement fortement variable [76] .

Au-delà des considérations socio-économiques, l'huître du Pacifique est un modèle biologique pour l'étude des maladies qui affecte un mollusque bivalve marin et des interactions hôtes-pathogènes.

I.2.2 *Crassostrea gigas* : étude d'un modèle biologique

L'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, est un mollusque bivalve de l'ordre des Eulamellibranches, de la famille des Crassostréidés et du genre *Crassostrea*. L'espèce, originaire d'Asie, a été introduite dans de nombreuses régions dans le monde au cours du XXème siècle notamment aux Etats-Unis et au Canada dès 1902, en Australie en 1947, en Nouvelle Zélande en 1958, en France en 1966 et au Chili en 1982 [77, 78]. Sa large implantation a été rendue possible grâce à ses capacités adaptatives liées à sa forte croissance et sa tolérance aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de disponibilité en nourriture. Elle est actuellement l'espèce aquacole la plus cultivée en France, et possède plusieurs dénominations vernaculaires : huître creuse du Pacifique, huître creuse japonaise, huître du Pacifique, huître japonaise.

Systematique :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Mollusca
- Classe : Bivalvia
- Sous-classe : Pteriomorpha
- Ordre : Ostreoida
- Famille : Ostreidae
- Genre : Crassostrea

L'huître creuse colonise la zone intertidale sur le domaine d'oscillation des marées. On peut toutefois la cultiver à des niveaux plus profonds, jusqu'à 20 mètres de profondeur.

I.2.2.1 Anatomie et biologie élémentaire

I.2.2.1.1 Anatomie et biologie élémentaire

L'huître possède les caractéristiques anatomiques des bivalves : un corps mou protégé par une coquille possédant deux valves asymétriques, la valve gauche étant creuse et la valve droite présentant un profil plan. Les deux valves sont reliées par un ligament charnière et par un muscle adducteur postérieur.

Le manteau enveloppe le corps et délimite la cavité palléale. Il assure plusieurs fonctions importantes dont la sécrétion de la coquille, le stockage de réserves énergétiques ou la perception de stimuli externes ; il est colonisé par le tissu reproducteur en fin de gamétogénèse [79]. Les deux lobes du manteau se rejoignent dans la région antérieure du corps, au niveau de la bouche et des deux paires de palpes labiaux.

Les huîtres sont des lamellibranches filtreurs qui se nourrissent d'algues phytoplanctoniques et de bactéries présentes en suspension dans le milieu aquatique. L'action de la ciliature des branchies, du manteau et des palpes labiaux génèrent un courant d'eau continu au sein de la cavité palléale assure l'apport constant de l'oxygène dissout et permet également l'acheminement des particules alimentaires jusqu'au tractus digestif. Les particules inorganiques, de faible valeur nutritionnelle ou même toxiques sont triées et agrégées en pseudofèces, selon des mécanismes faisant intervenir le manteau, les branchies et la production de mucus [80], puis rejetées à l'extérieur de la cavité palléale.

Les particules restantes, sont finalement acheminées vers la bouche par les palpes labiaux qui parachèvent le tri des particules. La fonction digestive commence avec l'œsophage, cilié et court, se poursuit dans l'estomac qui contient un stylet cristallin assurant un broyage des aliments et une première digestion. Le broyat parvient ensuite au niveau de la glande digestive pour y subir une digestion intracellulaire. Après leur passage par l'intestin, les déchets, sous forme de fèces, sont éliminés par le rectum.

La fonction respiratoire est assurée par les branchies lamellaires disposées en quatre feuillets.

L'appareil circulatoire est dit semi-ouvert car il est partiellement clos et le liquide circulant, l'hémolymphe, communique avec le milieu de la cavité palléale. Il se compose de vaisseaux, de sinus cœlomiques et d'un cœur composé d'un ventricule et de deux oreillettes. L'hémolymphe circule dans les aortes, les artères, les artérioles jusqu'aux sinus dans lesquels baignent les organes. Le système nerveux est réduit à quelques ganglions nerveux.

1.2.2.1.2 Reproduction

L'huître est une espèce hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier [81]. En règle générale, espèce est majoritairement mâle pendant la première saison de reproduction puis une sexualité alternative entraîne un changement de sexe, en principe chaque année, en période hivernale avec une forte influence des paramètres environnementaux [82]. Le cycle de

reproduction comprend trois phases : une phase de repos sexuel en automne et en début hiver, une phase de gamétogénèse entre la fin de l'hiver et la fin du printemps puis une phase de ponte avec émission des gamètes au cours de l'été [83]. Pendant la phase de repos sexuel, le volume et l'activité de la gonade sont très réduits. Ces périodes sont variables en fonction des températures et de la disponibilité en nourriture [84]. A la fin de l'hiver les cellules germinales se développent activement et la gamétogénèse s'accélère. Après une première phase de stockage de glycogène, celui-ci est métabolisé en lipides au cours de la vitellogénèse dans le mois qui précède la ponte.

La reproduction est externe : les gamètes sont émis directement et simultanément dans le milieu extérieur, généralement en période estivale, en une ou plusieurs fois selon la localisation [85]. La fécondation est immédiate à la rencontre d'un spermatozoïde et d'un ovocyte et l'œuf se développe rapidement en stades morula, blastula et gastrula jusqu'à la formation d'une larve trochophore puis l'obtention d'une larve véligère pélagique qui est la forme libre pendant laquelle la dispersion de l'espèce est possible. Lorsque la larve atteint une taille comprise entre 300 et 380 μm , un pied se développe, indiquant la fin de la période pélagique. La larve pédivéligère se fixe à un substrat, subit la métamorphose aboutissant au naissain qui présente les caractéristiques des adultes. Concrètement, la phase larvaire dure de 15 jours, en situation optimale rencontrée en écloserie, à plusieurs mois dans le milieu naturel [86]. Le développement complet se fait ensuite de 5 à 24 mois jusqu'à la maturité sexuelle.

Le cycle de développement de *C. gigas* est classiquement découpé en quatre étapes : le développement embryonnaire, le développement larvaire, la croissance juvénile et le stade adulte.

Parmi les facteurs importants qui influent sur la survie des animaux aux différentes maladies, la gamétogénèse et la ponte apparaissent comme des périodes particulièrement critiques pour les invertébrés marins en général [87] et pour les huîtres en particulier [88]. Une quantité importante d'énergie est exigée pour le développement des gonades et nécessite de l'énergie exogène, provenant de la nourriture, et endogène à partir de tissus de l'organisme [89]. Cet effort de reproduction consomme la plupart du glycogène et après la ponte, peu de réserves métaboliques sont disponibles, en particulier pour fournir de l'énergie nécessaire à la fonction immunitaire [90]. L'état physiologique et l'activité immunitaire sont liées et la combinaison d'un faible indice de condition avec une teneur faible en glycogène est en corrélation avec la

diminution de l'activité antibactérienne [88]. De même, après la ponte, les huîtres sont potentiellement plus fragiles vis-à-vis des infections [91].

1.2.2.1.3 Cycle biologique de l'huître creuse

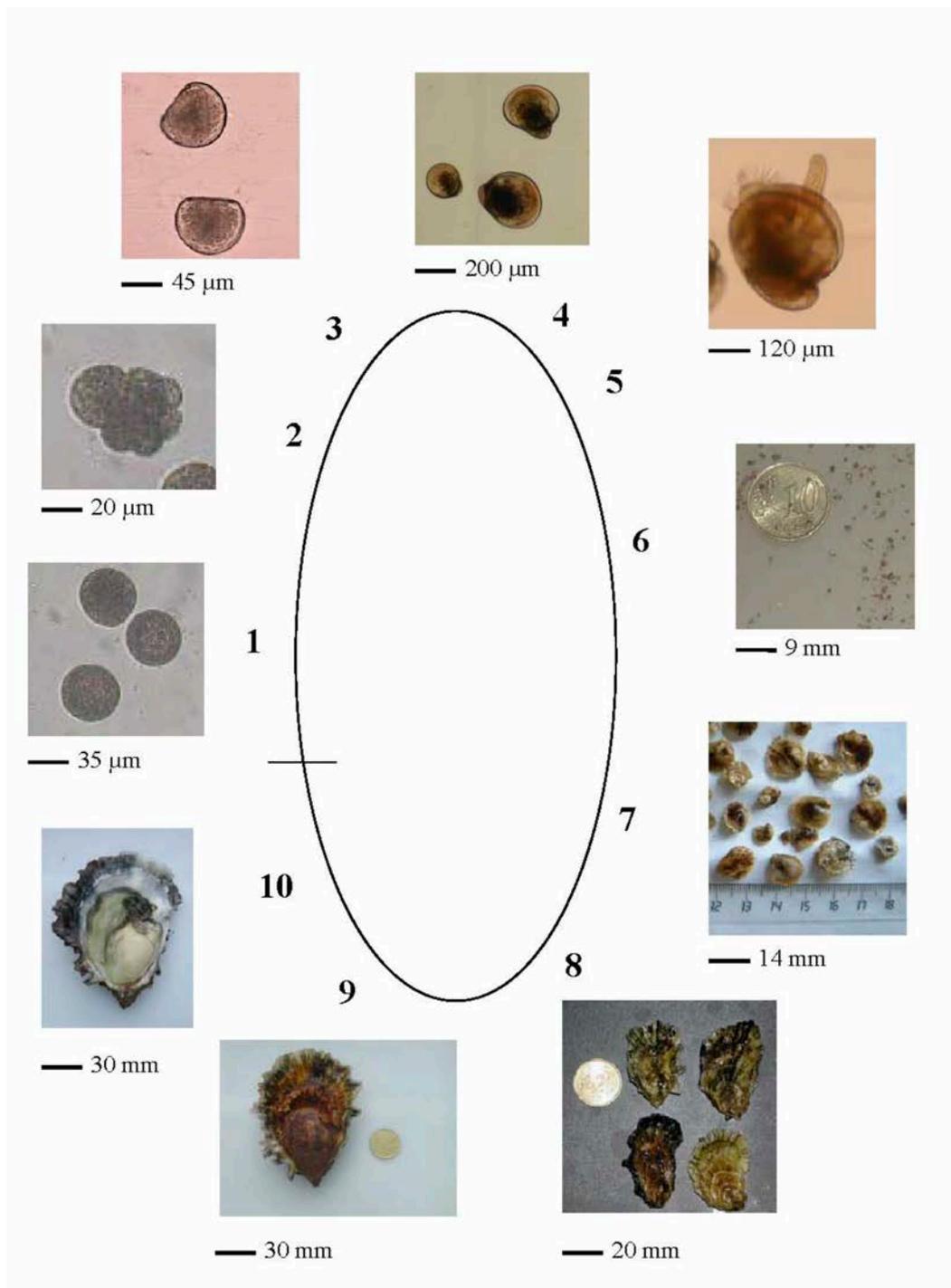


FIGURE 2: CYCLE BIOLOGIQUE DE L'HUITRE CREUSE *C. GIGAS*, D'APRES DEGREMONT (2003).

1- Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). 2- Embryon stade morula (2-3 heures). 3- Larves D (24 heures). 4- Larves véligères (14 jours). 5- Larve pédivéligère (18 jours). 6- Naissains post-fixation (1 mois). 7- Naissains (2 mois). 8- Juvéniles (6 mois). 9- Adulte (10 mois). 10- Géniteur mature (10 mois).

I.2.2.2 Les mécanismes de défenses de l'huître

L'huître est cultivée dans la zone côtière intertidale, écosystème soumis à de nombreuses variations biotiques et abiotiques. La température, la salinité, le pH, la disponibilité en nourriture varient fortement en fonction des marées et des saisons. De plus, le milieu marin est fortement impacté par les activités humaines, notamment par des pollutions terrestres qui se retrouvent en mer avec l'écoulement des rivières. On peut citer parmi ces pollutions les hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les produits phytosanitaires employés en agriculture, les médicaments, les nitrates et les phosphates. Enfin, les micro-organismes, potentiellement pathogènes, sont abondants dans ce milieu. Ainsi, les animaux marins sont-ils soumis en permanence à ces variations et développent des stratégies de défenses variées pour répondre à ces nombreuses agressions. L'huître en tant qu'animal filtreur est amenée à être intimement en contact avec ce milieu fortement variant. Elle a ainsi développé au cours de l'évolution des stratégies de défenses diversifiées et complexes.

I.2.2.2.1 Barrières mécaniques

La première barrière est physique avec la présence d'une coquille qui protège le corps mou de l'animal des blessures et des prédateurs, d'un manteau et de production de mucus au niveau des épithéliums (branchies, manteau, palpes labiaux, ...) qui permet de piéger et de rejeter des particules de grande taille. La microflore riche et diversifiée, présente dans les cavités corporelles et à la surface des tissus, constitue un endobiome protecteur. Enfin, des mécanismes complexes de reconnaissance et de défense immunitaire innée sont mis en œuvre pour maintenir l'homéostasie et pour contrôler les infections.

Elle est une protection mécanique efficace contre différentes agressions. Les tentacules disposés sur le manteau permettent de détecter des variations physiques ou chimiques. La coquille, une fois refermée permet à l'animal de résister aux prédateurs, à l'exondation, aux différences de températures, aux variations de salinité. L'animal peut maintenir sa coquille fermée pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines.

La formation de la coquille est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes [92]. Par ailleurs, la coquille est un témoin durable des différentes agressions subies par l'huître : agressions physiques, par des vers foreurs, agressions chimiques par des métaux lourds. Certaines maladies peuvent modifier la forme de la coquille et la fragiliser.

Des phénomènes de cloquage peuvent également intervenir dans la cavité palléale.

1.2.2.1.2 Mécanismes de défenses immunitaires

Comme tous les invertébrés, l'immunité des huîtres repose sur des mécanismes innés, non adaptatifs, à médiation cellulaire et à médiation humorale, agissant de manière indépendante ou conjuguée. Dans le système circulatoire semi-ouvert de l'huître l'hémolymphe circule depuis le cœur jusqu'aux organes périphériques et les cavités corporelles. L'hémolymphe, composée du plasma et des hémocytes, est le lieu majeur des différentes réactions de défense. D'une part l'hémolymphe est enrichie par une grande variété de molécules actives sur les microorganismes. D'autre part, les cellules immunocompétentes, les hémocytes, constituent les effecteurs essentiels du système immunitaire inné à médiation cellulaire.

1.2.2.1.2. Immunité à médiation cellulaire

Les hémocytes, présents dans le réseau hémolympatique et dans les lacunes des organes, infiltrent également les tissus. Outre les défenses immunitaires, les hémocytes sont également impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels la réparation cellulaire (par agrégation et adhésion) des tissus, la construction et le remodelage de la coquille, le transport des nutriments ou la résorption de la gonade.

Les hémocytes agissent par infiltration, phagocytose et encapsulation. Ces phénomènes sont les principaux constituants de l'immunité à médiation cellulaire.

L'infiltration est un mécanisme permettant de répondre à une lésion d'un tissu ou à une infection. Les hémocytes sont mobilisés et se concentrent sur le site de la lésion, forment un amas en s'agrégeant. Les tissus endommagés sont remplacés par les hémocytes, un dépôt de collagène se constitue puis les tissus nécrotiques sont éliminés par des hémocytes phagocytaires et l'architecture du tissu est restaurée.

La phagocytose permet d'éliminer des éléments de petite taille tels des bactéries ou des virus. Des mécanismes de reconnaissance de particules du non soi sont mis en œuvre faisant intervenir des protéines PRP (Pattern Recognition Protein) reconnaissant des motifs protéiques présents à la surface des microorganismes (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern). Les cibles de certaines protéines de surface peuvent également être des lipopolysaccharides, des sucres (lectines) ou des peptidoglycanes des bactéries Gram+.

L'encapsulation est un mécanisme permettant d'éliminer des éléments de grande taille tels les agents pathogènes métazoaires (trématodes, cestodes) qui ne peuvent pas être phagocytés. Les hémocytes forment une capsule cellulaire à la surface des éléments à combattre.

1.2.2.1.2. Immunité à médiation humorale

La réponse immunitaire à médiation humorale fait intervenir de très nombreux phénomènes en cascades qui activent ou produisent des molécules d'une grande variété. L'hémolymphe contient en grande quantité des métalloprotéines superoxydases, Cg-EcSOD, qui catalysent les superoxydes en oxygène et peroxyde d'oxygène et qui ont donc un rôle antioxydant important [93, 94].

Certaines de ces molécules ont un effet direct sur les éléments à combattre : molécules cytotoxiques de type transferrine et lactoferrine, antimicrobiennes de type défensines et antivirales [95, 96], enzymes hydrolytiques (lysozyme, β -glucuronidase, phosphatases, protéases, amylases, lipases)[97], des radicaux libres microbicides.

Ces phénomènes sont régulés en retour par des enzymes anti-oxydantes (superoxyde oxydase, catalase, glutathion peroxydase), des protéines de stress (heat shock proteins), des inhibiteurs de protéases.

Les phénomènes de priming ont été décrit chez les invertébrés et semble indiquer qu'une réponse spécifique puisse se mettre en place.

Ces phénomènes de défenses peuvent être affectés par de nombreux contaminants de l'environnement. Les modes d'action de ces molécules sont variés et peuvent se combiner. Elles peuvent avoir un effet sur l'activité hémocytaire [98], avoir des effets mutagènes, tératogènes, carcinogènes, être directement toxiques ou être toxiques par bioaccumulation, être des perturbateurs endocriniens.

On y retrouve des herbicides tels le diuron, les algicides présent dans les peintures anti-fouling, les pesticides organochlorés ou organophosphorés, les fongicides, les résidus de médicaments, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les PCB...

La grande diversité des capacités de défenses de l'huître creuse ont été étudiées en s'appuyant sur des travaux relatifs à la structure génomique de *C. gigas*.

1.2.2.3 La structure du génome de *Crassostrea gigas*

1.2.2.3.1 Outils biomoléculaires disponibles

Afin d'étudier le génome, des outils des techniques de génomique structurale et de génomique fonctionnelle ont été développés et améliorés. La génomique structurale est en charge de la connaissance de la structure et l'organisation du génome. La génomique fonctionnelle vise à explorer et à déterminer la fonction et l'expression des gènes en caractérisant le transcriptome et le protéome. Ces techniques permettent en outre la reconstitution d'arbres phylogénétiques, d'analyser l'histoire évolutive des espèces et de mieux comprendre les maladies liées aux gènes. Les techniques informatiques permettent d'analyser les génomes et de les annoter en identifiant les séquences informatives, identifiées par leur similitude avec des séquences déjà connues. Des marqueurs génétiques peuvent être identifiés, aisément détectables et permettant de baliser le génome et de constituer des cartes génétiques et dont il existe différents types. Une fois les gènes annotés, la fonction des séquences informatives identifiées, la fonction des gènes peut être recherchée. Les techniques de génotypage employées dans l'étude du génome de *C. gigas* sont le génotypage microsatellite, le génotypage SNP (single Nucleotide Polymorphisms) et le génotypage de séquences répétées (VNTR).

Crassostrea gigas possède 28 027 gènes et les séquences codant pour 21 085 protéines ont pu être mises en évidence répartis sur 10 paires de chromosome [92]. La complexité du système de défense de l'huître se reflète également dans la structure du génome.

Quelques 259 gènes sont impliqués dans la formation de la coquille, première ligne physique de défense.

Le système digestif de l'huître est également une ligne de défense particulièrement importante, notamment au travers de ses fonctions complexes de tri des particules alimentaires qui sont amenées vers la bouche et par la production de mucus. Cela se traduit par un grand nombre de gènes impliqués dans le système digestif. En effet, il a été montré que 5844 gènes sont exprimés.

Quelques 8654 gènes sont spécifiques aux huîtres parmi lesquelles on trouve des protéines de liaison, des protéines impliquées dans l'apoptose, présentant des activités cytokines ou des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire. Il y a une surreprésentation de certains gènes impliqués dans la défense de l'hôte. Ainsi, 88 gènes codent-ils pour des protéines de

chocs thermiques 70 (heat shock protéin 70, HSP70), protéines chaperonnes garanties de la conformation correcte des protéines et ainsi protège la cellule des stress externes. Cette famille de protéines est conservée dans le règne vivant, dont on trouve 17 représentantes chez l'homme. De plus, 48 gènes codent pour des inhibiteurs de l'apoptose (IAP). Sont également surreprésentées des protéines lectine-like (lectines de type C, protéines relatives au fibrinogène C1q) qui appartiennent aux protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée.

Le génome montre ainsi que de nombreux gènes sont impliqués dans le système de défense vis-à-vis d'un milieu changeant et pouvant contenir de nombreux agents biologiques potentiellement pathogènes et en contact permanent avec les animaux. La grande diversité des gènes impliqués dans la défense permet, lors de la reproduction sexuée d'obtenir de très nombreuses combinaisons de gènes ce qui augmente la probabilité d'avoir une combinaison « adaptée » à une modification du milieu.

Il est également possible de diriger l'obtention d'une combinaison favorable par des techniques d'amélioration génétique des huîtres parmi lesquelles la modification de la ploïdie et la sélection dirigée.

1.2.2.3.2 Modification de la ploïdie

La polyploïdisation, est la multiplication du nombre de chromosomes chez certaines plantes ou certains animaux aboutissant à l'acquisition de plus de deux lots complets de chromosomes ($>2n$). Il s'agit d'un phénomène naturel qui a joué un rôle important dans l'évolution, notamment des plantes, plus rarement dans le règne animal. C'est également une technique artificielle développée pour améliorer la production de différentes espèces animales ou végétales. La polyploïdie impacte le génotype et le phénotype à différents niveaux. Au niveau cellulaire, l'augmentation du matériel génétique induit un effet de gigantisme cellulaire, notamment lors de polyploïdisation artificielle.

La triploïdie est un cas particulier de polyploïdie : l'asymétrie génomique conduit généralement à une diminution de la fertilité, de sorte que la triploïdisation peut être utilisée pour cultiver des espèces non-natives dans un milieu ouvert tout en évitant leur dissémination [99], Il n'est toutefois pas exclu que la fertilité puisse être restaurée avec la production spontanée d'individus tétraploïdes.

Les bénéfices économiques induits par la polyploïdisation ont été utilisés dans une large gamme de plantes cultivées et d'espèces d'aquaculture élevées, notamment chez les mollusques [100, 101]. Chez *C. gigas*, l'amélioration génétique par la triploïdie est largement répandue. En France, les premiers programmes scientifiques concernant la production d'huîtres triploïdes par IFREMER et les premiers essais de production par les écloséries françaises datent de 1990. Ceci a permis un développement rapide de l'offre de naissain polyplœide par les écloséries.

Plusieurs méthodes sont possibles pour induire directement la production d'individus triploïdes, selon un mécanisme commun : au cours de la méiose, il est possible de bloquer l'expulsion du globule polaire, soit au cours de la première réduction chromosomique, soit au cours de la seconde. Afin d'inhiber l'expulsion du globule polaire, il est possible d'utiliser des substances chimiques telles que la cytochalasine B ou la 6-DMAP [102-104] ou des procédés mécaniques.

Il est également possible de produire des huîtres triploïdes à partir du croisement d'une huître tétraploïde avec une huître diploïde [105]. La production d'animaux tétraploïdes a permis un développement considérable de la production chez plusieurs espèces d'huîtres (*C. gigas*, *C. virginica* notamment) avec la diffusion à grande échelle de naissain triploïde.

Les huîtres triploïdes ont une croissance plus rapide que les huîtres diploïdes [106]. Elles produisent beaucoup moins de gamètes et le développement de la gonade est limité en comparaison avec le développement gonadique des animaux diploïdes [104, 107]. De par ce développement gonadique limité, les huîtres triploïdes possèdent des caractéristiques marchandes intéressantes : elles peuvent être consommées pendant la période de maturité des huîtres diploïdes, les huîtres dites laiteuses étant moins appréciées des consommateurs. Ainsi dispose-t-on en France d'huîtres dites « des quatre saisons » qui peuvent être consommées en été pendant la période touristique.

Le développement limité de la gamétogénèse des huîtres triploïdes leur permet également d'être un modèle d'étude intéressant pour des investigations écophysiologiques [108, 109] ou immunologiques [110].

I.2.3 Les maladies présentes en France chez *Crassostrea gigas*

La conchyliculture est fréquemment affectée par des mortalités. Ces épisodes sont habituellement liés à des maladies causées par des virus, des bactéries, des parasites. Des facteurs environnementaux défavorables et des pratiques culturales peuvent exacerber les conséquences de ces maladies. Les mortalités observées chez les coquillages ont des conséquences économiques et sociales qui peuvent être graves et des effondrements brutaux de la production conchylicole ont été observés au cours du siècle dernier [77].

Le changement global est également un élément qui prend une importance grandissante et qui apparaît comme une combinaison de facteurs pouvant mettre en danger la production de coquillages à travers le monde. La pollution des eaux marines, particulièrement sur les côtes, les baies et dans les estuaires, sont des facteurs fragilisant fortement les animaux et peuvent favoriser l'apparition de mortalités [111, 112].

I.2.3.1 Bactéries pathogènes

Les bactéries jouent un rôle important dans le milieu marin. Elles entrent dans le cycle des nutriments et peuvent servir directement de nourriture. Les bactéries marines jouent également un rôle important en relation avec les autres organismes marins soit au travers de relations symbiotiques, soit au travers des relations des agents pathogènes avec leurs hôtes.

Les bactéries pathogènes pour les mollusques sont impliquées dans des maladies observées à tous les stades de développement, et peuvent avoir un fort impact sur la production et provoquer de lourdes pertes économiques.

Les principaux genres impliqués dans l'apparition de maladies chez les bivalves marins comprennent notamment les genres *Roseovarius*, *Nocardia*, *Rickettsia* et *Vibrio*. Dans cette étude, nous nous limiterons à la description du genre *Vibrio* et plus particulièrement de l'espèce *V. aestuarianus*, dont une des souches a été utilisée lors des infections expérimentales réalisées au cours de cette étude.

I.2.3.1.1 Genre *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries en forme de bâtonnets, très abondantes dans les eaux marines et qui présentent des formes de vie libres, symbiotiques et parasitaires. De nombreuses espèces sont pathogènes pour les vertébrés et les invertébrés marins et terrestres

[113, 114]. Le genre *Vibrio* comprend par ailleurs des bactéries pathogènes pour l'Homme, notamment l'espèce *V. cholerae* agent causal du choléra et responsable de graves épidémies, l'espèce *V. vulnificus*, responsable d'infections opportunistes et de l'espèce *V. parahaemolyticus*, responsable de manifestations de type diarrhéiques, fréquemment associées à la consommation de produits de la mer. Un total de 118 espèces sont reconnues pour le genre *Vibrio* même si l'identification et la classification sont en constante évolution [115, 116].

Chez les mollusques bivalves, les bactéries du genre *Vibrio* sont les bactéries les plus fréquemment impliquées lors d'épisodes de mortalités associés à des infections bactériennes. Les principales bactéries de ce genre, en éclosion ou sur le terrain, appartiennent aux clades *Splendidus*, *Harveyi* ou aux espèces *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. coralliilyticus* et *V. tapetis*. Les bactéries du clade *Splendidus* sont très diversifiées, ce qui pose des difficultés dans le classement de ces organismes. De façon constante, les bactéries appartenant au clade *Splendidus* ont été décrites en relation avec des épisodes de mortalité de bivalves marins [117, 118]. Dans une étude récente, Lemire et al. (2015) ont montré que les vibrions forment des populations diversifiées et liées écologiquement pouvant conduire à des mortalités de bivalves [119].

De nombreuses études partent du postulat que les maladies bactériennes sont causées par une bactérie unique lorsqu'elle est détectée en grande quantité dans les animaux moribonds analysés. Toutefois, on sait maintenant que les bactéries peuvent coopérer entre elles et provoquer des maladies polymicrobiennes. On retrouve ce schéma pour les bactéries le clade *Splendidus* [13, 119] où des bactéries non pathogènes peuvent s'associer à des bactéries virulentes et aggrave la maladie causée par la seule bactérie pathogène. L'association de bactéries dans l'induction de maladies peut également se faire avec des bactéries de clades différents, par exemple avec des bactéries du clade *Splendidus* et de l'espèce *V. aestuarianus* peuvent être associées dans des phénomènes de quorum-sensing [120]. Le quorum-sensing repose sur la production, la diffusion et la détection de molécules auto-inductrices. Par ce mécanisme les bactéries régulent l'expression de certains gènes en réponse à des changements dans leur densité cellulaire ce qui permet à des organismes unicellulaires d'adopter un comportement coordonné au niveau de la population et de mettre en place de façon concertée la sécrétion de facteurs de virulence, la formation de biofilms ou la conjugaison.

La Figure 3 résume les facteurs de virulence qui peuvent être mis en jeu par des bactéries du genre *Vibrio*.

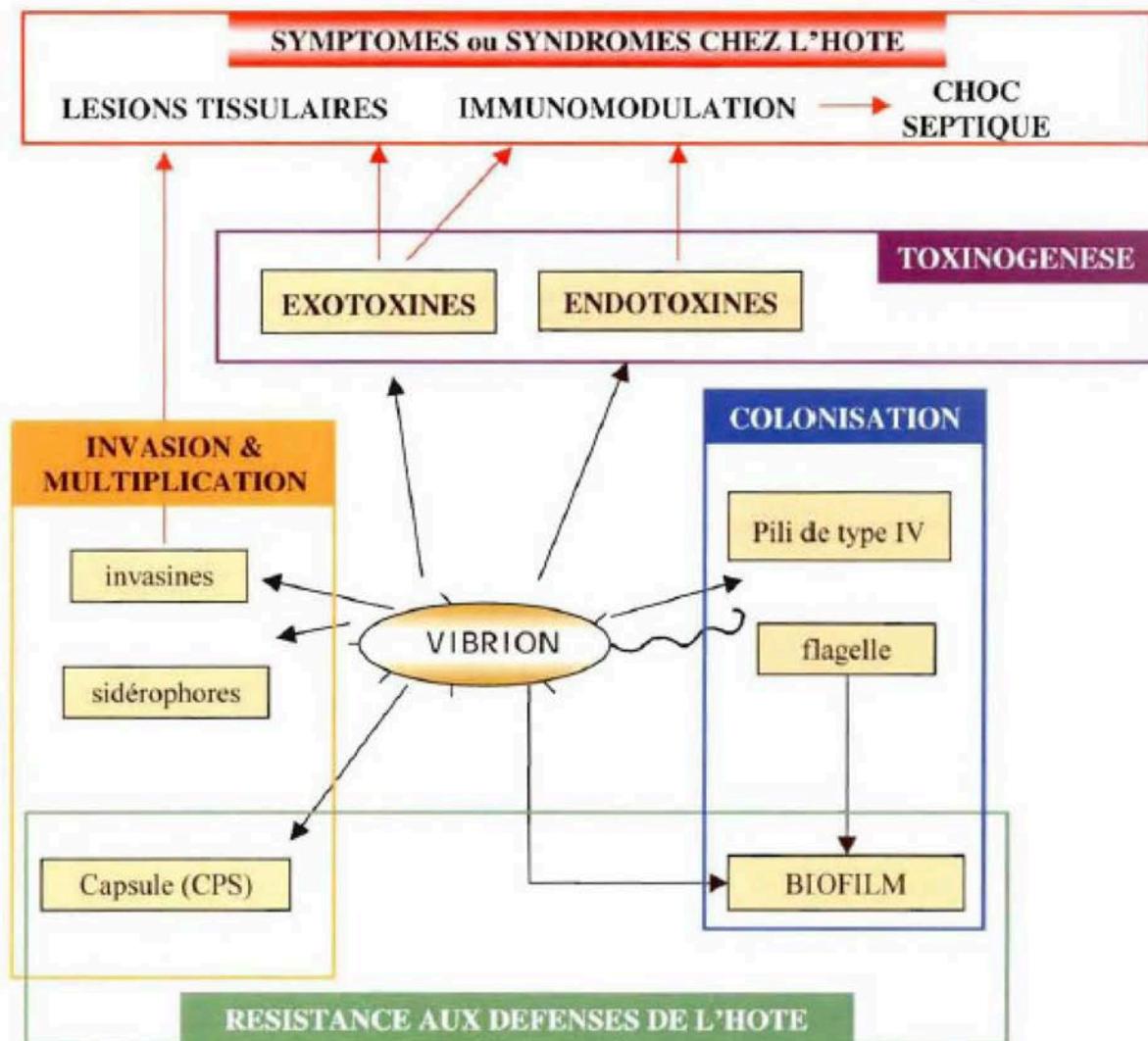


Figure 12 : Schéma synthétique présentant les différents facteurs de virulence pouvant être mis en jeu par les vibrions au cours de l'infection. Le vibron possède différentes structures qui peuvent intervenir au cours du processus de **colonisation** de l'hôte (boîte bleue). Après le franchissement des barrières naturelles de l'hôte, le vibron peut synthétiser différents composés biochimiques (polysaccharides, enzymes, sidérophores) impliqués dans le processus d'**invasion** et de **multiplication** (boîte orange) et/ou lui permettant de **résister** aux mécanismes de défense de l'hôte (boîte verte). Le vibron peut également produire des **toxines** (boîte mauve), responsables de symptômes ou de certains syndromes associés à l'infection (boîte rouge).

FIGURE 3 : FACTEURS DE VIRULENCE MIS EN JEU PAR LES BACTERIES DU GENRE *VIBRIO*

Au cours de ce travail de thèse, il a été décidé d'étudier la bactérie de l'espèce *V. aestuarianus*, notamment la souche 02/041 qui avait été précédemment étudiée et connue pour être hautement pathogène. Le choix de cette espèce est lié à sa détection de plus en plus

importante depuis l'été 2012 [14-16] lors d'épisodes de mortalité ayant fait l'objet d'analyses microbiologiques dans le cadre du réseau REPAMO.

Vibrio aestuarianus

1.2.3.1.2.1 Distribution et diversité

Vibrio aestuarianus a été isolé pour la première fois en 1983 aux Etats-Unis dans de l'eau de mer, dans diverses espèces marines en absence de mortalité (huîtres, crabes, palourdes) et dans le sédiment [121]. En laboratoire, son temps de génération est de 60 min à 20°C avec comme conditions optimales pour la croissance bactérienne une température comprise entre 20 et 25°C et une salinité d'environ 20‰ [122]. En absence de nutriments, la persistance de *V. aestuarianus* dans l'eau de mer est de quelques jours, quelles que soient les conditions de température et de salinité. La bactérie est potentiellement peu résistante dans le milieu marin, en accord avec les études en écologie qui n'ont détecté la bactérie que sporadiquement dans l'eau de mer [123].

Certaines souches sont virulentes pour *C. gigas* et en France, *V. aestuarianus* a été détecté dès 2001 le long des côtes atlantiques sur des animaux et dans leur environnement lors d'épisodes de mortalités. *V. aestuarianus* peut infecter *C. gigas* à tous les âges et la bactérie a été détectée à tous les stades de développement [124, 125]. Toutefois, les juvéniles et les adultes semblent plus sensibles à l'infection bactérienne que le naissain avec des taux de mortalité deux fois moindre observées en conditions expérimentales [126].

Quelques souches bactériennes ont également été détectées dans l'environnement, en dehors de mortalités, dans différentes régions côtières en mer Baltique [127], en Espagne [128] et en Asie [129]. Des souches non virulentes ont également été détectées lors d'épisodes de mortalité pour lesquels le virus OsHV-1 semblait être la principale cause de mortalité et avait été décelé en grande quantité [130].

Deux sous-espèces différentes ont été définies : *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* pour les souches américaines et *V. aestuarianus* subsp. *francensis* pour les souches françaises [131]. Les souches de *V. aestuarianus* peuvent également être différenciées selon deux « lineages » distinctes avec une faible diversité intra et inter-clade qui regroupe la majorité des souches pathogènes lorsque *V. aestuarianus* est isolé lors d'épisode de mortalité. Peu de souches de *V. aestuarianus* ont été détectés dans l'environnement, présentant cependant une plus grande

variabilité [130, 131]. Les différentes souches présentent cependant une diversité phénotypique en termes de virulence. Ainsi, est-il possible de différencier en conditions expérimentales à des doses infectieuses équivalentes des souches très virulentes (>50% de mortalité avec 10^7 CFU/animal), des souches peu virulentes (<15% de mortalité ou <50% de mortalité à 10^2 CFU/animal) et des souches intermédiaires, uniquement pathogènes à partir de 10^7 CFU/animal.

En France, depuis 2012, la bactérie est détectée plus fréquemment dans des animaux prélevés lors d'épisodes de mortalité [16, 132]. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer la recrudescence des mortalités d'adultes liées à la détection de *V. aestuarianus*, l'émergence d'une nouvelle souche plus virulente a pu être avancée, avec des modifications génomiques. L'exploration de cette hypothèse par l'étude de Goudenège et al. [130] associant des analyses génomiques à des expériences d'induction de l'infection en conditions expérimentales sur une large collection de souches, a montré que les souches isolées récemment ne présentaient pas de différence de virulence par rapport aux souches isolées antérieurement. Une hypothèse alternative serait que les huîtres présenteraient des altérations physiologiques, aboutissant à une plus grande sensibilité des animaux à l'infection par *V. aestuarianus*, lesquelles pourraient résulter de facteurs environnementaux (sensibilité acquise), de trade-off génétiques (sensibilité intrinsèque) ou d'une combinaison de ces deux hypothèses [133].

I.2.3.1.2.2 Facteurs de virulence :

Peu de données sont disponibles chez *C. gigas* décrivant le pouvoir infectieux ou les lésions histo-pathologiques lors d'une infection par *V. aestuarianus*. Le principal symptôme observé lors d'infection naturelle ou expérimentale est la faiblesse du muscle adducteur, les valves se ferment de plus en plus difficilement et on considère habituellement une huître incapable de se refermer comme morte. La coquille ne présente pas d'anomalie. L'examen histologique montre que tous les tissus apparaissent plus ou moins dégradés avec des nécroses plus marquées du muscle adducteur et des tissus environnants. La partie translucide du muscle est plus altérée que la partie blanchâtre. Les fibres musculaires apparaissent désorganisées et nécrosées de manière dispersées, sans infiltration hémocytaire notable et de larges brèches claires sont observées dans des foyers de condensation des fibres musculaires (figure 4). Il est également noté chez certains individus une atrophie sévère des diverticules digestifs [124].

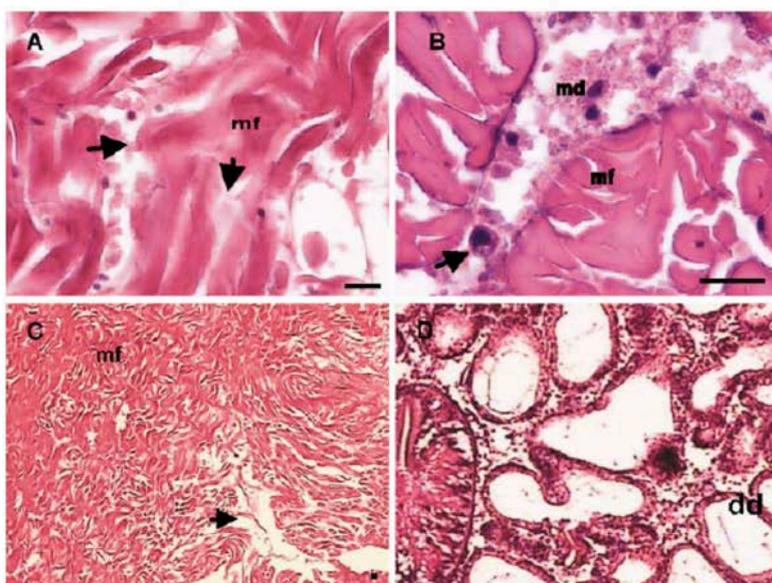


Figure 6. (A–C) Necrosis of muscular fibers of the adductor muscle of *C. gigas*. Hematoxylin–eosin stained histological sections of muscular tissue (scale bar = 10 μ m). (A) Necrosis of muscular fibers mf (arrow). (B) Image of phagocytosis (arrow) of the muscular debris (md) between in the nucleus of an ovocyte (ov). (C) Condensation of muscular fibres (mf) and clear gap (arrow). (D) Epithelium atrophy of digestive diverticula of *C. gigas*. Hematoxylin–eosin stained histological sections of digestive gland (scale bar = 10 μ m). Cell atrophy (arrow) of the digestive diverticula (dd).

FIGURE 4 : LESIONS OBSERVEES LORS D'UNE INFECTION PAR *VIBRIO AESTUARIANUS*

Plusieurs facteurs de virulence présumés ont été identifiés chez *V. aestuarianus*. Les produits extracellulaires (ECP) sécrétés par la souche de *V. aestuarianus* 01/032 modifient les compétences immunitaires des huîtres en diminuant, *in vitro*, les capacités d'adhésion et de phagocytose des hémocytes et en modifiant le métabolisme oxydatif [134]. *In vivo*, les réactions de défense de l'hôte se sont révélées insuffisantes lors d'infections expérimentales avec cette même souche [135]. Un des composants de ces ECP a été identifié comme étant une métalloprotéase zinc-dépendante désignée Vam (pour *V. aestuarianus* métalloprotéase) laquelle diminue les activités hémocytaires de l'hôte [136]. Les ECP sont fréquemment décrits chez les espèces de *Vibrio* et jouent probablement un rôle important dans le pouvoir infectieux. Le lien entre la capacité à produire des métalloprotéases et la virulence des souches de *Vibrio* a été rapporté [125]. L'expression de Vam est régulée par des mécanismes de quorum sensing dépendant du stade de développement des animaux [137]. Par ailleurs, le gène *VarS* codant pour une histidine kinase régule également la sécrétion et/ou la production et/ou l'activité de cette métalloprotéase Vam et l'interruption de son expression est suffisante pour diminuer la pathogénicité de *V. aestuarianus* [130].

I.2.3.1.2.3 Influence des facteurs environnementaux sur l'infection bactérienne:

Lorsqu'elle joue un rôle dans le pouvoir infectieux, la température est un facteur qui reflète habituellement les interactions hôte-agent pathogène. Les animaux sont plus souvent affectés par *V. aestuarianus* lors des épisodes de mortalités survenant en été, soulignant le lien entre la température et l'occurrence de la mortalité. En conditions expérimentales, les mortalités peuvent être induites entre 10°C et 32°C. A 32°C, les mortalités débutent en 24 heures tandis qu'à 10°C, 25 jours sont nécessaires pour observer les premières mortalités. Sur le terrain, une température comprise entre 19 et 23°C apparaît favorable au développement de l'infection. Des mortalités sont cependant observées à plus basse température [126].

I.2.3.1.2.4 Infection bactérienne et facteurs physiologiques :

Le lien entre le statut physiologique et l'activité immunitaire a été établi chez *C. gigas* [138]. La période de gamétogénèse et de ponte est une période de fragilité pour les huîtres [88], l'énergie allouée au développement gonadique consommant la plupart des réserves en glycogène lesquelles ne sont pas disponibles pour soutenir la fonction immunitaire [90, 139].

Le lien entre le statut reproducteur et la survie à des infections expérimentales par injection d'une solution infectante contenant des souches de *V. tasmaniensis* et *V. aestuarianus* a été proposé pour expliquer des mortalités importantes survenues en période de reproduction [140]. Les hémocytes présentent une moindre capacité d'adhésion et une activité phagocytaire diminuée qui sont des composantes essentielles pour la défense de l'huître en permettant d'éliminer les bactéries pathogènes. Or ces capacités sont ciblées et diminuées par la métalloprotéase Vam sécrétée par *V. aestuarianus* [135, 136].

I.2.3.2 Virus pathogènes affectant *Crassostrea gigas*

I.2.3.2.1 Infections à OsHV-1 et épisodes de mortalités massives affectant C. gigas

Depuis les années 90, des mortalités récurrentes de *C. gigas* ont été associées avec la détection d'un herpes-virus, dénommé OsHV-1 pour ostreid herpesvirus 1 [141, 142]. Le virus OsHV-1 a été classé dans la famille des malacoherpesviridae dans l'ordre des herpesvirales. Avec le développement des outils biomoléculaires, différents « variants » ont été décrit par rapport au virus de référence mais faisant partie de la même espèce [11, 143].

En dehors de l'Europe, OsHV-1 a été décrit aux USA lors d'épisodes de mortalité survenus dans la Baie de Tomales, en Californie [63, 144, 145]. Des épisodes de mortalités de *C. gigas*, ont également été associés à la présence d'OsHV-1, en Australie, dans la Baie de Woolooware [146] ainsi qu'en Nouvelle-Zélande [147]. OsHV-1 a également été détecté au Japon, en dehors de mortalités associées, et les analyses des séquences retrouvées ont montré une grande diversité des virus.

Les herpes OsHV-1 infectent naturellement de nombreuses espèces de bivalves dont des espèces d'huîtres appartenant au Genre *Crassostrea*, des palourdes (*V. philippinarum* et *V. decussatus*), la coquille Saint-Jacques (*P. maximus*) [148, 149]. En Chine, le virus AVNV (Accute viral necrosis virus), associé à une maladie sévère chez la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri*, s'avère, après le séquençage de son génome, être un variant d'OsHV-1. La transmission interspécifique du virus peut s'opérer dès le stade larvaire à travers le monde entier, notamment différentes espèces d'huîtres [150]. Les infections à herpes-virus ont été associées à de nombreux épisodes de mortalités massives touchant les larves élevées en écloserie et le naissain.

Depuis 2008, le variant μ var, récemment décrit est associé à des épisodes sévères de mortalité qui affecte plus particulièrement le naissain. Dès 2008, le variant μ var a été détecté dans l'ensemble des bassins ostréicoles français, la forme de référence n'étant retrouvée lors d'épisodes de mortalité que de manière très minoritaire à partir de 2009 [11]. Une forme proche de ce variant a toutefois été observée en France en 2004 [151]. Le pouvoir infectieux de ce variant a été montré au travers d'infections réalisées par injection d'animaux avec des homogénats de naissain infecté [68, 152]. Depuis, ce variant a été retrouvé dans d'autres bassins ostréicoles européens, en Irlande, en Grande Bretagne, en Espagne et en Italie avec dans certains cas la mise en évidence d'un lien épidémiologique avec des transferts d'animaux en provenance de France.

1.2.3.2.2 Transmission de la maladie :

Chez *C. gigas*, la transmission du virus s'avère être horizontale à l'intérieur et entre les différents groupes d'âge. La quantité d'ADN viral détectée dans les animaux moribonds est fortement corrélée aux mortalités observées [153]. La transmission verticale, par l'intermédiaire des gamètes, n'a pas été totalement démontrée mais reste cependant possible

[154]. Les transferts de mollusques marins destinés à l'aquaculture sont considérés comme la raison principale de l'expansion géographique des herpes virus à travers le monde [155].

Les mortalités observées en Australie ont fait l'objet de recherches épidémiologiques sur le terrain permettant d'approcher les distributions spatio-temporelles de la maladie chez le naissain et les adultes [153, 156]. La mortalité des adultes peut être réduite de moitié lorsque les animaux sont placés sur des structures hautes par rapport à la marée alors que cet effet protecteur n'est pas observé chez les animaux plus jeunes [157].

Chez *C. gigas*, lors des épisodes de mortalités, les adultes présentent des mortalités moindres par rapport aux autres groupes d'âges. Cependant de l'ADN viral a été détecté sur des animaux adultes, apparemment sains [158]. Ces observations suggèrent que les adultes pourraient être une source d'infection pour les groupes d'âges les plus sensibles, lorsque des facteurs favorisant le développement de l'infection sont présents. Ces porteurs sains sont donc susceptibles de permettre à l'infection de persister et peuvent transmettre la maladie à l'occasion de conditions adéquates.

1.2.3.2.3 Influence des facteurs environnementaux dans l'infection virale

1.2.3.2.3.1 Influence de la température

Plusieurs expérimentations menées sur le terrain ont montré le rôle de la température dans le déclenchement des mortalités. On peut ainsi observer que les d'épisodes de mortalité associés à OsHV-1 débutent suivant un gradient du Sud vers le Nord, correspondant au gradient de température observé le long des côtes françaises avec l'arrivée de l'été [159]. De plus, les études ont également suggéré que l'augmentation brutale de la température est un facteur favorisant le commencement de la maladie [160]. L'effet de la température a également été observé aux Etats-Unis [63, 145] ou dans l'Etang de Thau en France [161].

Le rôle de la température dans la survenue des infections associées à OsHV-1 a également été exploré à travers d'infections expérimentales en laboratoire permettant de déterminer l'influence de ce facteur dans l'apparition de la maladie [162]. Si la notion d'un seuil de température situé à environ 16°C apparaît comme importante dans le développement de l'infection, elle reste cependant difficile à définir précisément d'autant que le virus semble pouvoir se répliquer et être transmis à des températures inférieures au seuil de 16°C [160]

I.2.3.2.3.2 Autres facteurs environnementaux

D'autres facteurs environnementaux sont décrits comme pouvant influencer l'apparition et la diffusion de l'infection par OsHV-1, notamment un ensemble de facteurs pouvant constituer des facteurs de stress importants pour l'huître. Le stress est considéré comme un facteur majeur dans la survenue d'épisode de mortalité chez les invertébrés marins. Ainsi, le transport, la manutention, la densité des animaux d'élevage sont-ils décrits comme pouvant influencer l'apparition de l'infection [63, 144, 154, 159, 163]. Par ailleurs des facteurs abiotiques de l'environnement, ou leur variation, notamment la salinité [164] mais surtout les pollutions peuvent constituer des facteurs favorisant la maladie [98, 112, 165]. Les nombreux polluants présents dans le milieu marin peuvent avoir des effets drastiques sur la physiologie, l'immunologie et l'écologie des populations de mollusques marins [166]

I.2.3.2.4 Facteurs de l'hôte

I.2.3.2.4.1 Facteurs génétiques

De nombreuses études démontrent l'hypothèse selon laquelle la résistance de *C. gigas* à l'infection par OsHV-1 possède une composante génétique importante [62, 66, 167, 168]. Plusieurs programmes de sélection ont utilisé cette variance génétique pour améliorer la résistance de familles d'huître du Pacifique aux infections par OsHV-1 [7, 54].

I.2.3.2.4.2 Réponse immunitaire antivirale

La réponse immunitaire des bivalves marins, comme les autres invertébrés, est de type innée, et leur succès dans la conquête de nombreuses niches écologiques montre que cette réponse est efficace dans un milieu riche en virus, agents pathogènes qui évoluent et s'adaptent rapidement [169]. Les études sur la réponse antivirale chez *C. gigas* reposent principalement sur l'identification de composants antiviraux par la mesure de l'activité enzymatique ou par la caractérisation de la réponse transcriptomique lors d'infection par OsHV-1 [170]. Les différentes études montrent que la réponse antivirale des mollusques est complexe et fait intervenir plusieurs voies [171]. Ainsi, la réponse antivirale montre des similitudes avec la voie interféron des vertébrés, elle fait également intervenir des processus d'interférence ARN (RNAi) qui peuvent induire des réponses de la voie interféron et peuvent réguler l'expression de gènes impliqués dans des processus post-transcriptionnels [172]. Des processus de mort cellulaire programmée, tels l'autophagie et l'apoptose, sont également mis en jeu et

apparaissent comme des mécanismes importants dans la réponse immunitaire [173]. Les peptides antimicrobiens produits par les bivalves marins ont une activité antibactérienne ou antifongique [174]. Certains peptides antimicrobiens présents dans l'hémolymphe pourraient avoir une activité antivirale [175, 176].

1.2.3.2.5 Co-détection de OsHV-1 et de *Vibrio*

La co-détection d'OsHV-1 et de différentes espèces de *Vibrio* dont des bactéries du clade *Splendidus* et de l'espèce *V. aestuarianus* a été observé lors de différents épisodes de mortalités en Europe [125, 177]. De nombreuses souches de *V. harveyi* ont également été détectées lors d'épisodes de mortalités survenus en 2007. Cette association d'agents pathogènes a également été décrite en Nouvelle Zélande avec des bactéries des espèces *V. aestuarianus*, *V. splendidus* et *V. alginolyticus* [147]. Ces bactéries avaient par ailleurs été déjà détectées lors d'épisodes de mortalité précédemment analysés [178]. De fait, lors des analyses réalisées dans le cadre du réseau REPAMO, l'association d'OsHV-1 avec des espèces de *Vibrio* est fréquemment détectée et a été décrite comme une des causes des taux de mortalité important observés à partir de 2008 en France [179]. Depuis 2012, la principale espèce pathogène retrouvée dans les analyses est *V. aestuarianus* [14-16]. Enfin, une étude a montré que les mortalités sont plus importantes en présence de *Vibrio* lors d'infections expérimentales à OsHV-1 [180]. Ces résultats suggèrent que des interactions complexes existent entre différents pathogènes lors d'épisodes de mortalité dans lesquels est impliqué OsHV-1 [181] mais également que les animaux peuvent développer différentes infections de manière concomitantes.

Ainsi, l'herpès virus OsHV-1 provoque-t-il une maladie pouvant affecter les populations de *C. gigas* cultivée à travers le monde. Les pertes peuvent être importantes, notamment lorsque le naissain est atteint. La sensibilité à l'infection virale est dépendante de facteurs génétiques déterminants et de facteurs physiologiques, en relation avec le statut reproducteur. Les facteurs environnementaux jouent également un rôle important, notamment la température et les différents stress subits par l'hôte. Enfin, la présence d'autres micro-organismes dans le milieu marin peut aggraver l'expression de la maladie. La transmission est essentiellement horizontale entre animaux malades et les animaux moins sensibles tels les adultes ou des animaux d'autres espèces peuvent jouer le rôle de réservoir. Cependant, la diffusion du virus à travers le monde est largement dépendante des mouvements d'animaux à des fins aquacoles et

rend difficile le contrôle de cette maladie en l'absence de contrôle des mouvements d'animaux.

I.3 Conclusion : la lutte contre les maladies des bivalves

La gestion des maladies des mollusques marins est limitée et l'application des approches utilisées en agriculture et des méthodes élaborées pour d'autres espèces d'élevage (par exemple les bovins ou les poissons) pour réduire l'impact des maladies sont difficilement applicables et ne peuvent pas être directement utilisées pour les bivalves. Cela implique que peu de moyens sont disponibles pour réduire les effets néfastes des agents infectieux. La mise en place de mesures de prophylaxie sanitaire, par l'intermédiaire de mesures de police ou par la diffusion de guides de bonnes pratiques culturelles, et ce afin de mieux maîtriser la diffusion des maladies des coquillages, reste limitée par la connaissance des caractéristiques épidémiologiques des différentes maladies et notamment la compréhension de la transmission des agents pathogènes, la diffusion des maladies ou les relation hôtes-pathogènes au sein des populations.

Parmi les différents freins qui limitent les possibilités de lutte contre les maladies, on peut notamment citer :

1/ Les huîtres vivent en milieu ouvert, filtrent de grands volumes d'eau et sont exposées à une large gamme de microorganismes potentiellement pathogènes ou pouvant opportunément profiter d'une baisse de défense. Elles sont également directement soumises aux variations de leur environnement.

2/ Pour se défendre, les huîtres dépendent de leur système immunitaire inné et la vaccination ne peut être utilisée pour les protéger contre les agents infectieux. De plus, en termes de diagnostic, la détection directe d'agents infectieux reste la seule approche possible.

3/ Les mollusques de culture et les mollusques sauvages partagent les mêmes habitats écologiques et il n'y a pas de distinction réelle entre les stocks d'aquaculture et les stocks naturels en matière de risque d'émergence des maladies et de propagation.

4/ La coquille limite l'observation du comportement des individus malades. En outre, les techniques de production classiques ne permettent pas un suivi quotidien et une alerte rapide, en cas de changements dans le comportement alimentaire ou d'apparition de signes d'affaiblissement. De fait, les conchyliculteurs découvrent les mortalités « après-coup » ce qui signifie qu'il est difficile de recueillir des spécimens mourants ou récemment morts pour la détection d'agents infectieux, la chair des animaux étant souvent rapidement dégradée ou consommée.

5/ Enfin, les techniques traditionnelles d'élevage utilisent de nombreux transferts entre zones de production. Si les transferts d'animaux ont un impact positif sur le développement économique du secteur de l'aquaculture des mollusques, ils sont identifiés comme une menace majeure en diffusant d'un secteur à l'autre les agents infectieux [182].

L'étude de deux maladies majeures qui touche l'ostréiculture en France d'un point de vue de la variabilité d'origine génétique est l'opportunité de vérifier s'il est possible de mener un programme de sélection génétique permettant d'obtenir des lignées résistantes à ces maladies ou des lignées présentant une robustesse générale vis-à-vis des agents pathogènes. De plus elle devrait permettre de distinguer des paramètres environnementaux qui influencent l'importance des mortalités induites par ces maladies.

II. DEUXIEME PARTIE

Etude des familles de plein-frères



Photo : Patrick Azéma

II.1 Introduction

En France, à chaque printemps depuis l'année 2008, lorsque la température de l'eau de mer augmente et dépasse environ 16°C, des mortalités importantes d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, principalement au stade naissain, sont observées, en lien avec la détection du variant μ var de l'herpès virus OsHV-1. Ces mortalités impactent principalement des animaux qui n'ont pas été préalablement en contact avec le virus, soit issus d'un captage dit tardif, à l'automne, soit issus d'animaux élevés en écloserie. Ces mortalités ont eu un impact majeur pour le secteur ostréicole avec en particulier des difficultés en matière d'approvisionnement en naissain et une réduction des tonnages d'animaux mis sur le marché. Afin de compenser les mortalités de naissain, les ostréiculteurs ont développé l'utilisation de naissain issu d'écloserie et ont multiplié le nombre de capteurs de naissain sur estran. A ces mortalités de naissain, se sont rajoutées des mortalités notables observées, depuis 2012, sur des huîtres adultes, de taille commerciale, en lien avec la détection de la bactérie marine *Vibrio aestuarianus*. La mise en évidence de cette bactérie, en forte augmentation sur des analyses réalisées sur des lots issus échantillonnés lors d'épisodes de mortalités à partir de 2012 est devenue quasiment systématique depuis 2014 [14-16, 183], ce qui laisse supposer que l'infection par cette bactérie est un facteur déterminant dans l'occurrence des mortalités d'adultes. L'impact, années après années, de ces deux agents infectieux sur les populations naturelles et sur les animaux d'élevage d'huîtres creuses a eu pour effet une baisse du niveau de production annuel, qui a diminué de 120 000 tonnes en 2008 à 80 000 tonnes en 2014.

Ces mortalités ont fait l'objet de nombreuses études dans différents domaines depuis de nombreuses années qui ont permis de mettre en évidence une étiologie complexe [17] faisant intervenir des mécanismes physiologiques et immunitaires en interaction avec des facteurs génétiques et environnementaux.

L'étude des paramètres génétiques de la sensibilité à une ou des maladies permet d'obtenir des informations essentielles et complémentaires afin d'analyser l'importance relative de la part

d'origine génétique et de la part d'origine environnementale. Ces informations permettent de savoir si le caractère de sensibilité à une maladie donnée est héritable, c'est-à-dire transmissible d'une génération à l'autre. Par ailleurs, la connaissance des éventuelles corrélations génétiques ou des trade-off qui pourraient être mis en évidence entre des caractères de survie à des maladies différentes sont à prendre en compte, notamment pour concevoir des objectifs de sélection dirigée dans le but d'améliorer la résistance à un ou plusieurs agents infectieux. Enfin, afin d'optimiser les intervalles de générations, et ainsi réduire le temps nécessaire pour obtenir des gains substantiels de survie, il est important de connaître à quel stade de développement la part génétique est la plus importante. Ce sont ces objectifs qui ont été poursuivis dans cette partie en prenant comme objet d'étude l'huître creuse et comme maladies les infections par OsHV-1 et par *V. aestuarianus*, les deux principaux facteurs de mortalité de cet animal en France.

Cette étude s'est appuyée sur des résultats préalablement obtenus au cours d'études en génétique et en pathologie développées par l'Ifremer. Ainsi, au début des années 2000, au cours du défi MOREST (Mortalités Estivales d'huîtres creuses), les bases génétiques de la survie du naissain de *Crassostrea gigas* en période estivale ont-elles été étudiées. L'estimation des paramètres génétiques a été obtenue en utilisant un plan de croisement hiérarchisé par les mâles [62]. Le projet MOREST a également permis d'étudier l'importance d'autres facteurs impliqués dans l'apparition des mortalités : des paramètres environnementaux tels que la température, les apports des bassins versants et des paramètres physiologiques notamment en relation avec la gamétogénèse [184-186]. Il a été montré que les mortalités d'huîtres creuses observées sur estran au stade naissain étaient fortement liées à la détection d'OsHV-1 et ce lien a été confirmé grâce à des expériences d'infections expérimentales en pratiquant des injections de suspensions d'OsHV-1 obtenues à partir de broyats d'huîtres, issues de lots à mortalité et ont pu reproduire la maladie. Enfin, des travaux de sélection massale sur estran au stade naissain sur 4 générations ont permis d'obtenir des gains de survie importants (de l'ordre de 60%) sur estran et en conditions expérimentales. Ainsi, ces travaux ont pu montrer le rôle prépondérant du virus OsHV-1 dans la survenue des mortalités et que la sélection permettrait d'améliorer les performances de survie.

Au cours du projet européen Bivalife, mis en œuvre entre 2010 et 2012, des familles de plein-frères, également produites selon un plan de croisement hiérarchisé par les mâles, avaient été utilisées pour tester, en conditions expérimentales, leur sensibilité à différents agents

pathogènes dont OsHV-1, *V. tasmaniensis* et *V. aestuarianus*. Ce projet a permis de mettre en lumière des aspects importants de la relation hôte-pathogène. Toutefois, les paramètres génétiques de la résistance à ces différents agents infectieux n'avaient pas été mesurés dans toutes les conditions, notamment pour la sensibilité aux infections expérimentales mises en œuvre avec les souches bactériennes.

Dans le **premier chapitre** de cette partie, l'étude des paramètres génétique a été menée en s'appuyant sur des expériences de mise en contact de lots échantillonnés dans quarante familles d'huîtres avec les agents infectieux OsHV-1 et *V. aestuarianus*, simultanément en conditions expérimentales au laboratoire et en conditions naturelles sur le terrain, et ce à **différents âges**. Les familles de plein-frères d'huîtres étudiées ont été obtenues selon un croisement hiérarchisé par les mâles, comme pour les projets MOREST et Bivalife. Nous avons considéré que les différents âges étudiés correspondaient à différents stades de développement de l'huître creuse : au stade naissain à 3 et 6 mois, au stade juvénile à 12 et 15 mois et enfin au stade adulte à 24 mois.

Le **deuxième chapitre** de cette partie présente deux expériences qui ont consisté à déployer sur estran des lots d'animaux issus des quarante familles biparentales. Dans la première expérience, les lots ont été répartis en deux sous-groupes de **poids différents** à l'âge de 10 mois. Pour constituer ces lots, l'apport de ressources trophiques a été différencié durant l'élevage larvaire. Il a été ainsi possible de déterminer l'importance relative aux pratiques d'élevage et au trait de vie dans les mortalités de naissain sur estran et de préciser les paramètres génétiques pour la résistance au stade naissain sur estran pour des animaux présentant, au même âge, des différentiels de croissance. Dans la deuxième expérience, des lots des quarante familles biparentales ont été placés sur estran à l'âge de 3 mois à des hauteurs différentes sur l'estran correspondant à des temps d'immersion de 2, 12 et 25%.

II.2 Premier chapitre :

Etude des paramètres génétiques de la survie de l'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, à l'infection par OsHV-1 et par *Vibrio aestuarianus*.

Les résultats de ce travail ont été présentés pour être publiés dans la revue Genetics Selection Evolution : « Genetic parameters of resistance to Vibrio aestuarianus, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, Crassostrea gigas, at three different life stages » [132].

Le contexte de l'étude est présenté ci-dessous et une synthèse des principaux résultats est présentée en conclusion du présent chapitre.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude des bases génétiques, c'est-à-dire l'héritabilité et les corrélations génétiques, de la résistance aux deux principales maladies qui mettent actuellement en difficulté la filière ostréicole française : l'infection par *Vibrio aestuarianus* et l'infection par OsHV-1. Pour mener à bien cette étude, quarante familles d'huîtres de plein-frères ont été produites selon un schéma de croisement hiérarchisé par les mâles – chaque mâle ayant été croisé à deux femelles – et testées en conditions expérimentales et en conditions extérieures. Les géniteurs de ces familles ont été échantillonnés au port de La Tremblade parmi des huîtres dites sauvages, issues de la fixation

du naissain sur des supports naturels, en prenant comme hypothèse que ces animaux étaient représentatifs des animaux mis en élevage, issus du captage naturel dans le bassin de Marennes-Oléron.

Par l'analyse des fratries, le croisement hiérarchisé permet de calculer les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations) et de distinguer la variance génétique additive (V_a). La variance phénotypique est alors séparée en composantes d'observations attribuables [187] aux différences entre les enfants des différents mâles (composante inter-mâle : σ_s^2), des femelles accouplées au mâles (composante inter-femelle et inter-mâles : σ_d^2) et d'une même femelle (composante inter-femelle : σ_w^2).

Les paramètres génétiques ont été jusqu'à présents évalués pour l'infection par OsHV-1 pour des huitres creuses, *Crassostrea gigas* aux stades naissain et juvénile mais pas pour les adultes. Les paramètres génétiques n'ont jusqu'à présent pas été évalués pour la résistance à l'infection par *Vibrio aestuarianus*.

Dans cette étude, la résistance des familles de plein-frères aux infections par *V. aestuarianus* et par OsHV-1 a été évaluée par des infections menées en conditions expérimentales au stade naissain, au stade juvénile et au stade adulte. Il a été possible de calculer les corrélations génétiques en conditions expérimentales entre les différents stades de développement pour la même maladie, entre les différentes maladies pour les mêmes stades de développement et entre les différentes maladies aux différents stades de développement.

Par ailleurs des lots d'animaux issus des mêmes familles de plein-frères ont également été déployés dans différents environnements extérieurs utilisés par les ostréiculteurs pendant les différentes phases d'élevage. L'étude des paramètres génétiques dans ces différents environnements avait pour but de mettre en évidence des interactions génétique par environnement et de mettre en évidence des corrélations entre les expériences menées en laboratoire et les études menées en milieu extérieur. Ainsi, des animaux au stade naissains ont-ils été répartis en poches d'élevage sur des tables situées sur un parc d'élevage du bassin de Marennes-Oléron, d'autres lots ont été placés au même stade dans une claire d'affinage. Des mortalités ont pu être observées dans ces différents environnements extérieurs. Les analyses pratiquées sur des échantillons d'huîtres moribondes prélevées lors des mortalités observées sur estran ont mis en évidence par PCR des quantités élevées d'ADN viral,

notamment aux stades naissain et juvénile, ce qui a confirmé l'hypothèse qu'OsHV-1 a été un facteur déterminant dans l'apparition des mortalités dans cet environnement.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages

Patrick Azéma¹, Jean-Baptiste Lamy¹, Pierre Boudry², Tristan Renault³, Marie-Agnès Travers^{1†} and Lionel Dégremont^{1*†}

Abstract

Background: In France, two main diseases threaten Pacific oyster production. Since 2008, *Crassostrea gigas* spat have suffered massive losses due to the ostreid herpesvirus OsHV-1, and since 2012, significant mortalities in commercial-size adults have been related to infection by the bacterium *Vibrio aestuarianus*. The genetic basis for resistance to *V. aestuarianus* and OsHV-1 and the nature of the genetic correlation between these two traits were investigated by using 20 half-sib sire families, each containing two full-sib families. For each disease, controlled infectious challenges were conducted using naïve oysters that were 3 to 26 months old. In addition, siblings were tested under field, pond and raceway conditions to determine whether laboratory trials reflected mortality events that occur in the oyster industry.

Results: First, we estimated the genetic basis of resistance to *V. aestuarianus* in *C. gigas*. Susceptibility to the infection was low for oysters in spat stage but increased with later life stages. Second, we confirmed a strong genetic basis of resistance to OsHV-1 infection at early stages and demonstrated that it was also strong at later stages. Most families had increased resistance to OsHV-1 infection from the spat to adult stages, while others consistently showed low or high mortality rates related to OsHV-1 infection, regardless of the life stage. Our third main finding was the absence of genetic correlations between resistance to OsHV-1 infection and resistance to *V. aestuarianus* infection.

Conclusions: Selective breeding to enhance resistance to OsHV-1 infection could be achieved through selective breeding at early stages and would not affect resistance to *V. aestuarianus* infection. However, our results suggest that the potential to select for improved resistance to *V. aestuarianus* is lower. Selection for dual resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* infection in *C. gigas* might reduce the impact of these two major diseases by selecting families that have the highest breeding values for resistance to both diseases.

Background

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the main oyster species cultivated worldwide, accounting for 98% of the global oyster production. However, oyster production is

highly vulnerable to degradation of the environment by pollutants and infectious disease outbreaks. Mass mortality events in Pacific oysters have been reported since the 1950s in most producing areas, including Japan, the USA, Europe, New Zealand, and Australia. Different pathogenic agents (bacteria, viruses, and parasites) have been implicated in these outbreaks and can affect different life stages. One striking example concerns the oyster production in France, which is the fourth largest oyster producer in the world with an annual production of 79,000 tons of

*Correspondence: lionel.degremont@ifremer.fr

†Marie-Agnès Travers and Lionel Dégremont contributed equally to this work and should both be considered as last co-authors

¹ Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Ifremer, avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

C. gigas for a value of 479.5 million US dollars in 2013 [1]. Originally, the French oyster production was based on (1) the flat oyster *Ostrea edulis*, but it decreased because of two protozoan parasites, *Bonamia ostreae* and *Marteilia refringens* [2], and (2) the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*, which initially originated from Asia [3] but its production collapsed due to the detection of irido-like viruses [4]. Then, another exotic species, *C. gigas*, was massively introduced from Japan and British Columbia during the 1970s to sustain the French production [5]. Although, since its introduction, several pathogens have been detected in *C. gigas* during mortality outbreaks in France [6, 7], since 2008 such outbreaks have greatly risen at the spat (or seed) stage, due to a variant of the herpesvirus OsHV-1, named μ Var [8–10], and since 2012 in adults, due to the bacterium *Vibrio aestuarianus* [11–13]. These two pathogens had already been detected in earlier mortality outbreaks [9, 14], but their impacts on French oyster production have been particularly significant since 2008.

Many factors may influence the dissemination of a disease, in particular, rearing practices, such as increased stocking densities on farms or transfer of infected animals [15]. Other factors may favor the vulnerability of the host such as stressful environmental conditions, including seawater pollution, acidification, and global warming, or the physiological status, including energy allocation for metabolic reserves during growth, gametogenesis, or spawning [16, 17]. Finally, the host immune competence for defense against a pathogen can be affected by environmental or genetic factors and genetic variability could be used in breeding programs to enhance disease resistance through a straightforward quantitative genetic approach [18, 19].

To date, selective breeding to improve oyster performance for the industry has mainly focused on traits such as growth [20–23], yield [24], or shell pigmentation [25]. Similarly, genetic improvement for disease resistance, which is considered as a promising approach to reduce disease losses in oyster production, has been successfully implemented in several countries [19]. Nevertheless, most studies in the literature did not provide estimated heritabilities or genetic correlations for disease resistance.

Recently, heritability for resistance to OsHV-1 infection was estimated in young (i.e. less than one year old) oysters, but not in larvae or adults [19]. Mortality events due to OsHV-1 infection were usually observed in spat (<2 cm/<5 g) or juvenile (2–5 cm/5–20 g) stages [17, 26–28]; adult oysters (>5 cm/>20 g) appear to be less susceptible to OsHV-1, both in field and laboratory trials [29, 30]. Recent experiments revealed that resistance to

OsHV-1 infection increased with life stage [31, 32], but genetic parameters were not estimated in adults. To date, genetic parameters related to *V. aestuarianus* resistance/susceptibility have not been evaluated under field or controlled conditions, although differences in susceptibility to this bacterium between *C. gigas* stocks was reported [33, 34].

In the current study, two approaches were used to assess genetic resistance to *V. aestuarianus* and OsHV-1 infection in *C. gigas* during three successive life stages (spat, juveniles, and adults). In the first approach, experimental infections under controlled conditions in the laboratory were undertaken to estimate genetic parameters by minimizing environmental variations and for a single pathogenic agent. In the second approach, we carried out field trials in which oysters were faced to an uncontrolled environment with exposure to various pathogens. The field trials allowed us to determine whether the laboratory trials reflected the mortality events that are encountered by the oyster industry and which may result from a combination of several pathogens.

The objectives of our study were: (1) to investigate the susceptibility to *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections at successive life stages; (2) to estimate the heritability of resistance to these infections at each life stage; and (3) to determine the genetic correlations between resistance to *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections during a given life stage and between life stages.

Methods

Production of oyster families

In December 2012, *C. gigas* individuals were sampled from a wild population that was located at La Tremblade (Charente-Maritime, France), in the estuary of the Seudre River (Marennes-Oleron Bay: 45°46'53.5"N, 1°7'19.5"W). Oysters were brought to the Ifremer facilities in La Tremblade and placed in 240 L conditioning tanks. Seawater temperature was gradually increased to 21 °C during 1 week. Seawater flow was 400 L/h, and a cultured phytoplankton diet (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, and *Skeletonema costatum*) was provided ad libitum (50,000 cells/mL). In March 2013, oysters were opened and sexed by microscopic observation of gonad samples spread on a slide. Gametes were collected by stripping the gonads from 20 sires and 40 dams. Eggs were sieved on 60- μ m and then 20- μ m mesh screens to remove large and small tissue debris, respectively and sperm was sieved on 60- μ m mesh screens.

Fertilization was conducted following a nested half-sib design: each sire mated with two dams, producing 20 half-sib sire families (HSF), each containing two full-sib families (FSF). The 40 FSF were reared separately in 30 L

tanks at 25 °C using UV-treated (40 mj/cm²) and filtered seawater (5 µm). Water was changed three times a week. Larvae were fed daily with *I. galbana* (30,000 cells/mL) until they reached 140 µm, and then the phytoplankton diet was complemented with *S. costatum* (30,000 cells/mL).

Fourteen to 18 days after fertilization, larvae from all crosses settled on cultch in 120 L raceways, which each contained six to seven separate families. Oyster seeds were reared under standard hatchery conditions until they reached a size of 2 mm. Then, in May 2013, 5000 oysters per family were transferred to the Ifremer nursery in Bouin (Vendée, France), while 2000 oysters per family remained in the hatchery facilities in La Tremblade. Oysters were kept in experimental facilities from spawning in March 2013 to May 2015 with UV-treated and filtered seawater and under biosecurity control to avoid contamination with OsHV-1 and *V. aestuarianus*. Each FSF was sampled 13 times during this period for genetic evaluation using either ten experimental infections under laboratory conditions (five ages × two pathogens) or three uncontrolled disease exposures in three environments that are commonly used by oyster farmers (field, pond, and raceways) (Fig. 1).

Three to 26-month old oysters were monitored in our study (Table 1). Three age groups were defined: spat (3 to 6 months old, <2 cm/<5 g), juvenile (11 to 15 months old, 2–5 cm/5–20 g) and adult (25 to 26 months old, >5 cm/>20 g).

No ethical approval was necessary for this study because experimental research on Pacific oyster, which is a bivalve mollusk, does not require special authorization.

Experimental infections under controlled conditions

Bacterial and viral infectious suspensions

The *Vibrio* strain used in the bacterial challenges was the highly pathogenic strain 02/041, which was isolated during a mortality episode that affected adult oysters, and already studied [35]. This *Vibrio* suspension was obtained from an isolate maintained at –80 °C. Bacteria were grown in Zobell media and incubated for 24 h at 20 °C under constant agitation at 20 rpm. The resulting suspension was centrifuged at 3200g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was washed and suspended in sterile artificial sea water (SASW).

The viral suspension was produced using the protocol described in [36]. Briefly, hatchery-produced oysters, which are considered as non-infected, were infected by injecting 50 µL of a viral suspension after “anesthesia” [37]. Experimentally-injected dead oysters were dissected to separate the mantle and gills, which were pooled, diluted, crushed and filtered on a 0.22-µm mesh to obtain a clarified tissue homogenate.

Genetic evaluation of resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections

FSF were evaluated for resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections under controlled laboratory conditions with five experiments for each pathogen: two experiments for the spat stage (Spat 1 and Spat 2) and two experiments for the juvenile stage (Juvenile 1 and Juvenile 2), and one experiment for adults (Adult) (Table 1). For each experiment, naïve oysters were tested.

Challenges under controlled conditions were performed in 100 L tanks with filtered (50 µm) and UV-treated (40 mj/cm²) seawater that was maintained at 21 °C, with aeration but without feeding, and 32‰ salinity. A recirculating system was used to optimize horizontal transmission of the infectious diseases by continuously homogenizing the seawater. All effluents were collected and treated by a specialized company to prevent introducing the pathogens used in the experimental infections into the environment.

Cohabitation disease challenge protocols, as previously described [38, 39], were adapted to evaluate disease resistance in *C. gigas*. Such protocols include two steps: (1) naïve oysters were anaesthetized in a solution containing magnesium chloride (MgCl₂, 50 g/L) in a mixture of seawater and distilled water (1:4, v:v) for 4 h [37]; then, 50 µL of infectious bacterial (corresponding to 10⁷ bacteria/oyster) or viral suspensions (corresponding to 10⁶ viral copies/oyster) were injected into the adductor muscle using a 1-mL micro-syringe equipped with an 18-G needle; the injected oysters were transferred into 10 L tanks for 24 h; and (2), the oysters were placed in the same tank for 48 h with the 40 FSF to test disease resistance. Control tanks were added in each challenge protocol and included oysters that had been injected with SASW and placed in the same tank than the FSF. A ratio of 100 g of injected oysters to 10 L of seawater was used for all the experiments. All injected oysters were removed 48-h post-infection.

For *Vibrio* challenges, we used oysters that were 3, 6, 11, 14 or 26 months old with an average weight of 0.5, 2.3, 6.4, 12.0 and 34.7 g, respectively. For OsHV-1 challenges, we used oysters that were 3, 6, 12, 15 and 25 months old with mean individual weights of 0.5, 2.3, 6.2, 11.1 and 37.1 g, respectively (Table 1).

For the two experimental infections at the spat stage, one 100 L tank was used per disease that contained three soft mesh nets of 25 oysters per family, representing a total of 3000 oysters in the tank for a total biomass of 1.5 and 6.9 kg for Spat 1 and Spat 2, respectively. For the two juvenile stage experiments, three 100 L tanks were used for each disease to maintain a biomass under 10 kg per tank. Each tank contained the 40 FSF with 15–20 juveniles per family, representing 600 and 800

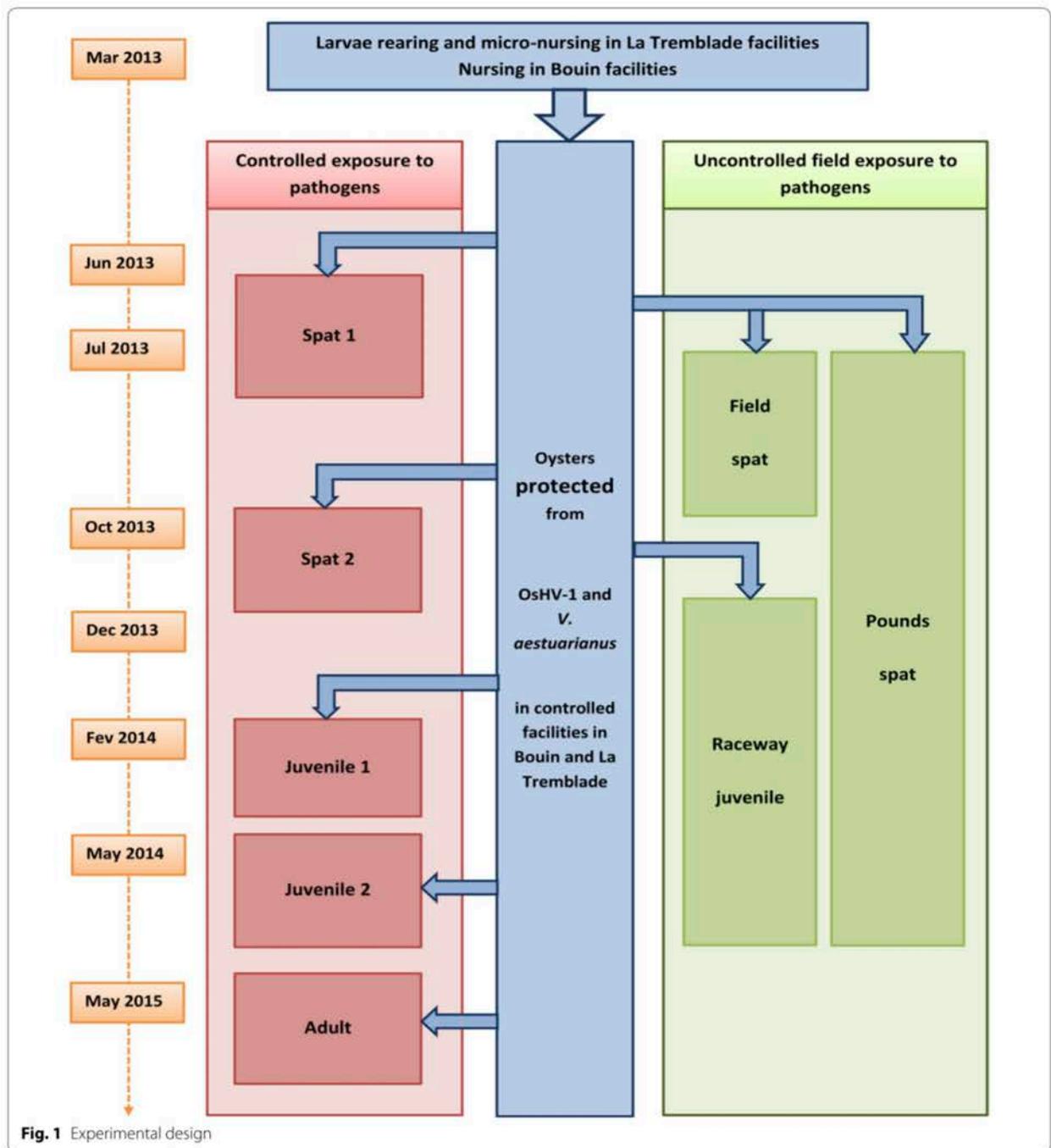


Fig. 1 Experimental design

oysters, for a total biomass of 3.8 and 8.9 kg for Juvenile 1 and Juvenile 2, respectively. At the adult stage, the focus was on bacterial rather than viral infections, due to limited availability of oysters and a lack of data in the literature on resistance to *V. aestuarianus* in *C. gigas*. Thus, two and six 100 L tanks were used for the experimental

infection with OsHV-1 and *V. aestuarianus*, respectively. Each tank contained 39 FSF (one FSF did not include a sufficiently large number of oysters to perform all the experiments because of a lower hatching rate), each represented by five individually-tagged oysters, for a total of 195 oysters and a biomass ranging from 6.7 to 7.2 kg. The

Table 1 Summary of the trials to evaluate resistance to *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections

Experiment	Controlled disease exposure in laboratory conditions										Uncontrolled disease exposure				
	Spat 1 V.a.	Spat 2 V.a.	Juv 1 V.a.	Juv 2 V.a.	Adult V.a.	Spat 1 OsHV-1	Spat 2 OsHV-1	Juv 1 OsHV-1	Juv 2 OsHV-1	Adult OsHV-1	Spat Field July 2013–September 2013	Spat Ponds July 2013–February 2014	Juvenile Raceways December 2013–May 2014		
Date of challenge	July 2013	October 2013	March 2014	June 2014	June 2015	July 2013	October 2013	April 2014	July 2014	May 2015	July 2013–September 2013	July 2013–February 2014	December 2013–May 2014		
Age (months)	3	6	11	14	26	3	6	12	15	25	3	3	8		
Mean individual weights (g)	0.5	2.3	6.4	12.0	34.7	0.5	2.3	6.2	11.1	37.1	0.5	0.5	8.2		
Number of tanks	1	1	3	3	6	1	1	3	3	2	1	1	3		
Family/tank	40	40	40	40	39	40	40	40	40	39	40	40	40		
Animal/family	75	75	45	60	30	75	75	45	60	10	100	100	170		
Total number of oysters tested	3000	3000	1800	2400	1170	3000	3000	1800	2400	390	4000	4000	6800		
Mean mortality (range among families) (%)	5 (0–11)	15 (0–38)	49 (20–92)	44 (24–72)	89 (67–100)	86 (21–100)	74 (23–100)	59 (7–100)	41 (8–83)	55 (0–100)	89 (25–100)	56 (40–75)	(62–100)		
<i>V. aestuarianus</i> DNA detection in moribund	21/21	37/37	40/40	75/75	42/42	0/10	0/20	13/16	28/54	0/24	0/12	0/20	54/54		
Mean number of copies/mL for 25 ng of total DNA	4.10E+04	2.00E+07	2.70E+07	5.60E+05	4.40E+07			2.00E+05	4.50E+02				4.00E+06		
OsHV-1 DNA detection in moribund	0/21	0/37	0/40	12/75	10/42	10/10	20/20	16/16	54/54	23/24	12/12	0/20	16/54		
Mean number of copies/μL for 25 ng of total DNA				7.00E+02	2.50E+03	2.50E+10	1.10E+07	1.70E+10	7.40E+07	7.30E+08	4.80E+09		6.90E+01		

V. a., *V. aestuarianus*; Juv 1 and 2, Juvenile 1 and 2; Spat, oyster <2 cm/<5 g; Juvenile, oyster 2–5 cm/5–20 g; Adult, oyster >5 cm/>20 g

tag was fixed on the upper shell with epoxy glue. Before genetic evaluation of the families at the adult stage, most of the oysters spawned.

Mortality was checked on a daily basis by observing the oysters in the tank. Mortality was estimated by counting the live and dead oysters at 5 and 11 days post-exposure for both disease exposures. An oyster was considered as dead when it was unable to close its valves after a 5 min-period out of the water.

Testing spat under field and pond conditions

FSF oysters at the spat stage were deployed in the field at Agnas in the Marennes-Oléron Bay (45°52'23"N, 1°10'15"W) and in ponds called "claires," at La Floride in La Tremblade (45°48'01"N, 1°09'09"W) on the 27th of July 2013. At deployment, oysters were 3 months old with an average weight of 0.5 g (Table 1). For each site, four bags were used, each containing the 40 FSF with 25 individuals per family, corresponding to 1000 individuals and 0.5 kg per bag. Within each bag, the families were separated using soft mesh bags with a label indicating the family name. For the experiment carried out in the pond, bags were fixed on racks, which were always immersed. The pond had an average depth of approximately 70 cm for a volume of 250 m³, and it was naturally supplemented with seawater during the spring tides, when the tidal coefficient exceeds 85. Survival was recorded each month from August 2013 to February 2014. For the field experiment, bags were fixed on racks, which emerged when the tide coefficient was above 70. Mortality was checked at 2 weeks post-planting and recorded at 6 weeks post-planting on the 6th of September. Seawater temperature was recorded hourly in each environment using two ThermoTrack probes (Progesplus, 59780, Willems, France).

Testing juveniles under the raceway conditions

In December 2013, oysters from the nursery in Bouin were transferred into a pond in La Tremblade for 2 months. This pond was located near the one used for the pond conditions described above. Seawater temperature was below 10 °C in the pond and no mortality was observed during this period. In February 2014, oysters were placed in three 800 L flow-through raceways, filled with filtered and UV-treated seawater, at the Ifremer facilities in La Tremblade. For two of these flow-through raceways, 50 animals per family divided into two tagged soft mesh bags were tested in each raceway. For the third raceway, one tagged soft mesh bag was used per family, each containing 70 oysters. The initial aim of this testing was to study the occurrence of infectious diseases under confined conditions. Survival was recorded twice a month from February to May 2014. Seawater

temperature was recorded hourly using two ThermoTrack probes (Progesplus, 59780, Willems, France). For control measures, siblings were not transferred into the pond, but directly placed in raceways in December 2013.

Detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA

In each experiment, the moribund oysters were sampled for detection of *V. aestuarianus* and OsHV-1 DNA (Table 1). Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle and gills) using the QIAgen (Hilden, Germany) QIAamp tissue mini kit combined with the use of the QIAcube automate, according to the manufacturer's protocol. The amount of total DNA was adjusted to 5 ng/μL after quantification with a Nanodrop instrument (Thermo Scientific).

A real-time PCR assay was conducted on the MX3000 and MX3005 thermocyclers (Agilent) using the Brilliant III Ultrafast kit (Stratagene). Each reaction was run in duplicate in a final volume of 20 μL containing the DNA sample (5 μL at 5 ng/μL), 200 nM of each primer (for OsHV1-μvar: DPF 5' ATT GAT GATGTG GAT AAT CTG TG 3' and DPR 5' GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGTTCC 3' [40]; for *V. aestuarianus*: DNAj-F 5' GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA 3' and DNAj-R 5' CAATTTCTTTTGAACAACCAC 3' [41]), and 200 nM of oligonucleotide probe (for *V. aestuarianus* DNAj: 5' TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC). Real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s, 60 °C for 20 s. For quantification of OsHV-1 DNA, melting curves were also plotted (55–95 °C) to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. Negative controls (without DNA) were included.

Statistical and quantitative genetic analyses

For all trials, statistical analyses of the recorded traits were performed with a cross-sectional model that analyzed survival at a fixed point in time. For both controlled (i.e. laboratory conditions) and uncontrolled disease exposures (field, pond and raceways), the status of each individual was recorded as a binary trait (dead = 0 and alive = 1). For disease exposure under laboratory conditions, mortality was analyzed at day 11 post-infection. For the field trial, mortality was recorded once at 6 weeks post-planting, and analyzed at this time. For pond and raceway experiments, mortality was recorded 8 to 19 times. We analyzed the mortality at day 146 for the pond experiment and at day 70 for the raceway experiment, when the mean mortality rate reached approximately 50%, at which point the phenotypic variance of a binary trait is maximized [42].

Genetic analyses were performed with a generalized linear mixed model using the Glimmix procedure of

SAS software [43] and ASReml [44] using the following equation:

$$\mathbf{y} = g^{-1}(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\boldsymbol{\gamma}),$$

where \mathbf{y} is the vector of n observations (the binary trait dead = 0 and alive = 1 in our case), and $g^{-1}(\cdot)$ is the inverse of the logit function $\left(\frac{e^{\eta}}{1+e^{\eta}}\right)$.

\mathbf{X} is a $(n \times p)$ design matrix of rank k that links the observations to the vector $\boldsymbol{\beta}$ of the p fixed effects. Here, we considered three fixed effects: intercept, blocks (tanks or bags) and family average individual weight. Depending on the analysis, other fixed effects were added: life-stages (five life stages: Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2, and Adult) or pathogen treatments (OsHV-1 or *V. aestuarianus*) (see below). \mathbf{Z} is a $(n \times r)$ design matrix that links the observations to vector $\boldsymbol{\gamma}$ of the r random effects. We did not constrain (co)variances matrices to be definitive positives (!GP qualifiers in ARSemi) since negative variances estimates are expected in case of small amounts of data [45]. As the mating plan was a North Carolina design I, we used a sire and dam model (estimations are similar to those in the animal model but the required computational time is much shorter and convergence more regular). Indeed, we considered two random effects: sire and dam (nested within sire) [45]. The random effects were assumed to be normally distributed as $N \sim (0, \mathbf{G})$. The estimates of the generalized linear mixed model were given in the underlying liability scale and genetic parameters could be computed directly. Dominance was assumed to be negligible.

Across the three life stages, 11,370 and 10,590 oysters were phenotyped for *V. aestuarianus* and OsHV-1, respectively. To obtain meaningful estimates of heritability and genetic correlations between life stages, we analyzed simultaneously all experimental challenges for each disease using the model described above by setting-up the \mathbf{G} matrix as follows:

$$\begin{bmatrix} \sigma_s^2 \otimes \boldsymbol{\Sigma}_j & 0 \\ 0 & \sigma_d^2 \otimes \boldsymbol{\Sigma}_j \end{bmatrix},$$

where $\boldsymbol{\Sigma}$ is an unstructured (co)variance square matrix with rank j (five life stages: Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2, and Adult), σ_s^2 and σ_d^2 are the sire and dam variances, respectively within rank j , and the following fixed effects were included: life stage, blocks, and family average individual weight.

To estimate the genetic correlation between diseases (within or between each life stage), we used a bivariate model with a \mathbf{G} matrix that was similar to that shown above except that $\boldsymbol{\Sigma}$ is a square matrix with rank 2 (two traits) and the fixed effects were pathogen treatments, blocks and family average individual weight.

Both programs gave similar estimations (see Additional file 1: Figure S1), but since reaching convergence is more difficult with SAS when several random effects are considered with the pseudo-likelihood techniques, we only reported ASReml estimates.

Heritability of survival in each experiment was computed for the narrow sense h_n^2 , as follows:

$$h_n^2 = \frac{V_a}{V_t} = \frac{4 \cdot \sigma_m^2}{\sigma_m^2 + \sigma_f^2 + \sigma_e^2},$$

where V_a is the additive genetic variance, estimated as four times the variance among sires (σ_m^2) and V_t is the total phenotypic variance, with σ_e^2 being $\frac{\pi^2}{3}$ for a logit link [46]. σ_f^2 is the variance among dams.

In addition, we also calculated genetic correlations of survival between the field experiment and the experiments under laboratory conditions, as well as between the raceway experiment and the experiments under laboratory conditions using bivariate models.

Estimated heritabilities and genetic correlations were significantly different from 0 when $P < 0.05$.

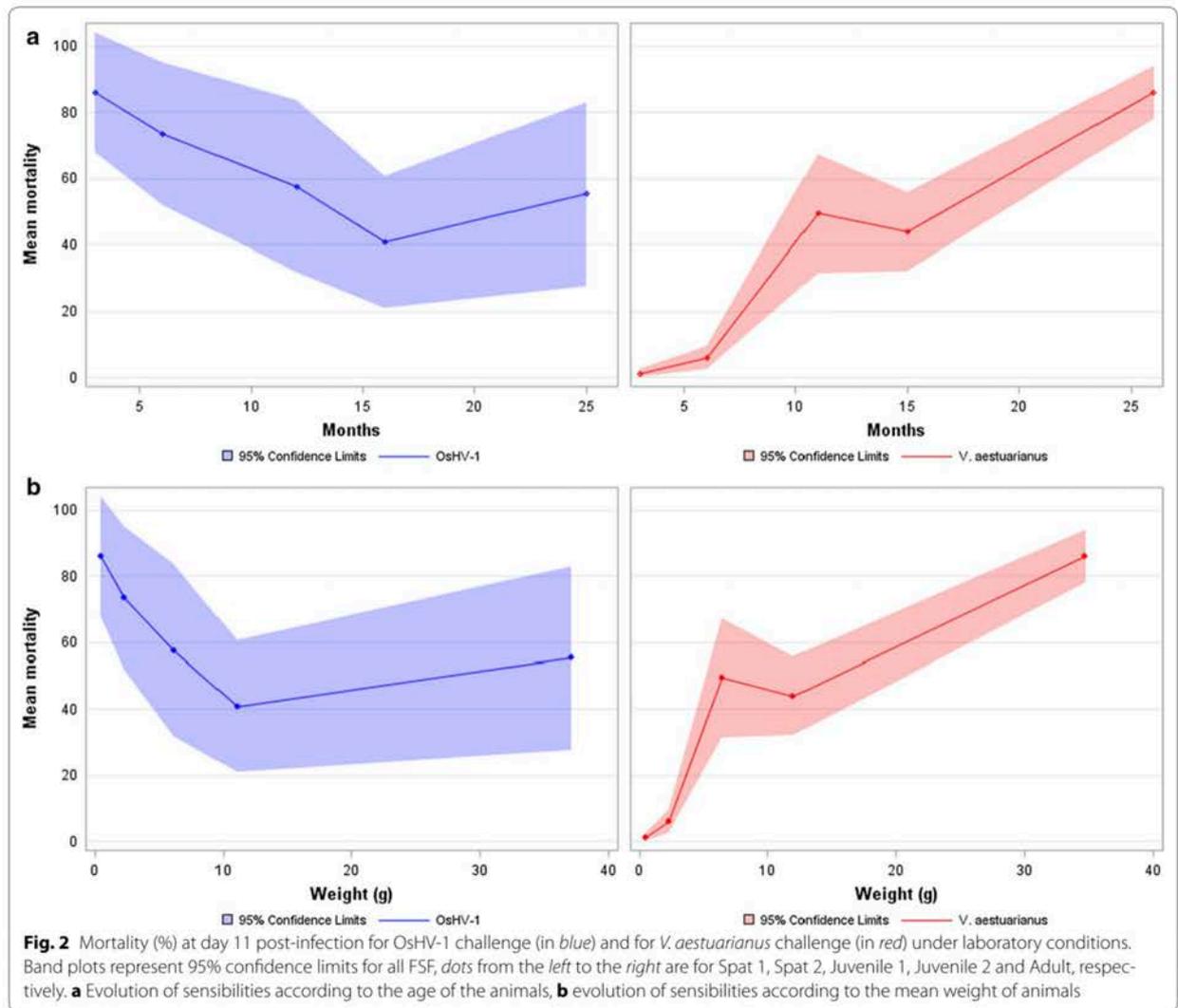
Results

Effects of life stage on susceptibility to *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections

There was no mortality in the control tanks for all the experiments conducted in the laboratory.

For *V. aestuarianus* infection, mortality was first observed at day 5 post-infection. At day 11, the mean mortality of the 40 FSF was low in Spat 1 (5%, ranging from 0 to 11%) and Spat 2 (15%, ranging from 0 to 38%), moderate in Juvenile 1 (49.3%, ranging from 20 to 91.9%) and Juvenile 2 (43.8%, ranging from 24.2 to 71.7%), and high in Adult (89%, ranging from 66.7 to 100%) (see Table 1; Fig. 2). Large numbers of DNA copies of *V. aestuarianus*, ranging from 4.1×10^4 to 4.4×10^7 copies/mL for 25 ng of total DNA, were found in all moribund oysters sampled from spat to adult stages (Table 1). In contrast, OsHV-1 DNA was not detected in oysters in Spat 1, Spat 2, or Juvenile 1, while 16 and 24% of the samples were positive in Juvenile 2 and Adult, respectively, at a low level ($<10^3$ copies/ μL for 25 ng of total DNA) (Table 1). Effect of life stage was highly significant followed by block and family average weight (all with $P > 0.001$).

Onset of mortality occurred at day 2 post-infection with OsHV-1 and reached a peak at day 5. At day 11, the mean mortality rate of the 40 FSF was high in Spat 1 (86%), ranging from 20.5 to 100%, and Spat 2 (73.5%) ranging from 23.5 to 100%. Mortality rate was lower in Juvenile 1 (58.6%, ranging from 6.7 to 100%), Juvenile 2 (40.7%, ranging from 8.3 to 83.3%), and Adult



(54.9%, ranging from 0 to 100%) (see Table 1; Fig. 2). A large number of OshV-1 DNA copies, ranging from 1.1×10^7 to 2.5×10^{10} copies/ μL for 25 ng of total DNA, was determined for all moribund oysters that were sampled from the spat to adult stage, except for one sample in Adult (Table 1). In contrast, *V. aestuarianus* DNA was not detected in Spat 1, Spat 2, or Adult, while 81 and 52% of the samples were positive with a high (2.0×10^5 copies/mL for 25 ng of total DNA) and low (4.5×10^2 copies/mL for 25 ng of total DNA) load in Juveniles 1 and Juveniles 2, respectively (Table 1). The effect of life stage was highly significant followed by block (all $P > 0.001$), family average weight was not significant ($P = 0.49$).

Genetic parameters for resistance to *V. aestuarianus* infection differ between life stages whereas those for resistance to OshV-1 infection are stable from spat to adult stages

Narrow sense heritabilities for survival of *C. gigas*, when exposed to *V. aestuarianus*, were low for both challenges at spat stages (0.09 ± 0.10 and 0.11 ± 0.07 at 3 and 6 months old, respectively) and moderate at the juvenile stages (0.26 ± 0.17 and 0.16 ± 0.09 at 11 and 15 months old, respectively) and the adult stage (0.33 ± 0.25 at 26 months old) (Table 2). Variance components are in Additional file 2: Table S1. Most of the genetic correlations between life stages, when exposed to *V. aestuarianus*, were positive, but they were significantly different

Table 2 Narrow sense heritability (diagonal) and genetic correlations (below diagonal) for survival of *C. gigas* when exposed to *V. aestuarianus* under laboratory conditions

	<i>V. aestuarianus</i>				
	Spat 1	Spat 2	Juvenile 1	Juvenile 2	Adult
<i>V. aestuarianus</i>					
Spat 1	0.09 ± 0.10				
Spat 2	0.55 ± 0.59	0.11 ± 0.07			
Juvenile 1	-0.25 ± 0.65	0.22 ± 0.47	0.26 ± 0.17		
Juvenile 2	0.34 ± 0.52	0.55 ± 0.30	0.99 ± 0.23*	0.16 ± 0.09	
Adult	0.66 ± 0.76	1.48 ± 0.60*	0.48 ± 0.48	1.10 ± 0.42*	0.33 ± 0.25

Spat, oyster <2 cm/<5 g; Juvenile, oyster 2–5 cm/5–20 g; Adult, oyster >5 cm/>20 g

* Significantly different from 0

from 0 only between Adult and Juvenile 2 or Spat 2, and between Juvenile 1 and Juvenile 2 (Table 2).

Narrow sense heritabilities of survival of *C. gigas* to OsHV-1 infection were high: 0.99 ± 0.39 and 0.65 ± 0.31 for challenges in Spat 1 and Spat 2, respectively; 0.78 ± 0.33 in Juvenile 1; and 0.78 ± 0.49 in Adult. Narrow sense heritabilities were lower for Juvenile 2 i.e. 0.40 ± 0.21 (Table 3). Variance components are in Additional file 3: Table S2. Genetic correlations of survival between OsHV-1 challenges at different life stages were all high and positive, ranging from 0.55 to 1.06 (Table 3).

Resistance to *V. aestuarianus* and to OsHV-1 infections are not correlated under laboratory conditions

Table 4 presents the genetic correlations of survival between *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections within and between the three stages under laboratory conditions. No significant genetic correlation was observed between survival to viral infection and survival to bacterial infection. Excluding the genetic correlations between OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections at Spat 1 and Spat 2 due to low levels of mortality with the bacteria, no particular trend was observed across life stages

with genetic correlations ranging from -0.40 between OsHV-1 in adult and *V. aestuarianus* in Juvenile 1 to 0.57 between OsHV-1 in Spat 1 and *V. aestuarianus* in Juvenile 2 (Table 4).

Mortality in field, pond, and raceway trials

Under field conditions, mortality rate was very high within 15 days post-planting, and mean mortality rate among the FSF reached 89%, ranging from 25 to 100% at 6 weeks post-planting. Nine families had a 100% mortality rate, and only six families had a mortality rate lower than 66%. The narrow sense heritability estimate of survival was equal to 2.15 and outside the parameter space (Table 5). A high load of OsHV-1 DNA copies was detected in all moribund oysters with a mean concentration of 4.8×10^9 copies/ μ L for 25 ng of total DNA, whereas *V. aestuarianus* DNA was not detected in any of these oysters.

In the experiments in the ponds, mortality began 1 month post-deployment (3.6% at day 34) (Fig. 3). Mortality rates reached 19.3, 35.1, 43.8, and 49.4% at days 49, 63, 80 and 102, respectively. Mortality rate stabilized during winter, when the temperature was below 13 °C, and

Table 3 Narrow sense heritability (diagonal) and genetic correlations (below diagonal) for survival of *C. gigas* when exposed to OsHV-1 under laboratory conditions

	OsHV-1				
	Spat 1	Spat 2	Juvenile 1	Juvenile 2	Adult
OsHV-1					
Spat 1	0.99 ± 0.39*				
Spat 2	1.06 ± 0.17*	0.65 ± 0.31*			
Juvenile 1	0.98 ± 0.18*	0.92 ± 0.11*	0.78 ± 0.33*		
Juvenile 2	0.55 ± 0.29	0.68 ± 0.23*	1.02 ± 0.12*	0.40 ± 0.21	
Adult	0.90 ± 0.30*	0.81 ± 0.24*	0.72 ± 0.23*	0.75 ± 0.24*	0.78 ± 0.49

Spat, oyster <2 cm/<5 g; Juvenile, oyster 2–5 cm/5–20 g; Adult, oyster >5 cm/>20 g

* Significantly different from 0

Table 4 Genetic correlations of survival between diseases within or between stages under laboratory conditions

	<i>V. aestuarianus</i>				
	Spat 1	Spat 2	Juvenile 1	Juvenile 2	Adult
OsHV-1					
Spat 1	0.09 ± 0.51	0.63 ± 0.36	0.06 ± 0.42	0.57 ± 0.3	0.53 ± 0.45
Spat 2	0.20 ± 0.56	0.55 ± 0.43	-0.30 ± 0.46	0.10 ± 0.37	0.47 ± 0.42
Juvenile 1	1.03 ± 0.94	0.24 ± 0.43	0.14 ± 0.41	0.18 ± 0.36	0.41 ± 0.41
Juvenile 2	0.59 ± 0.70	-0.18 ± 0.44	0.02 ± 0.46	-0.02 ± 0.39	-0.01 ± 0.45
Adult	0.75 ± 0.69	0.44 ± 0.52	-0.40 ± 0.47	0.20 ± 0.42	0.42 ± 0.46

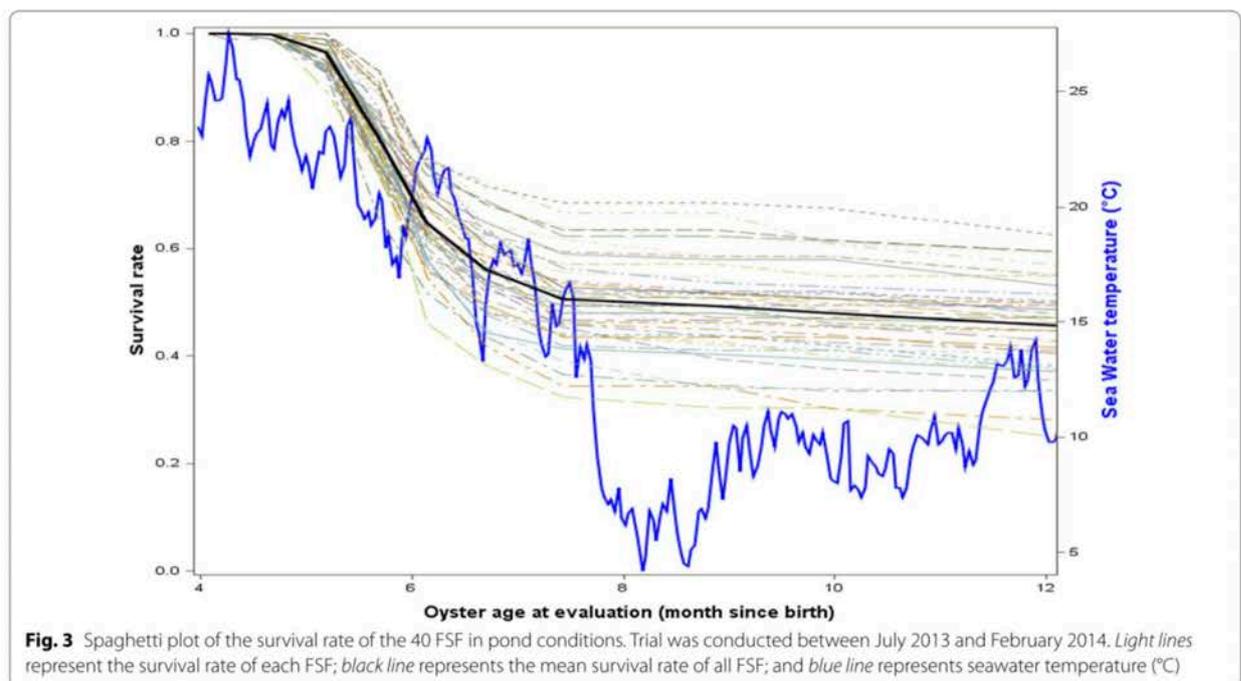
Spat, oyster <2 cm/<5 g; Juvenile, oyster 2–5 cm/5–20 g; Adult, oyster >5 cm/>20 g

Table 5 Narrow sense heritability (in italics) and genetic correlations for survival between experimental infection challenges and field or raceway trials

	Stage	Field	Raceway	Experimental infection by <i>V. aestuarianus</i>				
		Spat	Juvenile	Spat 1	Spat 2	Juvenile 1	Juvenile 2	Adult
Field	Spat	2.15 ± 0.43*	0.23 ± 0.33	0.41 ± 0.50	0.26 ± 0.35	-0.19 ± 0.39	0.19 ± 0.32	0.59 ± 0.32
Raceway	Juvenile	0.23 ± 0.33	0.22 ± 0.13	0.40 ± 0.57	0.47 ± 0.40	0.69 ± 0.27*	0.84 ± 0.24*	0.40 ± 0.44
Experimental infection by OsHV-1	Spat 1	0.88 ± 0.12*	0.35 ± 0.33					
	Spat 2	1.05 ± 0.07*	-0.06 ± 0.41					
	Juvenile 1	0.97 ± 0.09*	0.06 ± 0.39			See Table 4		
	Juvenile 2	0.77 ± 0.18*	-0.21 ± 0.43					
	Adult	0.78 ± 0.15*	0.02 ± 0.42					

Spat, oyster <2 cm/<5 g; Juvenile, oyster 2–5 cm/5–20 g; Adult, oyster >5 cm/>20 g

* Significantly different from 0



was equal to 50.6 and 51.9% at days 146 and 179, respectively. The disease analyses performed on moribund oysters that were sampled during the mortality event demonstrated that neither OsHV-1 nor *V. aestuarianus* DNA was detected.

For juveniles tested in raceways, no mortality was recorded for the control throughout the experiment. For oysters that were temporally transferred into a pond during the 2 months before being tested in the raceways, no mortality was observed during winter (when the seawater temperature was below 13 °C). Onset of mortality occurred in April 2014 (Fig. 4), with mortality rates reaching 29, 9, and 10% in raceways 1, 2, and 3, respectively, and lasted 7 weeks. At the end of the experiment, mortality rates reached 92, 82, and 84% in raceways 1, 2, and 3, respectively, in May 2014. The narrow sense heritability of survival was equal to 0.22 ± 0.13 (Table 5). Large quantities of *V. aestuarianus* DNA were found (4.0×10^6 copies/mL for 25 ng of total DNA) in all analyzed samples regardless of when sampling took place, from April to May. In contrast, OsHV-1 DNA was detected in some moribund oysters in May but always at a low copy number ($<10^2$ copies/ μ L for 25 ng of total DNA) (Table 1).

Mortalities in field or raceways experiments and in controlled disease challenges were correlated when the same pathogen was detected

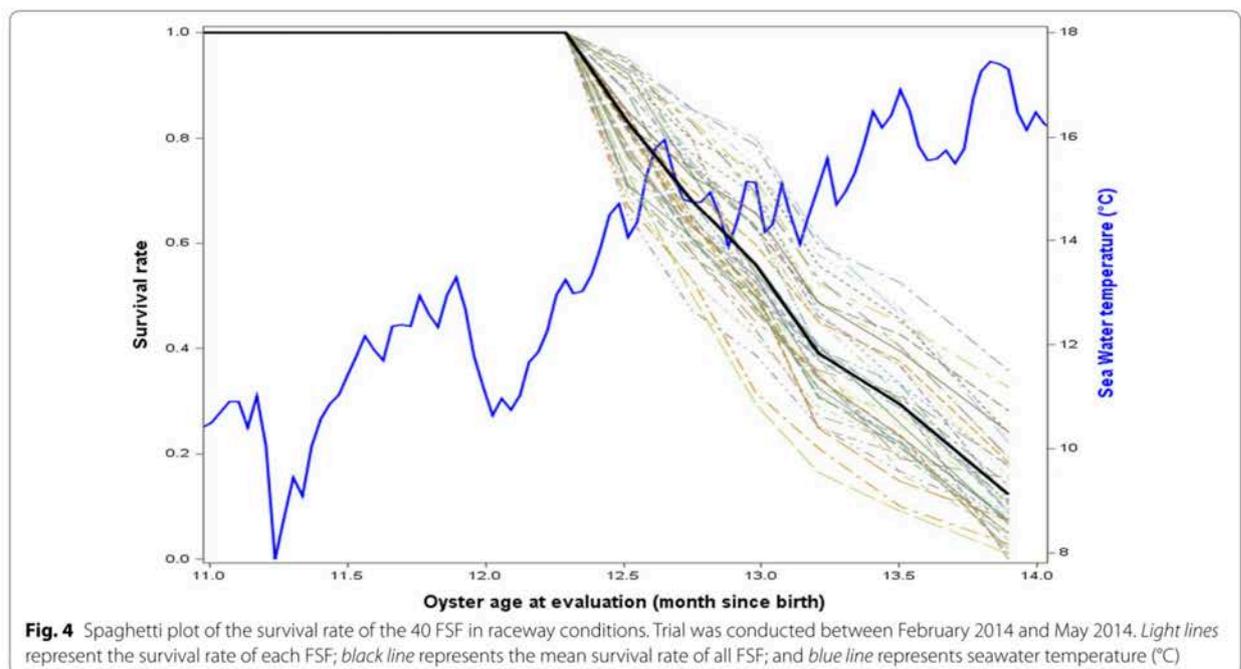
Interestingly, genetic correlation estimates for survival were all positive and high between oysters tested in the

field and oysters exposed to OsHV-1 under laboratory conditions, regardless of the life stage; they ranged from 0.77 to 1.05 (Table 5). To a lesser extent, genetic correlations were also high and positive between survival of juveniles in raceways and survival under *V. aestuarianus* challenges regardless of the life stage; they ranged from 0.40 to 0.84 (Table 5). Genetic correlations of 0.23 were found for survival between the field trial (OsHV-1 presence) and the raceway trial (*V. aestuarianus* presence) but they were not significant ($P > 0.05$) (Table 5).

Discussion

Our study reveals for the first time that resistance to *V. aestuarianus* in *C. gigas* has a genetic basis and it also provides estimated heritabilities for resistance to a second pathogen, OsHV-1, in an oyster species. The challenges with *V. aestuarianus* demonstrated that the susceptibility to this pathogen was low for oysters in spat stages but increased in later life stages. Genetic variance of resistance to *V. aestuarianus* infection increased with life stages with a low heritability in spat (0.09 to 0.11) and moderate heritability in juvenile and adult stages (0.16 to 0.33) (Table 2). Our data suggest that genetic evaluation of *V. aestuarianus* resistance should be conducted at the juvenile or adult stages because of the increased mortality rate and higher heritability in these life stages.

The favorable genetic correlations between the laboratory and raceway experiments at the juvenile stage could allow selection under controlled conditions (Table 5).



Furthermore, they suggest that the highly pathogenic strain (02/041) of *V. aestuarianus*, which was isolated during a mortality episode in adult oysters in 2002 [35] and used in our laboratory challenges, had a similar impact on FSF as the strain(s) of *V. aestuarianus* involved in the mortality observed in the raceways during the spring of 2014, which is consistent with the results reported in [47].

The second main result of our study is that resistance to OsHV-1 infection in spat, juveniles and adults has a strong genetic basis (Table 3). To date, narrow sense heritability estimates, ranging from 0.49 to 0.65, and realized heritability estimates, ranging from 0.34 to 0.63, for resistance to OsHV-1 infection were only available at the spat stage [48, 49]; these are in agreement with our results obtained from the OsHV-1 challenge under laboratory conditions. Among the FSF, a few displayed a high resistance to OsHV-1 infection, whereas a few displayed a high susceptibility to the disease regardless of the stage of development. Most of the FSF displayed increased resistance to OsHV-1 infection from the spat to adult stage, which highlights the importance of life stage for resistance to OsHV-1 infection in *C. gigas*. These results are supported by the high and positive genetic correlations between life stages (Table 3). According to the level of resistance, FSF are now characterized according to their level of resistance to OsHV-1 infection and can be used to further explore the physiological and immune mechanisms that underlie resistance to this infection.

Mortality occurring under the field conditions at Agnas was highly correlated with OsHV-1 infection under laboratory conditions (Table 5), which suggests that this pathogen has a major impact in the field and that the OsHV-1 challenge used in the laboratory effectively mimicked spat mortality events reported in the field. These results are consistent with those obtained for selected or unselected oysters infected with OsHV-1 [48, 50]. The estimated heritability for survival was higher than 1 when FSF were tested at Agnas (Table 5). This could be explained by (1) the high mortality rate (89%) among the FSF, which decreased the phenotypic variance and the precision of the estimation, and (2) the reduced number of sires and dams, which increased the probability of having an “inadmissible” estimated heritability higher than 1 [51].

The third main finding of our study was the lack of genetic correlations between resistance to OsHV-1 infection and resistance to *V. aestuarianus* infection (Table 4). Consequently, selection to improve resistance to OsHV-1 infection should neither increase nor decrease the resistance to *V. aestuarianus* infection. This also indicates that it would be possible to select for dual resistance in *C. gigas* as previously demonstrated with

Haplosporidium nelsoni and *Perkinsus marinus* in *C. virginica* [52] and *Bonamia roughleyi* and *Martelia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* [53], although these studies did not estimate the genetic correlations. Such findings were also obtained in several fish species with no genetic association between resistance to furunculosis and infectious salmon anemia (ISA) in *Salmo salar* [54] and between enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral hemorrhagic septicemia in *Oncorhynchus mykiss* [55]. Meanwhile, another larger study revealed a genetic association that was significantly different from 0 between furunculosis and ISA resistance [56]. Thus, our finding that there is no genetic correlation between resistance to OsHV-1 infection and resistance to *V. aestuarianus* infection, which was based on a small number of sire families, may result from a sampling error, rather than indicate the absence of genetic relationship between resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus*.

Even with 36,760 oysters tested in the ten experiments under laboratory conditions and in the field, pond, and raceway conditions, the sample size used to estimate genetic parameters was relatively small, with only 20 HSF. Thus, the estimated heritabilities and genetic correlations may not be sufficiently accurate and should be taken with caution. Unfortunately, we could not increase the number of families because they were separated throughout the experiment. Consequently, our design was constrained due to a limited amount of available space for (1) larval production, (2) growing facilities to avoid mortality related to OsHV-1 and *V. aestuarianus* until genetic evaluation, in particular, until the adult stage, and more importantly, (3) running the experimental infections in the quarantine room from which no effluent returns into the sea. It would have been possible to increase the number of families by mixing the families at the fertilization step or the larval stage and then use parentage assignments as demonstrated for growth-related traits in *C. gigas* [21] and in *Mytilus galloprovincialis* [57]. However, the genetic evaluation of families is valid only if it is conducted in laboratory conditions and as long as all oysters, dead and surviving, within a challenge are sampled for pedigree assignments. Otherwise, the genetic variance for disease resistance would be confounded with the variance in reproductive success, which is high in *C. gigas* [58].

To avoid bias in the genetic evaluation of disease resistance, it is important to use disease-free oysters. For disease exposure under laboratory conditions, we used a cohabitation protocol between the FSF and oysters considered as non-infected and injected the infectious suspension into the adductor muscle. This protocol was assumed to be reproducible from spat to adult stages. Although injection protocols have been used for

numerous studies with OsHV-1 and *V. aestuarianus* with demonstrated reproducibility [36, 38, 59, 60], these have only been used on a limited number of oysters for practical reasons. Studies have also demonstrated that the injection of *V. aestuarianus* induces high mortality rates, in particular when using strain 02/041 [34, 47, 59], and thus it is not adapted to genetic studies, since the variances of the resulting survival rates are then too low. Finally, this protocol is more biologically relevant because it better mimics a natural infection when compared to injection protocols that first impair oyster immune defenses.

Experimental challenges in the laboratory were complemented with deployments of the 40 FSF in three environments that are commonly used by oyster farmers: the field where oyster farms are located, raceways where oyster farmers stock their oysters several times during the growing phase, and ponds, which are mostly used in the Marennes-Oléron Bay and Pertuis Charentais sounds. In the field conditions, spat mortality reached 89% in 15 days and was associated with the detection of a large number of OsHV-1 DNA copies. In the raceway conditions, juvenile mortality reached 86% in 42 days and was also associated with the detection of a large number of *V. aestuarianus* DNA copies. Finally, spat deployed into the pond in July 2013 exhibited 50% mortality before winter (i.e. after 179 days), ranging from 31.4 to 69.5% among the FSF. Interestingly, the analyses on moribund oysters sampled during this last event did not reveal the presence of OsHV-1 DNA or *V. aestuarianus* DNA, and thus the causal factors of this mortality remain unknown. Ponds are commonly used by oyster producers to rear adults at low densities (5/m²) but not for spat. They may present unfavorable environmental conditions for spat, although they are assumed to limit the mortality rate due to OsHV-1 infection in *C. gigas* spat during the spring and summer [61]. Our results demonstrated that mortality can occur even if OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA are not detected, which suggests diverse causes of mortality and that other pathogenic agents may impact oyster survival under particular environmental conditions [62].

However, mortality related to *V. aestuarianus* was observed in the raceway experiment and it is likely that oysters were infected in the pond between December 2013 and February 2014. This hypothesis is not consistent with the absence of contamination of the oysters tested from the pond conditions. Such observations led us to consider the ecological niches of this bacterium and transmission mechanisms, as well as conditions that can control disease expression. While potential infection or transmission in the absence of disease expression has been demonstrated for OsHV-1 at low temperatures [63–65], it remains to be investigated for *V. aestuarianus*.

In our study, cross contamination was observed for four of the ten experiments conducted in the laboratory, which may have occurred through the seawater (Table 1). Indeed, filtration and UV-treated seawater probably removed or degraded most of the bacterial and viral particles, and the DNA that was detected was likely inactive or degraded. The absence of mortality in control tanks supported this statement, as well as the high genetic correlations for resistance to OsHV-1 between life stages (Table 3) and for resistance to *V. aestuarianus* between juvenile and adult stages (Table 2). The small number of viral DNA copies that were detected in some oysters during the bacterial challenge for Juvenile 2 and Adult could be explained by the coincidence of both experiments with the peak of mortality caused by OsHV-1, which occurs in May/June each year in the Marennes-Oléron Bay, where our facilities are located. This also supports the absence of viral DNA detected in oysters in the raceway conditions from February to April 2014, while a few copies of OsHV-1 DNA were found in some oysters in May 2014 (Table 1). Similarly, small to moderate copy numbers of *V. aestuarianus* DNA were found in some oysters during the OsHV-1 challenge for Juvenile 1 and Juvenile 2 (Table 1) during a period for which cases of mortality are regularly reported in the area. Finally, it was recently demonstrated that dual infections by OsHV-1 and *V. aestuarianus* led to very high mortality rates, even for oyster lines that were selected for higher resistance to OsHV-1 [66]. No such finding was observed in our study, which suggests that the estimated heritabilities and genetic correlations were for the pathogen tested.

Conclusions

Our findings demonstrate that: (1) susceptibility to OsHV-1 infection decreased with age and growth, while susceptibility to *V. aestuarianus* infection increased according to the same factors; (2) genetic variances were high for resistance to OsHV-1 infection and low for resistance to *V. aestuarianus* infection; (3) genetic correlations between resistance to OsHV-1 infection and resistance to *V. aestuarianus* infection were not significantly different from 0; and (4) uncontrolled disease exposure and disease challenge under laboratory conditions presented significant positive genetic correlations when the same pathogenic agent was detected. Selective breeding to enhance the resistance to OsHV-1 infection could be achieved by selecting the highly resistant families at early stages without modifying the resistance to *V. aestuarianus* infection. Selection for dual resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections in *C. gigas* may be possible to reduce the impact of these two major diseases by selecting oysters that have the highest breeding values for resistance to both diseases.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Correlations between SAS and ASReml heritability estimates for survival in *C. gigas* when exposed to OsHV-1 or *V. aestuarianus* under controlled laboratory conditions in Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2 and Adult. Black squares represent *V. aestuarianus* challenge and black diamonds represent OsHV-1 challenge. The data showed the heritabilities for survival estimated from either SAS or ASReml for each pathogen at each of the five experiments under controlled laboratory conditions: Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2 and Adult.

Additional file 2: Table S1. Variance components and narrow sense heritability for survival in *C. gigas* for each *V. aestuarianus* challenge under laboratory conditions (\pm SE). The data provided represent the variance components (sire, dam and phenotypic) and the narrow sense heritability for survival in *C. gigas* when exposed to *V. aestuarianus* under controlled laboratory conditions for each of the five experiments: Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2 and Adult.

Additional file 3: Table S2. Variance components and narrow sense heritability for survival in *C. gigas* for each OsHV-1 challenge under laboratory conditions (\pm SE). The data provided represent the variance components (sire, dam and phenotypic) and the narrow sense heritability for survival in *C. gigas* when exposed to OsHV-1 under controlled laboratory conditions for each of the five experiments: Spat 1, Spat 2, Juvenile 1, Juvenile 2 and Adult.

Authors' contributions

PA, MAT and LD conceived and designed the experiments. PA, MAT and LD performed the experiments. PA, JBL and LD analyzed the data. PA, JBL, MAT, TR, PB and LD wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Ifremer, avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. ²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 LEMAR (UBO/CNRS/IRD/Ifremer), Centre de Bretagne, Ifremer, CS 10070, 29280 Plouzané, France. ³Département Ressources Biologique et Environnement, Ifremer, Rue de l'Île d'Yeu, 44300 Nantes, France.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Marie Villa for her help with experimental infections at the juvenile stage. We wish to express our gratitude to Elise Mauouard, Stéphane Bodin, and Aurelien Brun for technical support regarding oyster maintenance, to Nicole Faury for providing the viral suspension for all OsHV-1 challenges and to Philippe Haffner for preparation of the experimental room. Oyster used in this work were produced and maintained under controlled conditions at the technical facilities of the nursery of the Laboratory of Genetics and Pathology of Marine Molluscs of Ifremer Bouin and of Ifremer La Tremblade. We are very grateful to the nursery and genetic teams for assistance in oyster production and to the pathology team for technical support for mortality monitoring. This study was supported by Ifremer through the research activity "Amélioration par la sélection" and by the French Ministries of Ecology and Agriculture throughout the research activity "AESTU".

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 16 January 2016 Accepted: 8 February 2017

Published online: 15 February 2017

References

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FishStatJ—software for fishery statistical time series. 2014. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. Accessed 14 Dec 2016.

2. Martin AG, Gérard A, Cochennec N, Langlade A. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. In: Proceedings of the international conference bordeaux aquaculture '92. Bordeaux; 1993.
3. Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, Gérard A. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1998;226:279–91.
4. Comps M, Duthoit JL. Virus infection associated with 'gill disease' of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* Lmk. *C R Acad Sci*. 1976;283:1595–6.
5. Grizel H, Héral M. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES J Mar Sci*. 1991;47:399–403.
6. Garcia C, Thébaud A, Dégremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, et al. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet Res*. 2011;42:73.
7. Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cuffe A, Gelebart F, Cordevant C, et al. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ*. 2001;46:139–45.
8. Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res*. 2010;153:92–9.
9. Martenot C, Fourour S, Oden E, Jouaux A, Travaillé E, Malas JP, et al. Detection of the OsHV-1 μ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture*. 2012;338:293–6.
10. Pépin JF, Soletchnik P, Robert S. Mortalités massives de l'Huitre creuse. Synthèse—Rapport final des études menées sur les mortalités de naissains d'huitres creuses *C. gigas* sur le littoral charentais pour la période de 2007 à 2012. 2014. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00217/3285/> Accessed 14 Dec 2016.
11. François C. Bilan 2014 du réseau Repamo—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. 2015. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00256/36691/35303.pdf>. Accessed 14 Dec 2016.
12. François C, Joly JP, Garcia C, Lupo C, Travers MA, Pépin JF, et al. Bilan 2012 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. 2013. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00143/25470/23625.pdf>. Accessed 14 Dec 2016.
13. François C, Joly JP, Garcia C, Lupo C, Travers MA, Tourbiez D, et al. Bilan 2013 du réseau Repamo—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. 2014. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00197/30798/29167.pdf>. Accessed 14 Dec 2016.
14. Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect*. 2006;8:2715–24.
15. Normand J, Blin JL, Jouaux A. Rearing practices identified as risk factors for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection in Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Dis Aquat Organ*. 2014;110:201–11.
16. Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000;125:359–69.
17. Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, et al. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact*. 2012;2:215–37.
18. Boudry P. 3-Genetic variation and selective breeding in hatchery-propagated molluscan shellfish. In: Burnell G, Allan G, editors. *New technologies in aquaculture*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2009. p. 87–108.
19. Dégremont L, Garcia C, Allen SK Jr. Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review. *J Invertebr Pathol*. 2015;131:226–41.
20. Wang Q, Li Q, Kong L, Yu R. Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J Ocean Univ China*. 2012;11:413–8.
21. Kong N, Li Q, Yu H, Kong LF. Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree. *Aquac Res*. 2015;46:499–508.

22. Li Q, Wang Q, Liu S, Kong L. Selection response and realized heritability for growth in three stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Sci*. 2011;77:643–8.
23. Jiang Q, Li Q, Yu H, Kong LF. Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes Genomics*. 2013;35:641–7.
24. Langdon C, Evans F, Jacobson D, Blouin M. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture*. 2003;220:227–44.
25. Evans S, Camara MD, Langdon CJ. Heritability of shell pigmentation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 2009;286:211–6.
26. Clegg TA, Morrissey T, Geoghegan F, Martin SW, Lyons K, Ashe S, et al. Risk factors associated with increased mortality of farmed Pacific oysters in Ireland during 2011. *Prev Vet Med*. 2014;113:257–67.
27. Paul-Pont I, Evans O, Dhand NK, Rubio A, Coad P, Whittington RJ. Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture*. 2014;422:146–59.
28. Dégremont L. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*. 2011;317:94–8.
29. Segarra A, Baillon L, Tourbiez D, Benabdelmouna A, Faury N, Bourgougnon N, et al. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet Res*. 2014;45:103.
30. Whittington RJ, Dhand NK, Evans O, Paul-Pont I. Further observations on the influence of husbandry practices on OsHV-1 μ Var mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: age, cultivation structures and growing height. *Aquaculture*. 2015;438:82–97.
31. Dégremont L. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 2013;416–417:129–34.
32. Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact*. 2015;6:205–22.
33. De Decker S. A study of the *Vibrio* pathogens virulence in relation to the variability of the oyster's response. In: Workshop of the University of Poitiers. Poitiers; 2007.
34. Azéma P, Travers MA, De Lorigeril J, Tourbiez D, Dégremont L. 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. *Vet Res*. 2015;46:139.
35. Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb Ecol*. 2010;59:787–98.
36. Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin JF. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res*. 2011;42:27.
37. Suquet M, de Kermoyan G, Araya RG, Queau I, Lebrun L, Le Souchu P, et al. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour*. 2009;22:29–34.
38. Schikorski D, Faury N, Pépin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res*. 2011;155:28–34.
39. De Decker S, Saulnier D. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol*. 2011;30:691–9.
40. Webb SC, Fidler A, Renault T. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*. 2007;272:126–39.
41. Saulnier D, De Decker S, Haffner P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods*. 2009;77:191–7.
42. Ødegård J, Baranski M, Gjerde B, Gjedrem T. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquac Res*. 2011;42:103–14.
43. SAS Institute Inc. SAS/STAT® 12.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2012. <https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/stat/121/glimmix.pdf>.
44. Gilmour AR, Gogel BJ, Cullis BR, Welham SJ, Thompson R. ASReml user guide release 4.1 structural specification. Hemel Hempstead: VSN International; 2015.
45. Lynch M, Walsh B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 1998.
46. Gilmour AR, Anderson RD, Rae AL. The analysis of binomial data by a generalized linear mixed model. *Biometrika*. 1985;72:593–9.
47. Goudenège D, Travers MA, Lemiire A, Petton B, Haffner P, Labreuche Y, et al. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ Microbiol*. 2015;17:4189–99.
48. Dégremont L, Lamy JB, Pépin JF, Travers MA, Renault T. New insight for the genetic evaluation of resistance to ostreid herpesvirus infection, a worldwide Disease, in *Crassostrea gigas*. *PLoS One*. 2015;10:e0127917.
49. Dégremont L, Nourry M, Mauroard E. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture*. 2015;446:111–21.
50. Dégremont L, Soletchnik P, Boudry P. Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions and in comparison with field performance. *J Shellfish Res*. 2010;29:847–56.
51. Prabhakaran VT, Jain JP. Probability of inadmissible estimates of heritability from regression and half-sib analyses. *Biomet J*. 1987;29:219–30.
52. Ragone Calvo LMR, Calvo GW, Burrenson EM. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture*. 2003;220:69–87.
53. Dove MC, Nell JA, O'Connor WA. Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). *Aquacult Res*. 2013;44:1791–800.
54. Gjerde B, Evensen Ø, Bentsen HB, Storset A. Genetic (co)variation of vaccine injuries and innate resistance to furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) and infectious salmon anaemia (ISA) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2009;287:52–8.
55. Henryon M, Berg P, Olesen NJ, Kjær TE, Slierendrecht WJ, Jokumsen A, et al. Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*. 2005;250:621–36.
56. Ødegård J, Olesen I, Gjerde B, Klemetsdal G. Positive genetic correlation between resistance to bacterial (furunculosis) and viral (infectious salmon anaemia) diseases in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2007;271:173–7.
57. Nguyen TTT, Hayes BJ, Ingram BA. Genetic parameters and response to selection in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using a SNP-based pedigree. *Aquaculture*. 2014;420–421:295–301.
58. Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*. 2002;204:283–96.
59. Meng J, Zhang L, Huang B, Li L, Zhang G. Comparative analysis of oyster (*Crassostrea gigas*) immune responses under challenge by different *Vibrio* strains and conditions. *Molluscan Res*. 2015;35:1–11.
60. Paul-Pont I, Evans O, Dhand NK, Whittington RJ. Experimental infections of Pacific oyster *Crassostrea gigas* using the Australian ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) μ Var strain. *Dis Aquat Organ*. 2015;113:137–47.
61. Dégremont L, Benabdelmouna A. Mortality associated with OsHV-1 in spat *Crassostrea gigas*: role of wild-caught spat in the horizontal transmission of the disease. *Aquac Int*. 2014;22:1767–81.
62. Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol*. 2015;6:686.
63. Pernet F, Tamayo D, Petton B. Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture*. 2015;445:57–62.
64. Renault T, Bouquet AL, Maurice JT, Lupo C, Blachier P. Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat: relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:5419–26.

II.3 Deuxième chapitre :

Influence de la taille et du placement sur estran sur l'identification de familles d'huîtres du Pacifique, *Crassostrea gigas*, résistantes ou sensibles à l'infection par OsHV-1 μ var.

Les résultats de ce travail ont été publiés dans la revue Aquaculture : « The use of size and growing height to improve Crassostrea gigas farming and breeding techniques against OsHV-1 » [188].

Le contexte de l'étude est présenté ci-dessous et une synthèse des principaux résultats est présentée en conclusion du présent chapitre.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'impact de certaines pratiques d'élevage sur la sensibilité du naissain de *C. gigas* aux épisodes de mortalité observées sur estran et impliquant OsHV-1. Ces pratiques impliquent notamment du naissain d'écloserie et la taille ou le poids des naissains mis en élevage.

L'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, est sensible à l'infection par OsHV-1 à tous les stades de son développement : les larves, le naissain, les juvéniles et les adultes. Plusieurs études ont montré que sur le terrain les mortalités affectent moins les animaux adultes, en comparaison avec les autres groupes d'âge [63]. Le stade développement est un facteur de résistance mais cela peut également refléter le fait que les huîtres ayant survécu à des mortalités au stade naissain acquièrent par sélection une certaine résistance. En conditions expérimentales, dans l'article présenté dans la première partie du présent chapitre, il a été montré que la sensibilité de *C. gigas* à l'infection par OsHV-1 diminuait avec l'âge mais également avec le poids des animaux mais une relation forte entre l'âge et le poids des animaux ne pouvaient distinguer les deux facteurs.

En conditions naturelles, plusieurs études ont évalué l'influence de l'âge et de la taille sur le niveau de résistance des huîtres à une infection virale. Entre 2009 et 2012, une expérience mettant en œuvre différentes mises sur estran, d'animaux de différents âges et de différentes tailles, a montré que la résistance aux mortalités causées par OsHV-1 augmentait également avec l'âge et la taille des animaux. La relation entre mortalité et taille des animaux semblait toutefois être plus forte [189]. Petton et al. ont testé l'effet de l'âge et/ou de la taille sur la sensibilité aux maladies rencontrées sur le terrain et ont montré que le risque de mortalité décroît avec l'âge quand les animaux sont mis sur le terrain pendant un épisode de mortalité, vraisemblablement, dû à OsHV-1 [190]. Enfin, une étude menée en Australie lors d'épisodes de mortalité importante impliquent un variant μ var d'OsHV-1 rapporte que l'âge serait plus déterminant par rapport à la taille [153].

Les animaux utilisés dans ces différentes études provenaient de lots dont le fond génétique n'avait pas été caractérisé. Or la variance phénotypique de la résistance aux infections par OsHV-1 est fortement influencée par la variance génotypique et un échantillonnage insuffisant des reproducteurs pourrait masquer la relation entre l'âge, la taille et la résistance à OsHV-1.

Aussi, afin de déterminer l'impact de l'âge, de la tailles ou du poids sur la résistance aux infections par OsHV-1, nous avons utilisé les huîtres provenant des 40 familles biparentales déjà caractérisées dans la première partie de ce chapitre et nous les avons déployées sur estran, au même âge mais en ayant préalablement constitués deux lots de taille et de poids différents.

Dans une seconde expérimentation, des animaux échantillonnés parmi les 40 mêmes familles biparentales ont été placés sur estran au stade naissain pendant la saison estivale à trois hauteurs de mises en place différentes. Ces hauteurs correspondent à des coefficients de marée de 40, 70 et 100. Quatre poches contenant 25 animaux de chaque famille ont été placés à ces trois hauteurs différentes. Nous avons pris comme hypothèse que chaque famille dans chaque poche avait la même probabilité d'être infectée en s'appuyant sur une étude précédente mettant en œuvre différentes familles déployées selon plusieurs méthodes différentes. Dans une étude menée en Australie, en plaçant les animaux à une plus grande hauteur, des huîtres adultes avaient été protégées des mortalités par rapport à des huîtres placées plus bas sur estran [58, 191]. Ces observations peuvent être particulièrement intéressantes pour les ostréiculteurs, leur permettant d'adapter leurs pratiques pour limiter les mortalités dues à l'infection par OsHV-1, en l'absence de lots sélectionnés mis à leur disposition, dans la mesure où le déploiement d'animaux plus gros ou plus âgés peut être une stratégie pour limiter les mortalités sur estran lorsque la température dépasse 16°C.



The use of size and growing height to improve *Crassostrea gigas* farming and breeding techniques against OsHV-1



Patrick Azéma, Elise Maurouard, Jean-Baptiste Lamy, Lionel Dégremont *

Ifremer, RBE-SG2M-LGPMM, La Tremblade, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2016

Received in revised form 6 January 2017

Accepted 10 January 2017

Available online 13 January 2017

Keywords:

Mortality

Crassostrea gigas

Size

OsHV-1

Growing height

ABSTRACT

Mortality associated with ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) has significantly impacted *Crassostrea gigas* farmers all around the world. Although selective breeding programs to improve OsHV-1 resistance can significantly reduce the mortality rate below 20%, husbandry practices have also been one way to limit or decrease mortality. The main objectives of this study were to describe the influence of two husbandry practices on OsHV-1-induced mortality in *C. gigas* spat and how different family lines respond to husbandry practices to gain a better understanding of the potential benefits of breeding management as a tool to adapt to improved practices. The first analysis investigated the importance of the size of *C. gigas* when challenged with OsHV-1 for the first time. For each of the 40 families of *C. gigas* evaluated, small (S) and large (L) oyster groups were tested for two years in the field. A significant mortality outbreak associated with OsHV-1 occurred during the first spring. At the end of the trial, the mean cumulative mortality of the L group (54.1%) was significantly lower than the mean cumulative mortality of the S group (74.8%), indicating the importance of size in OsHV-1-associated mortality. However, the overall effect of size was not consistent for all families: in 11 of the 40 families tested, there appeared to be no difference in mortality between the S and L groups. Observations at the family level allowed the identification of a large range of susceptibility to OsHV-1 regardless of the size group, with highly resistant families (<32%) and highly susceptible families (>80%). The second investigation compared different growing heights. Each of the 40 families was grown at three heights (high Hi, medium Me, and low Lo) corresponding to mean emersion times of 25, 12 and 2%, respectively. After an OsHV-1-related mortality outbreak, the mean mortality among the families was 91.6%, 88.0% and 86.9% for the Lo, Me and Hi conditions, respectively. Growing height had no effect in 31 of the 40 families tested, and these families showed no potential for adaptation to improve growing height practices. Among them, 24 families showed extremely high mortality (>95%) and 2 families showed the lowest mortality (<40%). In contrast, nine families showed differences in mortality associated with growing heights. A tendency toward higher mortality was observed for oysters that emerged less, with 85% for Lo compared to 72% for Hi. A protective effect of a high growing height on spat oysters was confirmed. In both experiments, higher relative growth rates were associated with higher mortality by OsHV-1. Finally, we identified oyster families from the two husbandry practices that were resistant or susceptible to OsHV-1 infection regardless of their size, growing height and age. Finally, a moderate heritability of mortality, ranging from 0.44 to 0.49, was determined from the size investigation.

Statement of relevance

Husbandry practices can decrease OsHV-1 mortality in *C. gigas*, but it depends on the genetic resistance of the oyster stocks used.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ostreid herpesvirus 1 OsHV-1 causes severe mortality outbreaks in *Crassostrea gigas* in many countries where *C. gigas* is cultivated, including in Europe (Domeneghetti et al., 2014; Lynch et al., 2012; Peeler et al., 2012; Roque et al., 2012), the USA (Burge et al., 2006), New Zealand (Keeling et al., 2014), and Australia (Jenkins et al., 2013;

Paul-Pont et al., 2014). A new pattern of mass mortality in *C. gigas* has been observed in European countries since 2008 (EFSA, 2015). This finding is particularly evident in France, where massive mortality events in young *C. gigas* have become more regular and widespread. These have been ascribed to a particular genotype of the ostreid herpesvirus 1, OsHV-1, called μ Var (Segarra et al., 2010). Although herpes-like virus was detected in *C. gigas* larvae as early as 1991 (Nicolas et al., 1992) and regularly between 1998 and 2002 (Garcia et al., 2011), the exact cause of the increased mortality remains unknown. Moreover, significant mortality associated with the detection of *Vibrio aestuarianus*

* Corresponding author.

E-mail address: lionel.degremont@ifremer.fr (L. Dégremont).

has been observed in market-sized adults since 2012 (Azéma et al., 2015c).

C. gigas is susceptible to OsHV-1 in all stages of development, including larvae (Dégremont et al., 2016; Le Deuff et al., 1994), spat (Garcia et al., 2011; Pernet et al., 2012), juveniles (Azéma et al., 2015c; Dégremont, 2013), and adults (Dégremont et al., 2013; Whittington et al., 2015). For the latter, it has been argued that mortality is significantly reduced in adults compared with the other age groups (Peeler et al., 2012). This result is partially explained by genetic resistance in the oysters that survive beyond the spat stage (Dégremont et al., 2010). Nevertheless, higher mortality rates are observed in younger individuals compared to adult oysters when using unselected naïve oysters (Paul-Pont et al., 2013a). This statement highlights the importance of the age and/or size of the oysters when challenged with OsHV-1 for the first time (Paul-Pont et al., 2014; Pernet et al., 2012; Petton et al., 2015).

To understand the role played by age and size on susceptibility to OsHV-1, three groups of naïve oysters were analyzed (control and selected for either resistance or susceptibility to OsHV-1) at ages varying from 3 to 20 months and sizes varying from 1 to 25 g (Dégremont, 2013). Both age and size were negatively correlated with the final cumulative mortality, but the relationship between mortality and size ($r = -0.87$) was stronger than the relationship between mortality and age ($r = -0.55$) (Dégremont, 2013). This finding was in agreement with a higher resistance of larger oysters to OsHV-1 at the time of the mortality event (Burge et al., 2007).

Recently, the hypothesis that links resistance to OsHV-1 infection and oyster size has been questioned by two studies. The first observed that the shell lengths of live and dead oysters were similar after an OsHV-1 outbreak, suggesting that there was no relationship between disease susceptibility and oyster size (Petton et al., 2015). The second study reported that age was found to be a significant determinant of mortality rate after allowing for variation in mortality due to size, but size was not significant after allowing for variation in age (Paul-Pont et al., 2014).

Nevertheless, phenotypic variance for OsHV-1 resistance is driven by a high and significant genetic variance (Dégremont et al., 2015b). Thus, genetic variation may impact the phenotypic responses, and a low sample size in terms of genetic background could blur the relationship between age/size and OsHV-1 resistance. Though a preliminary experiment testing three groups of oysters at different ages and the same size has been done (Dégremont, 2013), a better way to obtain additional insights would be to produce different germplasms and test them at the same age but at different sizes. This study used this genetic approach by testing two sizes from 40 bi-parental families at the same age.

In addition, a second experiment was performed to compare growing height among the same families. High growing height was recently identified to have a protective effect on adult oysters, which exhibited a lower cumulative mortality than those with a low growing height (Paul-Pont et al., 2013a; Whittington et al., 2015). Oyster farmers would be interested in these husbandry practices if they significantly limit OsHV-1-associated mortality.

The primary objective of this study was to stress genetic effects on the outcomes of husbandry practices on OsHV-1-induced mortality in *C. gigas* by testing 40 full-sib families. Our study aimed to provide valid practical solutions to limit or decrease the OsHV-1-induced mortality. It also contributed to the identification of resistant and susceptible families for OsHV-1-associated mortality, as well as a more accurate estimation of OsHV-1 resistance.

2. Materials and methods

2.1. Biological materials

In December 2012, wild *C. gigas* oysters were sampled on an oyster bed located in the estuary of the Seudre River (Marennes-Oleron Bay -

45°46'53.5" N, 1°7'19.5" W). It is likely that wild broodstock contained some individuals that were survivors of mortality related to OsHV-1. Nevertheless, oysters produced from mass spawns using wild oysters between 2008 and 2016 still exhibited high susceptibility to OsHV-1. The oysters were brought to the Ifremer facilities in La Tremblade and placed in 240-L conditioning tanks with a flow of 400 L h⁻¹. Seawater temperature was gradually increased to 21 °C for one week and enriched with a cultured phytoplankton diet ad libitum (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* and *Skeletonema costatum*) to favor gametogenesis. The oysters were maintained in these conditions until reproduction. In March 2013, the oysters were opened and sexed by microscopic observation of gonad samples spread on a slide. Only mature oysters were kept for mating, and the oysters were separated by sex. The gametes were individually collected by stripping the gonad from 20 males and 40 females. Eggs were sieved through a 60-µm mesh and retained on a 20-µm mesh screen to remove tissue debris. The sperm were sieved through a 60-µm mesh screen.

Fertilization was performed using a nested half-sib breeding scheme (called North Carolina I); each male was mated with 2 females, producing 20 half-sib families (HSF) that each contained 2 full-sib families (FSF). The 40 FSF were reared separately in 30-L tanks at 25 °C using UV-treated, filtered seawater (5 µm). The water was changed 3 times a week. Larvae were fed daily with *I. galbana* (30,000 cells/mL) until they reached 140 µm, and then the phytoplankton diet was supplemented with *S. costatum* (30,000 cells/mL).

Fourteen to 18 days after fertilization, the larvae from all families settled on cultch in 120-L raceways with UV-treated seawater heated to 21 °C. The size of the cultch (200–300 µm) was chosen so that one larva would settle per piece of cultch to produce a single spat. The seawater flow was 300 L h⁻¹ and was enriched with *S. costatum*. The families were always reared separately under standard hatchery conditions until they reached 2-mm size. Then, each family was grown in two sites, with 5000 oysters per family transferred to the Ifremer nursery in Bouin (Vendée, France) in May 2013 and 2000 oysters per family maintained in the hatchery facilities in La Tremblade. During these production steps, no mortality was recorded.

2.2. Experimental design for the size investigation

In May 2013, each family that was maintained at the Ifremer hatchery in La Tremblade was separated into two groups, one with 500 oysters and the other with 1500 oysters. In all families, each group was maintained in a separate tank with flow-through and UV-treated seawater enriched with *S. costatum*. To obtain two size groups per family with the same genetic characteristics, the only parameter distinguishing the two groups was the density. This protocol was chosen to prevent eventual effects of positive or negative genetic correlations between growth and mortality when subsequently selecting the largest and the smallest oysters from a unique group. In November 2013, 100 oysters per family were randomly sampled within the group of 500 oysters to produce the large size group (L) for each family. The total weight of the oysters was recorded, and they were placed in a bag. Similarly, 100 oysters per family were sampled within the group of 1500 oysters to produce the small size group (S). The mean individual weight among families was 0.43 g (SD 0.21) and 4.73 g (SD 1.65) for the S and L groups, respectively. Eighty bags from 40 families, each with L and S groups, were deployed in our oyster farms at Agnas in the Marennes-Oléron Bay (45°52'23"N, 1°10'15"W) on November 26th, 2013. In 2011, the ranking of 46 families for their susceptibility to OsHV-1 was similar among several culture methods (e.g., different densities or mixed or separated families), suggesting a similar probability for OsHV-1 infection in this site (Dégremont et al., 2015b). We assumed each of the 40 families tested in our study, regardless their size group, had the same probability of exposure to OsHV-1. The bags were randomly attached to racks. The site is characterized by a mixture of sand

and mud, and it is surrounded by numerous oyster leases. Emersion time at the site was 12%.

Every month, the oyster bags were checked, but mortality was not estimated until its onset. Then, mortality was recorded by counting the numbers of dead and live oysters in June, July, September and November 2014, as well as in May and October 2015. During counting, samples were taken from all moribund oysters in all families, with the exception of the peak mortality when only 30–31 oysters were sampled per size group. No moribund oysters were sampled from November 2014 to October 2015 due to the absence of a significant mortality event. The total weights of the live oysters were recorded in November 2014, May 2015 and October 2015. Finally, shell length and individual weight of the shells of 30 dead oysters were measured in June 2014 to confirm the difference in size between the L and S groups at 7 months post-seeding. This number was lower for families with low mortality. The seawater temperature was recorded every hour throughout the study using two ThermoTrack probes (Progesplus, 59780, Willems, France).

2.3. Experimental design for the growing height investigation

On July 26th, 2013, oysters raised at the Ifremer nursery in Bouin were three months old, and the average individual weight among all families was 2.29 g (SD 0.59). Average shell lengths of the families were not recorded but were estimated to be 28 mm according to our length/weight database for *C. gigas*. All families were seeded at Agnas, the same site as described above, at three growing heights: high (Hi), medium (Me) and low (Lo). The Hi, Me and Lo growing heights corresponded to mean emersion times of 25%, 12% and 2%, respectively. Four bags containing each of the 40 families with 25 spat per family were used at each growing height. Within each bag, the families were separated using soft mesh bags with a label indicating the family name. All bags were fixed on racks. In 2011, the ranking of 46 families for their susceptibility to OsHV-1 was similar among several culture methods (e.g., different densities or mixed or separated families), suggesting a similar probability for all of them to be infected by OsHV-1 in this site (Dégrement et al., 2015b). We assumed each of the families within each of the bags had the same probability of exposure to OsHV-1. Mortality was checked two weeks post-deployment and recorded 6 weeks post-deployment on September 6th, 2013. Twelve moribund oysters were sampled two weeks post-deployment, but only at the Me condition. Seawater temperature was recorded every hour using two ThermoTrack probes (Progesplus, 59780, Willems, France).

2.4. Detection of OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* DNA

Moribund oysters collected in both experiments were individually analyzed to detect the two main pathogens involved in *C. gigas* mortality in France since 2008: OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus*. Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle + gills) using the QIAgen (Hilden, Germany) QIAamp tissue mini kit and the automated QIAcube according to the manufacturer's protocol, as described in Schikorski et al. (2011). The total DNA concentration was measured on a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and adjusted to 5 ng/μl.

The OsHV-1 DNA was detected and quantified with the SYBR® green real-time PCR protocol described by Pépin et al. (2008) and adapted for use with DPFor/DPrev primers to target the OsHV-1 DNA polymerase sequence (ORF 100; DPF 5' ATT GAT GATGTG GAT AAT CTG TG 3' and DPR 5' GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGTTC 3'; (Pépin, 2013). The *V. aestuarianus* DNA was detected and quantified by real-time PCR according to the protocol described in Saulnier et al. (2009); DNAj-F 5' GTATGAAATTTAACTGACCCACAA3'; DNAj-R 5' CAATTCITTCGAACA ACCAC 3'; and DNAj probe 5' TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC). The real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s and 60 °C for 20 s.

Negative controls (without DNA) were included. The results were expressed as viral or bacterial DNA copy number per mg of oyster tissue.

2.5. Data analyses

2.5.1. Size investigations

All statistical analyses were conducted using SAS® 9.4 software.

To assess if the size of each individual has an impact on the rate of mortality events, we set up a randomized complete block design. Each family was considered as a block and size as the factor. Each individual is the smallest statistical unit that determines the total number of degrees of freedom.

The impact of size on mortality related to OsHV-1 was analyzed in November 2014 and in October 2015 with a binomial logistic regression equation using the GLIMMIX procedure and the following model:

$\text{Logit}(Y_{ijk}) = \mu + G_j + F_i + G_j \times F_i$ where Y_{ijk} is the probability that the k th oyster from the j th group (L or S) of the i th family (1 to 40) will die, and μ is the intercept; G_j is the size factor and declared as a fixed effect and F_i is a block effect (family). F_i and $G_j \times F_i$ are both random effects and their significance was determined by the likelihood ratio statistic, computed by calculating the difference between the -2 log-likelihood for the full model and for the reduced model.

For each family and at each size class (L and S), the individual weight was estimated as the total weight of live oysters divided by the number of live oysters. The difference in the mean individual weights (only one value per family) between the two size groups, L and S, was analyzed at seeding in November 2013 and in November 2014, June 2015 and October 2015 using the GLM procedure.

Daily specific growth (SGR) was calculated for each family according to the formula:

$\text{SGR} = (\ln Wt_1 - \ln Wt_0) / (t_1 - t_0)$ where Wt_1 is the individual weight in November 2014, and Wt_0 is the individual weight in November 2015 and $t_1 - t_0$ is the duration of the experiment between the two dates in days. The same calculation was done between November 2014 and June 2015, and between June 2015 and October 2015. SGR was then analyzed using the GLM procedure to test the size group effect.

Lengths and weights of the shells from dead oysters measured in June 2014 were analyzed using the GLM procedure by comparing the two size groups from each family.

2.5.2. Growing height investigation

To assess if the growing height of each individual has an impact on the rate of mortality events, we set up a split-plot experiment with a randomized complete block design. Growing height was considered as a whole plot factor, family as a subplot factor, and bags as a block effect. Each individual is the smallest statistical unit determining the total number of degrees of freedom.

Mortality was analyzed in September 2013 using the same procedure described above and the following model:

$\text{Logit}(Y_{ijkl}) = \mu + G_i + F_j + B_k(G_i) + G_i \times F_j$ where Y_{ijkl} is the probability that the l th oyster of the j th family (1 to 40) at the i th growing height (Lo, Me and Hi) in the k th bag will die; and μ is the intercept, G_i is the growing height factor, and F_j is family factor and B_k is a block effect (bag) nested within the growing height factor. Only the growing height was declared as fixed effect, the others were random. The bag effect was removed from the model because it was not significant.

Individual weights for each of the four replicates at the three growing heights was estimated as the total weight of live oysters divided by the number of live oysters. The difference in the mean individual weights between the three growing heights was analyzed on September 6th, 2013, using the GLM procedure with the individual weight at seeding as the covariable.

2.5.3. Genetic parameters

Cross sectional models are simple statistical procedures that can be defined to analyze disease resistance measured as a single record

(e.g., alive/dead) at a fixed point in time (Ødegård et al., 2011). Hence, the time of death is not taken into account.

For the size study (L and S groups), the mortality was approximately 50%, a value at which variances in the binary trait are maximized, given the best estimation of heritability (Ødegård et al., 2011). The data were analyzed with a generalized linear mixed model (GLMM) using the SAS GLIMMIX procedure with a logit link and the Laplace method to approximate the log likelihood (SAS, 2014). Males and females nested within males were the random factors, and the mean weight of the individual was considered as a fixed effect. Dominance was assumed to be negligible for separate estimation of the other causal components of variance. The GLMM estimators were provided in the underlying liability scale and the genetic parameters were directly computed. The SAS codes used are shown in the supplementary material in Dégrement et al. (2015b).

Narrow (h^2_n), broad (h^2_b) and combined heritabilities ($h^2_m + f$) for mortality were computed as follows (Falconer and Mackay, 1996):

$$h^2_n = Va/Vt = 4\sigma^2_m / (\sigma^2_m + \sigma^2_f + \sigma^2_e)$$

$$h^2_b = Vg/Vt = 4\sigma^2_f / (\sigma^2_m + \sigma^2_f + \sigma^2_e)$$

$h^2_m + f = 2 \times (\sigma^2_m + \sigma^2_f) / Vt$ where Va and Vg are the additive genetic variance and genetic variance, respectively, which were estimated as four times the variance among males (σ^2_m) and four times the variances among females (σ^2_f), Vt is the total phenotypic variance, and σ^2_e is $\pi^2/3$ for a logit link (Ødegård et al., 2007).

For the growing height investigations, the extreme mortality rate (mean 88.8%, median 97.0%) combined with a relatively low number of families (40) jeopardized the estimation of variance, and consequently, heritability was not calculated (Ødegård et al., 2011).

3. Results

3.1. Size investigation

3.1.1. Seawater temperature

In France, OsHV-1 becomes virulent at and above 16 °C. From November 2013 to October 2015, the seawater temperature at Agnas ranged from 4.7 °C in February 2015 to 22.6 °C in July 2014, as shown in Fig. 1. At deployment, the seawater temperature was below 10 °C, and it reached 16 °C temporarily on May 9th and May 16th. The seawater temperature stayed above 16 °C from May 27th, 2014 to November 11th, 2014 and from May 24th, 2015 to October 10th, 2015.

3.1.2. Mortality

No mortality was reported from November 2013 to April 2014. Some moribund oysters were observed on May 15th. A significant mortality outbreak was then observed on May 28th, and mortality reached 31.7% and 64.5% for the L and S groups, respectively, on June 12th,

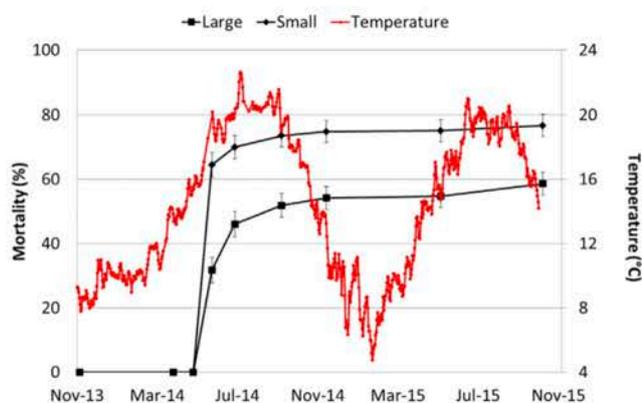


Fig. 1. Mean cumulative mortality (% ± SE) of the 40 families for the large and small groups and seawater temperature (°C) at Agnas from November 2013 to October 2015.

Table 1
Logit analysis of mortality for the size investigation in November 2014.

Source	NumDF	DenDF	Fvalue	Estimate	Standard error	P
Size	1	39	61.80			<0.0001
Family				1.09	0.30	<0.0001 ^a
Size × family				0.37	0.10	<0.0001 ^a

^a Effects are random. P value is from Log-likelihood ratio test by comparing the reduced and the full models.

2014 (Fig. 1). At the end of the first growing season in November 2014, the mean cumulated mortality among families reached 54.1% and 74.8% for the L and S groups, respectively. Mortality was lower than 1% during overwintering for both groups, and in October 2015 the final cumulative mortality was 58.6% and 76.7% for the L and S groups, respectively.

A significant interaction between family and size group was observed in November 2014 ($P < 0.0001$; Table 1), which is illustrated in Fig. 2. The mortality was significantly higher for the S group than the L group for 29 families ($P < 0.05$), whereas both the L and S groups from 11 families exhibited similar mortalities. Among those 11 families, 4 displayed low mortality (<32%) and 4 displayed high mortality (>80%), regardless of size. The same findings were observed in October 2015.

3.1.3. Size and growth

At deployment in November 2013, the mean individual weight of the L group (4.73 g) was significantly higher than the S group (0.43 g; $P < 0.0001$). This trend was consistent in November 2014, May 2015 and October 2015 (Fig. 3). At the end of the trial, the mean individual weight among the families was significantly higher in the L group (79.95 g) than in the S group (59.95 g; $P < 0.0001$).

SGR was highest between November 2013 and November 2014, with 0.012 and 0.006 $g \cdot d^{-1}$ on the ln scale for the S and L groups, respectively, and then decreased to 0.002 for both groups between

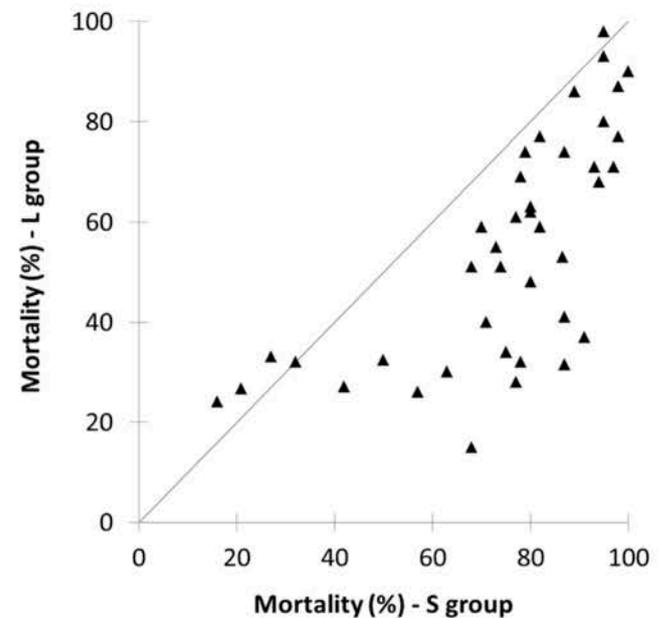


Fig. 2. Mortality (%) for the large (L) and small (S) groups from each family at Agnas in November 2014. Each family is represented by a triangle, and a triangle located above the diagonal indicates a higher mortality for the L group, whereas a triangle located below the diagonal indicates a higher mortality for the S group. For example, for the left-most triangle, the S group of the family had a mortality of 17%, but mortality was 22% for the L group from the same family.

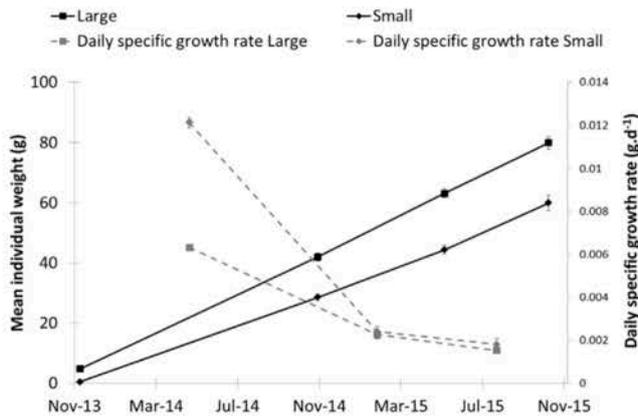


Fig. 3. Mean individual weights (g) and mean daily specific growth rate ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) of the large and small groups (\pm SE) at Agnas from November 2013 to October 2015. The daily specific growth rate values are ln-transformed.

November 2014 and May 2015 and between May 2015 and October 2015 (Fig. 3). There was a significant difference of SGR between the two groups only for the first period with a better growth for the S group ($P < 0.0001$).

During the peak of mortality, the mean shell lengths and weights of the dead oysters were 42.95 mm and 6.95 g for the L group and 34.87 mm and 1.93 g for the S group, respectively. For each family, the lengths and weights of the shells from the L group were always significantly higher than those of the S group ($0.0001 < P < 0.0094$; Fig. 4).

3.1.4. OsHV-1 and *V. aestuarianus* detection

For both the L and S groups, all moribund oysters sampled from May 2014 to September 2014 were positive for OsHV-1, with a high amount of viral DNA ($> 10^6$ copies per mg of fresh oyster tissue; Table 2). In contrast, *V. aestuarianus* was not detected in the L group in May 2014 during the main peak of mortality, whereas it was detected in 13% of the S

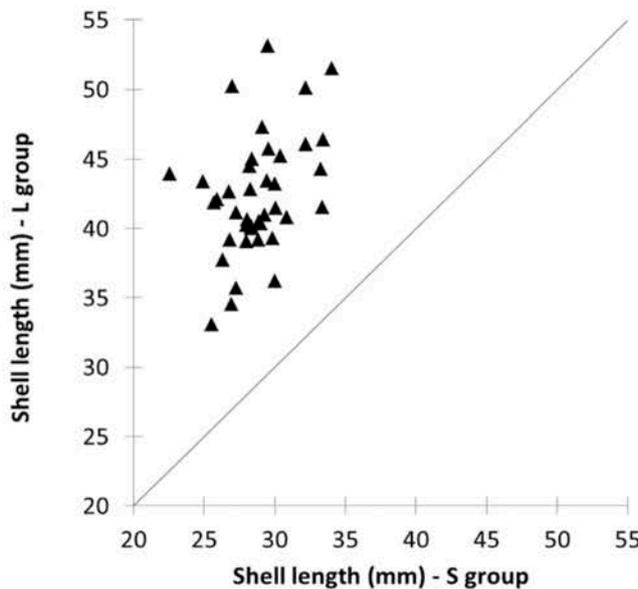


Fig. 4. Mean shell length (mm) of dead oysters from the large (L) and small (S) groups of each family at Agnas in June 2014. Each family is represented by a triangle, and a triangle located above the diagonal indicates that the dead oysters in the L group were larger than the S group for a given family. For example, for the left-most triangle, the S group of the family had an average shell length of 22.5 mm, but the average shell length was 44.9 mm for the L group from the same family.

group individuals. In June, July and September 2014, *V. aestuarianus* was detected in both groups, ranging from 20 to 44% in June and September, whereas it was detected in 71 and 100% of the L and S groups, respectively, in July. The amount of bacterial DNA was the lowest in June (10^{+4} copies per mg of fresh oyster tissue) and the highest in July (10^{+7} copies per mg of fresh oyster tissue; Table 2).

3.2. Growing height investigation

3.2.1. Seawater temperature

Seawater temperature averaged 20.6 °C and ranged from 19.1 °C to 22.3 °C during the six weeks of this trial.

3.2.2. Mortality

Fifteen days after seeding, a massive mortality outbreak was observed, with many moribund oysters at the Hi, Me and Lo growing heights. At the end of the trial on September 6th, 2013, the mean mortality among the 40 families was 91.6%, 88.0% and 86.9% for the Lo, Me and Hi conditions, respectively (Fig. 5). A significant interaction between family and growing height was observed ($P < 0.0001$; Table 3). At the family level, mortality was not significantly different among the growing conditions for 31 families, which were mostly the families that displayed extremely high mortality (24 families had mortality rates $> 95\%$) or families showing the lowest mortality (2 families had mortality rates $< 40\%$), regardless of growing height conditions. In contrast, significant differences in mortality among the growing conditions were observed for 9 families, with a tendency toward higher mortality for the Lo condition (85%) and lower mortality for Hi condition (72%; Fig. 6).

3.2.3. Growth

At seeding on July 26th, 2013, the mean individual weights of the oysters were 2.24, 2.28 and 2.35 g for Lo, Me and Hi groups, respectively. At the end of the trial on September 6th, 2013, the mean individual weight of the oysters was significantly different among the growing height conditions ($P < 0.0001$), with the lowest weight for Hi (4.88 g), intermediate weight for Me (6.30 g) and the highest weight for Lo (7.62 g).

3.2.4. OsHV-1 and *V. aestuarianus* detection

All oysters examined were positive for high concentrations of OsHV-1 DNA ($> 10^6$ copies of OsHV-1 DNA per mg of fresh oyster tissue), but none were positive for *V. aestuarianus*.

3.3. Genetic parameters for mortality

The variance components and heritabilities for the size investigation are presented in Table 4. Narrow-sense heritabilities were high for the L group (0.47 ± 0.22) and the S group (0.62 ± 0.32) in November 2014, as well as for both groups combined (0.45 ± 0.23). Similar values were obtained for broad sense and combined heritabilities in November 2014 and October 2015.

4. Discussion

The main objectives of this study were to further describe observations of the influence of husbandry practices on OsHV-1-induced mortality in *C. gigas* by testing 40 full-sib families. The use of 40 families subjected to various conditions to control the size of individuals and the growing height, instead of using one single group of oysters, allowed us to gain a better understanding of the complexity of mortality in field conditions. The two experiments also assessed the differences between genetically distinct batches of oysters, which could be used in future breeding to address OsHV-1 susceptibility.

Table 2

Detection and quantification (DNA copies per mg of fresh oyster tissue) of OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* DNA in moribund oysters of the large and small groups from May 2014 to September 2014 during the size investigation experiment.

Date	Size group	OsHV-1			<i>V. aestuarianus</i>		
		Positive/analyzed	Prevalence (%)	Quantification	Positive/analyzed	Prevalence (%)	Quantification
May 2014	Large	31/31	100	$1.9 \cdot 10^{+8}$	0/31	0	
	Small	30/30	100	$3.8 \cdot 10^{+8}$	4/30	13	$1.5 \cdot 10^{+6}$
June 2014	Large	5/5	100	$1.6 \cdot 10^{+8}$	1/5	20	$4.6 \cdot 10^{+4}$
	Small	4/4	100	$1.5 \cdot 10^{+8}$	1/4	25	$3.6 \cdot 10^{+4}$
July 2014	Large	7/7	100	$9.7 \cdot 10^{+7}$	5/7	71	$2.0 \cdot 10^{+7}$
	Small	4/4	100	$1.8 \cdot 10^{+6}$	4/4	100	$5.8 \cdot 10^{+7}$
September 2014	Large	5/5	100	$2.2 \cdot 10^{+7}$	1/5	20	$2.6 \cdot 10^{+5}$
	Small	9/9	100	$1.5 \cdot 10^{+7}$	4/9	44	$8.2 \cdot 10^{+5}$

4.1. Mortality and OsHV-1/*V. aestuarianus*

Two seedings were conducted in our study. The first was in July 2013 for the growing height investigation, and a massive mortality event occurred two weeks post-seeding and lasted for two weeks. The second seeding occurred in November 2013 for the size investigation, and the onset of the mortality outbreak occurred in May 2014 when the seawater temperature was approximately 16 °C and lasted for one month (Fig. 1). Such observations are common for OsHV-1-associated mortality under field conditions in France when the seawater temperature exceeds (as in the growing height investigation) or reaches 16 °C (as in the size investigation), as has been reported between 2009 and 2011 in Thau (Pernet et al., 2012), since 2009 in the Marennes-Oléron Bay (Dégremont, 2013; Dégremont et al., 2015a), or in 2011 in Brittany (Petton et al., 2015). The detection of a large amount of OsHV-1 DNA ($> 10^6$ copies per mg of fresh oyster tissue) for all moribund oysters strongly supports that OsHV-1 was one of the main causes of mortality (Table 2). Although *V. aestuarianus* was also detected during the size investigations (Table 2), its role was quite limited during the peak of the mortality in May 2014, as only 4 of 61 oysters were positive. Meanwhile, both pathogens, particularly OsHV-1, were detected in moribund oysters from June to September 2014, and both may have roles in the mortality observed during this period (Table 2). Usually, the detection frequency and quantity of OsHV-1 DNA decreases markedly after an OsHV-1-related mortality outbreak in live oysters (Dégremont, 2011; Paul-Pont et al., 2013a; Pernet et al., 2012). Nevertheless, in our study, even after a major OsHV-1-related mortality outbreak, some oysters still died. The detection of a high level of *V. aestuarianus* DNA in some oysters suggests the presence of a dual infection similar to that recently described by Azéma et al. (2016). Both pathogens could then interact and kill the oysters that survived the primary infection with OsHV-1.

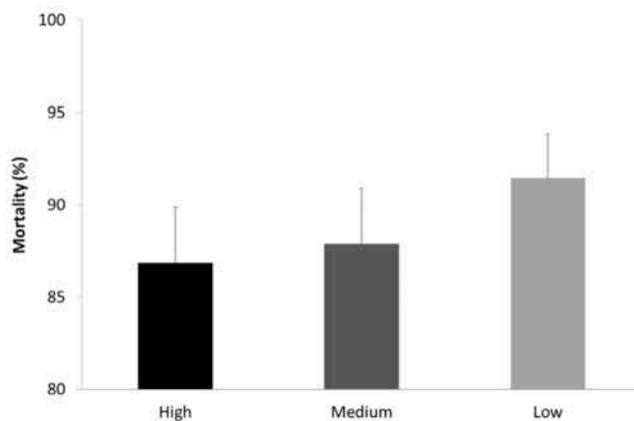


Fig. 5. Mean mortality (%) ± SE) of the 40 families tested at three growing heights six weeks after planting on September 6th 2013.

To our knowledge, this finding has not been reported in the literature, and requires further investigation.

4.2. Size investigation

Our study tested oysters of different sizes at the same age, which were 15 months old at the onset of the mortality outbreak. It was clear that oyster size is a significant factor to explain the intensity of mortality associated with OsHV-1 infections, which is in agreement with the studies by Burge et al. (2007) and Dégremont (2013). Most of the families had lower virus-associated mortality when oysters were larger (Fig. 2), indicating that large oysters are more resistant to OsHV-1 infection than small oysters at 15 months of age. This finding was also observed in *C. gigas* seed at Inner Tomales Bay in 2001, for which OsHV-1 was suspected as a possible cause of mortality (Burge et al., 2007). For this reason, oysters were seeded either in the autumn or the following spring, and the autumn cohorts outperformed those planted in the spring because they were a much larger size at the time of the mortality event (Burge et al., 2007). The protocol used in Burge et al. (2007) and our protocol generated the two size groups similarly by varying the environmental conditions (growing sites and density, respectively), but neither protocol created two size groups by selecting the largest and the smallest oysters within a single group. This last approach remains to be investigated, but it could have a major disadvantage in understanding the root cause of resistance due to a possible genetic correlation between mortality and growth.

Our results contrasted with other studies that did not observe a significant impact of size on OsHV-1-associated mortality. However, their conclusions were based on i) a small size range of oysters, ranging from 2 to >7 mm (Clegg et al., 2014); ii) a reduced sample size and narrow genetic background (6 transfers for one stock produced from 10 males and 20 females but without data on the mating design); and iii) the comparison of the shell lengths between live and dead oysters from a limited number of oyster stocks after the outbreak, without a true comparison of the mortality rates between two size groups within each stock (Petton et al., 2015).

A preliminary hypothesis to explain the higher susceptibility to OsHV-1 of the S group is that manipulation of oyster size by adjusting the density may have resulted in nutritional stress in the small-sized group due to a reduced food ration. Our design was chosen to avoid

Table 3

Logit analysis of mortality for the growing height investigation in September 2013.

Source	NumDF	DenDF	Fvalue	Estimate	Standard error	P
Growing height	2	351	11.14			<0.0001
Family				5.64	1.56	<0.0001 ^a
Family × growing height				0.19	0.07	<0.0001 ^a

^a Effects are random. P value is from Log-likelihood ratio test by comparing the reduced and the full models.

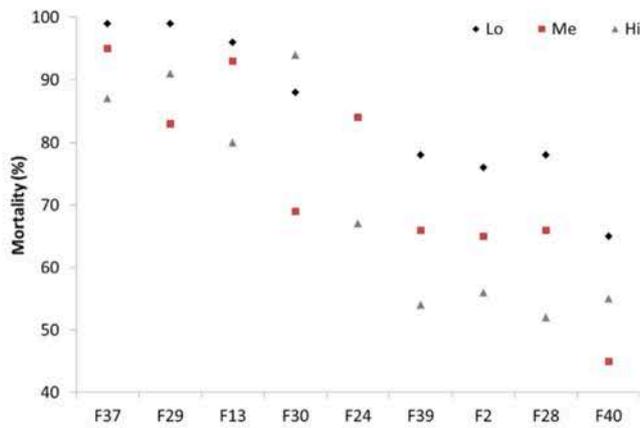


Fig. 6. Mortality (%) of the 9 families showing a significant difference in mortality among growing conditions.

possible genetic correlation between growth and resistance to OsHV-1, which would have been present if the largest and the smallest specimens from a unique stock were chosen. Moreover, it is likely that the smallest spat from a unique stock would also be under nutritional stress too. Although our experimental design tried to minimize potential nutritional stress by planting the oysters in the field 7 months before the onset of the OsHV-1-associated mortality, this stress could have increased the susceptibility of the oysters for the S group to virus infection. However, a recent study investigated the starvation effect on susceptibility to OsHV-1 for a resistant and a susceptible family, the same as used in our study. The preliminary results showed that starvation decreased susceptibility to OsHV-1, which could be explained if OsHV-1 could not rely on host cell replication machinery.

We also posit the hypothesis that S oysters had a higher growth rate than the L oysters, which was twice as fast during the first year of the experiment (Fig. 3). OsHV-1 might actively use the host's cellular mechanisms to replicate, indicating that the risk factor for OsHV-1-associated mortality is increased in fast-growing oysters. In oysters, the daily growth rate regularly decreases from larvae to adult, which is consistent with a decrease of the susceptibility to OsHV-1 from larvae/spat to adults (Azéma et al., 2016; Dégremont et al., 2016; Whittington et al., 2015).

The significant interaction between families of different genetic backgrounds and size highlights the importance of genetics in this type of study, because different families exhibited contrasting mortality patterns with size (Fig. 2). Genetic background can therefore influence the outcome of such experiments, and this was demonstrated in our study. Nevertheless, identification of highly resistant and highly susceptible phenotypes with a large size range makes these contrasting families important for both selective breeding programs and research purposes. Size and age, which are usually confounding factors, are both important factors for mortality events related to OsHV-1 (Dégremont, 2011; Paul-Pont et al., 2013a; Paul-Pont et al., 2014; Peeler et al., 2012; Petton et al., 2015; Whittington et al., 2015). Overall,

selective breeding programs should focus on the most resistant families, which would have to be identified at a small size. If the genetic evaluation for resistance to OsHV-1 is done too late, breeders might select families that show low mortality at large sizes, even though these families might exhibit high mortality at smaller sizes. Conversely, both susceptible families and resistant families are of great interest for research purposes, such as QTL identification (Sauvage et al., 2010) or transcriptomic studies (Segarra et al., 2014). At a small size, numerous families showed high mortality, whereas only a few still showed high mortality at larger sizes (Fig. 2). Thus, the families that are truly susceptible to OsHV-1 might only be identified at larger sizes.

In our experiment, only one replicate per size per family was used based on the assumption that there was an equal probability of exposure to OsHV-1 between L and S groups. This assumption was based on previous experiments at this site for which mortality related to OsHV-1 was similar among bags within families (Dégremont, 2011; Dégremont et al., 2015b). This assumption is reinforced by the height experiment, which revealed similar mortality among the bags (see below). Additionally, it is unlikely that the bags containing S groups were more exposed to OsHV-1 than the bags of the L group because all bags were randomly attached on the racks. Nevertheless, others studies have shown spatial and temporal variations for OsHV-1 exposure, suggesting that probability of exposure is very uneven in their sites (Paul-Pont et al., 2013b; Pernet et al., 2014). Thus, replications within size should be addressed in sites where spatial variations are known.

4.3. Growing height investigation

Similar to the size investigation, a significant interaction was also observed between the families and growing heights. Again, mortality was similar among the growing heights for the families displaying the extreme mortality pattern, particularly for those exhibiting very high mortality (>95%). This result is in agreement with OsHV-1-associated mortality in triploid spat during a study conducted in 2011–2012 in Australia, in which all seed died regardless of the growing height (Paul-Pont et al., 2013a). In contrast, in our study, 9 families showed a significant difference in mortality among the different growing heights. Most of them displayed lower mortality for Hi and higher mortality for Lo (Figs. 5 & 6). This tendency was observed in *C. gigas* spat in Australia (Whittington et al., 2015), as well as for adult *C. gigas* (Paul-Pont et al., 2013a; Whittington et al., 2015). Differences observed at the spat stage were explained by the use of different oyster batches, which differed in size, age and parentage (Whittington et al., 2015). Our study highlighted the importance of parentage in OsHV-1-associated mortality at different growing heights. Therefore, a study investigating the growing height could reach different conclusions depending on the family tested. Highly resistant and highly susceptible families should not be used in these studies. In contrast, families showing intermediate resistance to OsHV-1 infection would better highlight the importance of this husbandry practice to limit OsHV-1 mortality. Thus, this approach could be used if farmers do not have access yet to selected oysters, although the benefit will be limited.

Table 4

Variance components (additive, genetic and total for Va, Vg and Vt, respectively) and heritabilities (narrow, broad and combined for h²n, h²b and h²m + f, respectively) for mortality in *C. gigas* in the L (large) group, S (small) group, and both groups in November 2014 and October 2015.

Variance	November 2014			October 2015		
	Large	Small	Both	Large	Small	Both
Va	2.05 ± 1.06	3.09 ± 1.79	1.96 ± 1.06	2.01 ± 1.05	3.31 ± 1.80	2.10 ± 1.04
Vg	2.08 ± 0.70	3.76 ± 1.38	2.11 ± 0.75	1.95 ± 0.70	3.36 ± 1.25	1.90 ± 0.65
Vt	4.32 ± 0.27	5.00 ± 0.46	4.31 ± 0.27	4.28 ± 0.26	4.96 ± 0.46	4.29 ± 0.26
h ² n	0.47 ± 0.22	0.62 ± 0.32	0.45 ± 0.23	0.47 ± 0.22	0.67 ± 0.32	0.49 ± 0.22
h ² b	0.48 ± 0.15	0.75 ± 0.26	0.49 ± 0.16	0.46 ± 0.16	0.68 ± 0.24	0.44 ± 0.14
h ² m + f	0.48 ± 0.09	0.68 ± 0.12	0.47 ± 0.09	0.46 ± 0.09	0.67 ± 0.12	0.47 ± 0.09

One hypothesis to explain the higher mortality of oysters in the Lo condition is that oysters with a longer emersion time will exhibit more growth and increased cell activity compared to oysters in the Hi condition. Consequently, OsHV-1 might have actively used the host's cellular mechanisms for its replication, and the viral load would have more quickly reached the resistance threshold of the oysters raised in the Lo condition compared to those raised in the Hi condition. As a direct consequence, at least some of the oysters in the Hi condition with genetic resistance would have had more time to limit OsHV-1 replication, and thus, the viral load would have remained below the mortality threshold. Further investigations should explore this hypothesis. Meanwhile, this finding is consistent with the size investigation, which showed that the S oysters had a higher susceptibility to OsHV-1 and a higher daily specific growth than the L oysters.

A second hypothesis to explain the reduced mortality in the Hi condition is that these oysters had reduced exposure to OsHV-1, as was reported by Paul-Pont et al. (2013a) and Whittington et al. (2015). Thus, oysters in Hi condition might have a longer span of time to limit OsHV-1 infection between successive OsHV-1 exposures, which could be enough to keep the viral load under the threshold required to cause mortality.

Another hypothesis suggests that oysters in the Hi condition are to some extent undergoing starvation compared to those in the Lo condition. It is well known that starvation is a potent stimulus of autophagy, which was recently identified as an important defense mechanism of *C. gigas* against OsHV-1 infection (Moreau et al., 2015). Thus, the autophagy process might have been stimulated for some oyster families maintained at the Hi condition.

4.4. Genetic parameters of mortality

It is likely that OsHV-1 was the main etiological agent of the mortality observed in *C. gigas* during the size investigation, suggesting that the mortality trait was highly linked to the resistance to OsHV-1 infection trait.

The broad and narrow sense heritabilities were similar, indicating that non-additive variance or variance due to a common environment was negligible (Table 4). Thus, both heritabilities can be regarded as equally reliable, and the combined heritability was used as the best estimate (Falconer and Mackay, 1996). The combined heritabilities for mortality in the field in November 2014 were moderate, ranging from 0.48 to 0.68 (Table 4). This result is consistent with several studies conducted to determine the resistance of *C. gigas* to OsHV-1 infection. A separate study, conducted with the same 40 full-sib families that were experimentally infected with OsHV-1 in laboratory conditions, showed the same range of heritability for the same size/age ranges (Azema et al., 2015b). Other studies focusing on mortality related to OsHV-1 resistance in *C. gigas* also showed moderate narrow-sense heritability (Dégremont et al., 2015b), as well as moderate realized heritability after four generations of selection (Dégremont et al., 2015a).

Nonetheless, higher additive genetic variance was observed for the S group than the L group (Table 4), indicating that size has a significant effect on the estimation of heritability of OsHV-1 resistance. Azema et al. (2015a) also observed a decrease in the heritability from spat to adult, but the experimental infections were conducted at different ages.

Similar heritabilities were observed in October 2015, indicating that the influence of genetic variance was not eroded until the oysters reached market size. Our results are in agreement with those obtained for *C. gigas* on the west coast of the USA (Evans and Langdon, 2006).

5. Conclusions

In conclusion, our study showed that OsHV-1 played a major role in the mortality outbreak observed in spat when the temperature reached 16 °C. Our study clearly showed that smaller oysters had a higher susceptibility to OsHV-1 than larger oysters at 15 months of age. Size is a

major factor that must be considered in genetic evaluations of spat resistance to mortality. This factor also discriminates the highly resistant and highly susceptible families, which is of great importance for both selective breeding programs and research purposes. Our study also showed that growing height has a limited effect on mortality related to OsHV-1 in 3 months old spat, which exhibited high mortality regardless of growing height. Meanwhile, a tendency of higher mortality in Lo (85%) compared Hi (72%) growing heights was observed for 9 families. Our results again highlight the importance of the germplasm used for such investigations due to the strong genetic basis for resistance to OsHV-1 in *C. gigas*. Finally, our study confirmed that the heritability of resistance to OsHV-1 in *C. gigas* is moderate to high and that natural selection would be expected to develop in the field.

Acknowledgments

We wish to express our gratitude to Aurélien Brun for his technical support for oyster maintenance. The oysters used in this work were produced and maintained in controlled conditions at the Ifremer hatchery in La Tremblade and at the Ifremer nursery in Bouin. We are very grateful to the hatchery and nursery teams for their assistance in oyster production.

This study was supported by Ifremer through the research activities on "Amélioration par la sélection" and by the French Ministries of Ecology and Agriculture through the research program "AESTU".

References

- Azema, P., Travers, A., Lamy, J.-B., Dégremont, L., 2015a. Genetic parameters for OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* resistance in *Crassostrea gigas*: first results using controlled challenges. 107th Annual Meeting of the National Shellfish Association, Monterey (CA), p. 606.
- Azema, P., Travers, M.-A., Lamy, J.-B., Dégremont, L., 2015b. Genetic parameters for OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* resistance in *Crassostrea gigas*: first results using controlled challenges. *J. Shellfish Res.* 34, 606–607.
- Azema, P., Travers, M.-A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., Dégremont, L., 2015c. 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. *Vet. Res.* 46, 139.
- Azéma, P., Travers, M.-A., Benabdelmouna, A., Dégremont, L., 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. *J. Invertebr. Pathol.* 139, 92–101.
- Burge, C.A., Griffin, F.J., Friedman, C.S., 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Org.* 72, 31–43.
- Burge, C.A., Judah, L.R., Conquest, L.L., Griffin, F.J., Cheney, D.P., Suhrbier, A., Vadopalas, B., Olin, P.G., Renault, T., Friedman, C.S., 2007. Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26, 163–172.
- Clegg, T.A., Morrissey, T., Geoghegan, F., Martin, S.W., Lyons, K., Ashe, S., More, S.J., 2014. Risk factors associated with increased mortality of farmed Pacific oysters in Ireland during 2011. *Prev. Vet. Med.* 113, 257–267.
- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317, 94–98.
- Dégremont, L., 2013. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 416–417, 129–134.
- Dégremont, L., Nourry, M., Maurouard, E., 2015a. 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., Guyader, T., Tourbiez, D., Pépin, J.-F., 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., Morga, B., Trancart, S., Pépin, J.F., 2016. Resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* larvae. *Front. Mar. Sci.* 3.
- 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.
- Dégremont, L., Boudry, P., Ropert, M., Samain, J.-F., Bédier, E., Soletchnik, P., 2010. Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 299, 44–50.
- Domeneghetti, S., Varotto, L., Civettini, M., Rosani, U., Stauder, M., Pretto, T., Pezzati, E., Arcangeli, G., Turolla, E., Pallavicini, A., Venier, P., 2014. Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish Shellfish Immunol.* 41, 37–44.
- EFSA, 2015. Oyster mortality. *EFSA J.* 13 (6), 1–59.

- Evans, S., Langdon, C., 2006. Effects of genotype × environment interactions on the selection of broadly adapted Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 261, 522–534.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, fourth ed. Addison Wesley Longman, Essex, UK.
- Garcia, C., Thebault, A., Degremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., Francois, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T., 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.* 42, 73.
- Jenkins, C., Hick, P., Gabor, M., Spiers, Z., Fell, S.A., Gu, X.N., Read, A., Go, J., Dove, M., O'Connor, W., Kirkland, P.D., Frances, J., 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 105, 109–126.
- Keeling, S.E., Brosnahan, C.L., Williams, R., Gias, E., Hannah, M., Bueno, R., McDonald, W.L., Johnston, C., 2014. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1—an opportunistic longitudinal study. *Dis. Aquat. Org.* 109, 231–239.
- Le Deuff, R.-M., Nicolas, J.-L., Renault, T., Cochenec, N., 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to asexual larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists* 14, 69–72.
- Lynch, S.A., Carlsson, J., Reilly, A.O., Cotter, E., Culloty, S.C., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139, 1526–1532.
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.-A., Rubinsztein, D.C., Renault, T., 2015. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* 11, 516–526.
- Nicolas, J.-L., Comps, M., Cochenec, N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists* 12, 11–13.
- Ødegård, J., Olesen, I., Gjerde, B., Klemetsdal, G., 2007. Evaluation of statistical models for genetic analysis of challenge-test data on ISA resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*): prediction of progeny survival. *Aquaculture* 266, 70–76.
- Ødegård, J., Baranski, M., Gjerde, B., Gjedrem, T., 2011. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquac. Res.* 42, 103–114.
- Paul-Pont, I., Dhand, N.K., Whittington, R.J., 2013a. Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 412–413, 202–214.
- Paul-Pont, I., Dhand, N.K., Whittington, R.J., 2013b. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Dis. Aquat. Org.* 105, 127–138.
- Paul-Pont, I., Evans, O., Dhand, N.K., Rubio, A., Coad, P., Whittington, R.J., 2014. Descriptive epidemiology of mass mortality due to ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture* 422–423, 146–159.
- Peeler, E.J., Allan Reese, R., Cheslett, D.L., Geoghegan, F., Power, A., Thrush, M.A., 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Prev. Vet. Med.* 105, 136–143.
- Pepin, J.-F., 2013. Short Technical Report for OsHV-1 Detection and Quantification by Real Time Polymerase Chain Reaction Using OsHV-1 DNA Polymerase Sequence.
- Pépin, J.F., Riou, A., Renault, T., 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 149, 269–276.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Degremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.F., Keck, N., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* 2, 215–237.
- Pernet, F., Lagarde, F., Jeannée, N., Daigle, G., Barret, J., Le Gall, P., Quere, C., D'orbcastel, E.R., 2014. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS One* 9, e88469.
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., Pernet, F., 2015. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 6, 205–222.
- Roque, A., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Gairin, I., Rodgers, C.J., Furones, M.D., 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324, 303–306.
- SAS, 2014. SAS software 9.4. SAS Help and Documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J. Microbiol. Methods* 77, 191–197.
- Sauvage, C., Boudry, P., de Koning, D.J., Haley, C.S., Heurtebise, S., Lapegue, S., 2010. QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Anim. Genet.* 41, 390–399.
- Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., Pepin, J.-F., 2011. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.* 42, 27.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99.
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Degremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pepin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2014. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 15, 1–13.
- Whittington, R.J., Dhand, N.K., Evans, O., Paul-Pont, I., 2015. Further observations on the influence of husbandry practices on OsHV-1 μ Var mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: age, cultivation structures and growing height. *Aquaculture* 438, 82–97.

II.4 Conclusions de la deuxième partie

II.4.1 Evaluation des paramètres génétiques

En utilisant un matériel biologique dédié, constitué par des huîtres issues de 40 familles de demi-frères, nous avons pu mesurer en conditions contrôlées la variance d'origine génétique de la survie face à des infections induites soit par OsHV-1, soit par *Vibrio aestuarianus*, et ce à plusieurs reprises au cours de leur 24 premiers mois de vie. Des lots issus de ces mêmes familles ont également été testés dans différents environnements extérieurs (estran et claires) dans lesquels des phénomènes de mortalités ont pu être régulièrement observés.

Nous avons pu évaluer les paramètres génétiques de la sensibilité à l'infection par la bactérie *V. aestuarianus* au stade juvénile et au stade adulte et confirmer la forte composante génétique déjà décrite pour la sensibilité au virus OsHV-1 à tous les stades, dès le stade naissain. A l'inverse de la sensibilité à l'infection par OsHV-1, les animaux sont plus sensibles à une infection bactérienne au stade juvénile et au stade adulte qu'au stade naissain. Aux premiers stades de développement, une sensibilité importante à l'infection par OsHV-1 a pu être observée tandis que les mortalités induites en réponse à la bactérie *V. aestuarianus* sont restées très faibles, atteignant en moyenne 15% à 6 mois pour un poids de 2,5g.

Sur l'ensemble des 40 familles testées, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation génétique 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. En d'autres termes, la sélection d'animaux pour leur résistance à la virose ne devrait pas influencer la sensibilité de ces animaux à la vibriose. Cela indique également qu'il est possible de réaliser une sélection dirigée pour améliorer la résistance aux deux maladies, comme cela a déjà été constaté pour améliorer la résistance de *C. virginica* aux infections par *Haplosporidium nelsoni* et par *Perkinsus marinus* [192] et pour améliorer la résistance de *Saccostrea glomerata* aux infections par *Bonamia roughleyi* et par *Martelia sydneyi* [193]. Toutefois, les évaluations ont

été réalisées sur un nombre restreint de familles et l'absence de corrélations génétiques pourrait être le résultat d'une erreur d'échantillonnage.

II.4.2 Utilisation des familles dans l'évaluation des paramètres génétiques

L'utilisation de nombreux animaux avec 10 expériences menées en laboratoire et sur le terrain dans différentes conditions, le nombre restreint de familles utilisées ne permet pas d'obtenir une bonne précision des estimations. Par conséquent, il convient de prendre les résultats de ces expérimentations avec précaution.

Il n'a pas été possible d'augmenter le nombre de familles pouvant être testées car chaque famille a dû être séparée des autres durant toute l'expérimentation. Cette séparation physique a limité le nombre de familles pouvant être produites au stade larvaire. Puis après le stade larvaire, l'élevage de chaque famille séparée physiquement demande beaucoup de place, place d'autant plus nécessaire au fur et à mesure que les animaux grandissent.

Ainsi, notre expérimentation a été contrainte par la place disponible dans les installations de l'écloserie du laboratoire de La Tremblade et dans la nurserie de Bouin. De plus, afin d'éviter au mieux les biais dans l'évaluation des paramètres génétiques, les familles ont dû être maintenues à l'abri des agents infectieux. Les installations ont donc été très sollicitées pour maintenir toutes les familles avant les évaluations génétiques. Enfin, les évaluations ont là aussi été limitées par la place disponible en salle de pathologie expérimentale, dans laquelle les effluents ne retournent pas au milieu naturel mais partent dans une filière de traitement des effluents biologiquement contaminés.

Une des solutions qui peut être mise en œuvre afin de pouvoir augmenter le nombre de familles consiste à mélanger les différentes familles dès le stade larvaire, à les élever ensemble jusqu'à leur évaluation puis à reconstruire les familles par assignation de parenté. Ces méthodes d'assignation sont disponibles pour *Crassostrea gigas* et l'estimation de l'héritabilité a été réalisée pour des caractères relatifs à la croissance [194]. Toutefois ces méthodes sont coûteuses et pour l'estimation de paramètres génétiques relatifs à la survie à une infection, la variance génétique peut être confondue avec la variance du succès reproducteur qui est élevée chez *C. gigas*.

II.4.3 Conditions expérimentales pour l'évaluation de paramètres génétiques

Les familles testées en laboratoires ont également été déployées sur le terrain dans des installations utilisées par les ostréiculteurs au cours du cycle de production des huîtres : sur estran pour le pré-grossissement et le grossissement, en claires pour l'affinage et en dégorgeoirs pour la décontamination avant le conditionnement et la mise sur le marché pour consommation. Les mortalités ont été comptabilisées régulièrement pour estimer les taux de mortalité.

Il a été ainsi possible d'estimer les corrélations génétiques entre les expériences menées en laboratoire avec *V. aestuarianus* et les expériences menées en milieu extérieur pour un même âge. Nous avons estimé une corrélation génétique positive notamment entre les infections par *V. aestuarianus* menées au laboratoire et les mortalités observées dans les bacs de 800 litres au stade juvénile et pour lesquelles *V. aestuarianus* a été détecté en forte quantité dans les animaux moribonds échantillonnés et analysés. Le classement des familles était respecté entre les deux expériences. Il est ainsi possible de réaliser une sélection dirigée pour améliorer la résistance à l'infection par la bactérie en réalisant les estimations en conditions contrôlées.

Cela suppose cependant que les animaux utilisés pour initiés l'infection et qui subissent une injection dans leur muscle adducteur soient considérées comme naïfs et qu'ils n'aient pas été préalablement en contact avec des agents infectieux. Nous avons régulièrement réalisé des analyses sur ces animaux considérés comme naïfs et sur les animaux des différentes familles avant leur évaluation.

Cela suppose également que l'eau utilisée dans les systèmes de flux continu employés dans les installations de l'écloserie ne soit pas contaminée par des agents infectieux. Nous avons constaté que, pour quatre des dix pathologies menées en laboratoire, des contaminations croisées avaient eu lieu : de l'ADN viral ou bactérien avait été mis en évidence par PCR dans les analyses réalisées sur des échantillons d'huîtres moribondes ou mortes alors que ces agents infectieux n'avaient pas été utilisés pour initier les infections expérimentales. Ainsi, cet ADN viral ne pouvait provenir que de l'eau de mer utilisée lors de l'infection expérimentale. Toutefois, compte tenu des installations de filtration et du traitement de l'eau par des lampes à ultra-violet, il est probable que l'ADN détecté était inactif ou dégradé. Cette hypothèse est vraisemblable dans la mesure où aucune mortalité n'a été constatée dans les bacs témoins et

dans la mesure où les expériences en pathologie expérimentales étaient bien génétiquement corrélées aux expériences menées en milieu extérieur. De plus, il a été constaté que la présence d'ADN viral dans les animaux analysés correspondait à l'occurrence d'épisodes de mortalité de naissain dans le milieu extérieur. Par conséquent, l'eau de mer utilisée dans nos installations, prélevée dans le milieu extérieur devait contenir une grande quantité de particules virales qui ont été ensuite inactivées par les traitements de décontamination mis en œuvre avant utilisation de l'eau. Enfin, nous verrons dans le troisième chapitre du présent travail que l'infection simultanée par OsHV-1 et par *V. aestuarianus* aboutit à des taux de mortalité très importants, ce qui n'a pas été observé durant nos expérimentations.

II.4.4 Influence du parcours de vie dans l'estimation des paramètres génétiques

En éclosion, lors des phases d'élevage larvaire, des différences de taille peuvent être observées sur animaux des mêmes lots. Dans les conditions d'élevage, la disponibilité en nourriture n'est pas la même pour tous les animaux. Les pratiques d'élevage en éclosion ont donc une influence sur la croissance des animaux. En éclosion professionnelle, les animaux les plus petits sont écartés de l'élevage et seuls les animaux les plus gros sont conservés pour la vente.

En conditions expérimentales et sur le terrain, il a été démontré que la résistance aux infections à OsHV-1 augmente avec le poids et avec l'âge des animaux [189, 190]. Cette caractéristique est intéressante pour les ostréiculteurs dans la mesure où le déploiement sur estran d'animaux plus gros ou plus âgés peut être une stratégie pour limiter les mortalités rencontrées sur estran à partir de mai, lorsque la température dépasse 16°C, impliquant OsHV-1. Toutefois, dans la mesure où ces deux paramètres sont fortement corrélés dans des conditions homogènes d'élevage, il apparaît difficile de mesurer leur importance relative.

Aussi, dans la deuxième partie de ce chapitre, afin d'évaluer l'importance relative du poids et de la taille sur les mortalités du naissain de *C. gigas* lorsqu'il est placé sur estran nous avons utilisé des animaux de même âge mais répartis selon deux groupes de taille et de poids différents. Les différences de poids et de taille ont été obtenues par des densités d'élevage différentes. Ces animaux ont été déployés sur estran au cours de la période froide, pendant laquelle des mortalités ne sont pas observées. Au printemps suivant, lorsque la température a atteint et dépassé 16°C, des mortalités ont été observées et ont été évaluées par des comptages

réguliers. Au cours de ces mortalités, l'ADN du virus OsHV-1 a été détecté en quantité importante sur l'ensemble des animaux moribonds prélevés ce qui confirme son implication dans les mortalités.

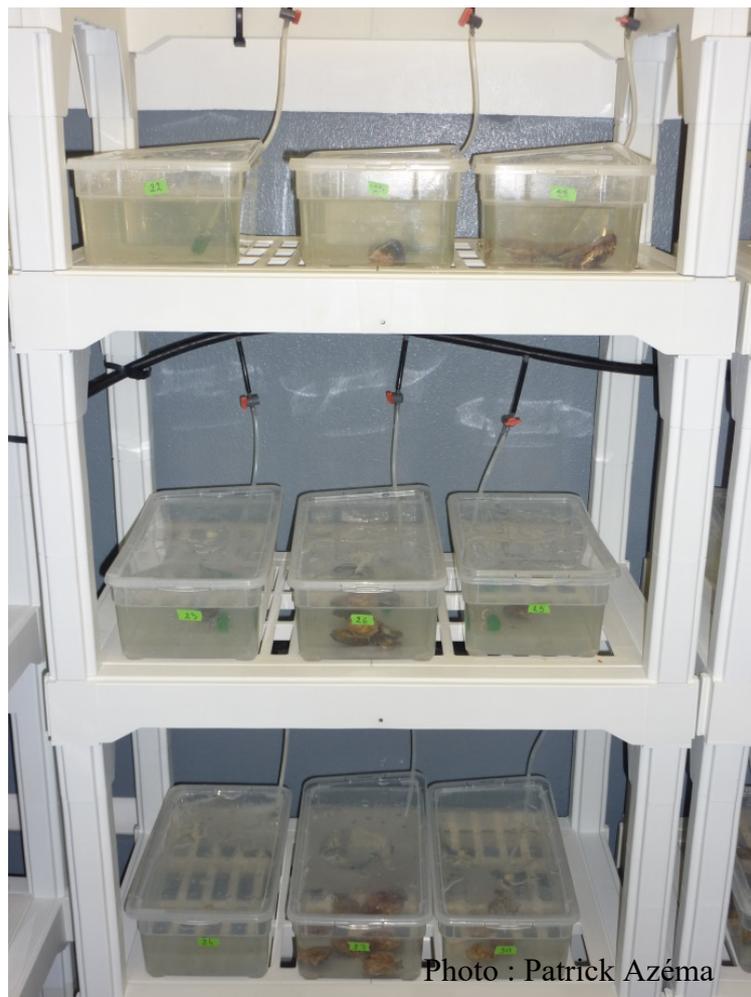
Dans le chapitre deux, il a été clairement observé que les animaux les plus petits présentaient une moindre résistance aux infections par OsHV-1 que les animaux les plus gros. La comparaison entre les animaux des groupes de poids a montré que trois phénotypes différents pouvaient être définis. Pour le premier phénotype, petits comme gros animaux ont présenté des mortalités fortes quel que soit le poids (groupe SS, petits sensibles- gros sensibles, 7 familles). Pour le deuxième phénotype, petits comme gros animaux ont présenté des mortalités faibles quel que soit le poids ou faibles (groupe RR, petits peu sensibles, gros peu sensibles, 4 familles). Enfin, le troisième génotype regroupait la majorité des familles. De ce groupe, les animaux apparaissent particulièrement sensibles pour les plus petits mais moins sensible pour les plus gros animaux des mêmes familles et pourraient être considérés comme SR (petits sensibles, gros peu sensibles, 29 familles).

Ces trois phénotypes, SS, SR et RR, présentent des caractéristiques intéressantes pour améliorer la conduite de programmes de sélection dirigée. Afin d'améliorer la résistance aux infections par OsHV-1 la sélection des meilleures familles devrait être réalisée le plus tôt possible : les familles disposant d'un phénotype RR devraient être sélectionnées précocement dans la mesure où elles montrent une résistance à l'infection dès les premiers testages, lorsque les animaux sont encore de petite taille.

Ces caractéristiques sont également intéressantes pour mettre en œuvre des investigations en génétique moléculaire afin de déterminer les QTL en relation avec l'infection OSHV-1 : l'expression des gènes des familles montrant d'un phénotype SS peut être comparée à l'expression des gènes de familles RR, sans avoir à mettre en œuvre des étapes de sélection divergente. La mise en évidence de ces phénotypes devra se faire avec des animaux ayant atteint un poids suffisant (les animaux testés avaient un poids moyen d'environ 5g), maintenus à l'abri des mortalités jusque-là.

III. TROISIEME PARTIE

Etude des lots génétiquement différenciés



III.1 Introduction

En France, depuis 2008, des épisodes de mortalités touchant l'ensemble des sites d'élevage ont été observés sur du naissain d'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, avec des taux de mortalité très importants, de plus de 70%. Ces épisodes sont reliés avec la détection de quantité importante d'ADN du virus OsHV-1 sous la forme du variant μ var jusqu'alors non décrit. Ce dernier semble avoir supplanté la forme classiquement détectée jusqu'alors lors des épisodes de mortalité rapportés comme affectant le naissain d'huître creuse depuis de début des années 1990 en fin de printemps/début d'été [11, 195, 196]. Depuis 2012, des phénomènes de mortalité massive ont également été observés touchant des huîtres cultivées ayant atteint une taille commerciale. Ces phénomènes ont d'autant plus d'impact sur le secteur ostréicole qu'ils interviennent en fin de cycle de production, le travail mené depuis le stade naissain étant perdu. Le principal agent pathogène isolé chez des huîtres adultes mortes ou moribondes au cours de ces épisodes de mortalités est la bactérie *Vibrio aestuarianus*.

Etant donné les taux de mortalité élevés observés sur les huîtres au stade naissain, les animaux ayant survécu aux épisodes de mortalité sur estran ont dû subir une forte pression de sélection, tout particulière en lien à la présence du virus OsHV-1. En d'autres termes, il apparaît que très probablement les individus survivants puissent être le résultat d'un processus de sélection naturelle des populations d'huîtres présentes dans le milieu extérieur, sauvages comme cultivées, vis-à-vis de l'infection virale. Dans le premier chapitre de cette partie, nous avons voulu vérifier si la pression de sélection exercée au stade naissain pouvait avoir induit une plus grande sensibilité des huîtres adultes.

Les analyses diagnostiques réalisées dans le cadre des réseaux de surveillance des mortalités chez *C. gigas*, ont régulièrement mis en évidence la présence simultanée d'ADN d'OsHV-1 et de *V. aestuarianus* dans le même animal, notamment depuis 2012 [14-16]. Ces résultats analytiques venaient confirmer la co-détection d'OsHV-1 et de bactérie du groupe *V. Splendidus* qui avait été décrite comme un des facteurs pouvant expliquer les taux de

mortalités importants observés à partir de 2008 et à ce titre le terme d'« association de malfaiteurs » avait été utilisé pour vulgariser la situation observée. Dans une étude récente, Petton et al. ont montré que l'absence de vibrions dans les huîtres, après un traitement antibiotique, entraînait des mortalités due à l'infection par OsHV-1 moindres que lorsque des vibrions étaient présents [180]. Ainsi, l'intensité de la maladie observée chez *C. gigas* au stade naissain pourrait avoir une étiologie poly-microbiale.

III.2 Premier chapitre :

Effet de la sélection pour une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1 sur la sensibilité à l'infection par *Vibrio* *aestuarianus*

Les résultats de ce travail ont été valorisés sous la forme d'une publication dans la revue « Veterinary Research » : 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 [197].

Le contexte de l'étude et une synthèse des principaux résultats obtenus est présentée ci-après.

Une des hypothèses évoquée pour expliquer l'émergence ou la réémergence de l'infection par *Vibrio aestuarianus* avec l'apparition de mortalité massive sur des animaux adultes, est que la pression sélective due à l'infection virale à OsHV-1 au stade naissain pouvait avoir abouti à une contre-sélection en matière de résistance à l'infection bactérienne. Au travers des travaux rapportés dans ce chapitre, nous avons cherché à déterminer, en conditions expérimentales, si la sélection pour une meilleure résistance du naissain à l'infection virale pouvait avoir un impact sur la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons utilisé deux populations d'huîtres creuses correspondant à une lignée présentant une meilleure résistance à l'infection par OsHV-1, obtenue après trois générations de sélection massale, et d'une lignée non-sélectionnée produite dans les mêmes conditions comme témoin. Les deux lignées ont été obtenues en plaçant des lots de naissain sur estran pendant des épisodes de mortalité au cours desquels de fortes concentrations d'ADN viral ont été mesurées sur des animaux moribonds. Les animaux survivants et donc présumés résistants ont été ramenés en écloserie et ont été placés dans des conditions permettant la maturation sexuelle. Des reproductions ont été réalisées avec les animaux recueillis et les naissains produits ont été à leur tour déployés sur estran l'année suivante. Ils ont à leur tour subi un épisode de mortalité. Ce processus a été mené pendant trois générations. Parallèlement, des animaux issus des mêmes lots initiaux de chaque population ont été conservés en écloserie, à l'abri des mortalités et reproduits tous les ans pour constituer les lots témoins, non sélectionnés. Des lots d'huîtres échantillonnés parmi ces différentes lignées ont été infectés expérimentalement afin de déterminer leur niveau de sensibilité avec des suspensions infectieuses de *V. aestuarianus*.

Pour les premières expériences d'infection expérimentale, les animaux utilisés avaient 12 mois pour un poids d'environ 20 grammes, ce qui correspondrait à un stade juvénile ou à un stade naissain tardif dans le cycle de vie de l'huître creuse, *C. gigas*. En tout état de cause, les animaux utilisés n'avaient pas encore commencé leur gamétogénèse, d'après un échantillonnage réalisé sur chaque lignée.

Des expériences en laboratoire comparables ont été menées à deux reprises supplémentaires soit avec des animaux plus âgés issus des mêmes lots, mais n'ayant pas eu contact avec les agents pathogènes étudiés, soit avec des animaux qui avaient subi les expériences d'infection expérimentales précédentes. Ces derniers ont donc subi des infections successives menées afin d'évaluer le niveau de résistance qui pouvait être éventuellement acquis après une première infection par *V. aestuarianus*. Il a également été vérifié que les lignées utilisées présentaient bien des niveaux de résistance supérieurs aux lignées témoins en infectant ces lignées avec une suspension virale (OsHV-1). Au cours de ces expériences, les taux de mortalité ont été mesurés en observant les animaux quotidiennement en retirant les animaux morts au fur et à mesure.

Afin de définir le meilleur protocole à utiliser pour réaliser les infections expérimentales par *V. aestuarianus*, deux protocoles différents ont été testés. Le premier protocole, par

injection, consistait en une injection dans le muscle adducteur de suspensions infectieuses contenant différentes concentrations de bactéries, mesurées par densité optique. Le second protocole consistait à placer en cohabitation les animaux dont la sensibilité était à évaluer avec des animaux considérés comme indemnes préalablement infectés par une injection dans le muscle adducteur d'une suspension bactérienne.

Parallèlement à l'estimation de la sensibilité de lignées d'huîtres à l'infection par *V. aestuarianus*, le statut immunitaire des différentes lignées étudiées a également été caractérisé en se fondant sur l'expression de certains gènes impliqués dans les défenses immunitaires, et ce avant les expériences d'infection expérimentale menées au stade juvénile, puis au stade adulte. La sélection des gènes a été établie en se reposant sur des expériences précédentes, qui avaient déterminé des variations dans leur transcription, suite à des infections expérimentales par des vibrions. Avant la mise en place des infections expérimentales, des huîtres ont été échantillonnées. Le corps des animaux a été retiré de leur coquille, puis immédiatement plongé en azote liquide. Ensuite, les huîtres ont été regroupées par lignées et broyées dans l'azote liquide afin d'obtenir des poudres. Ces poudres ont fait l'objet d'une extraction d'ARN ce qui a permis de quantifier par PCR en temps réel l'expression des gènes choisis.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



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

Patrick Azéma^{1*}, Marie-Agnès Travers¹, Julien De Lorgeril², Delphine Tourbiez¹ and Lionel Dégremont¹

Abstract

Since 2008, the emergent virus OsHV-1 μ var has provoked massive mortality events in *Crassostrea gigas* spat and juveniles in France. Since 2012, mortality driven by the pathogenic bacteria *Vibrio aestuarianus* has stricken market-sized adults. A hypothesis to explain the sudden increase in mortality observed in France since 2012 is that selective pressure due to recurrent viral infections could have led to a higher susceptibility of adults to *Vibrio* infection. In our study, two OsHV-1-resistant lines (AS and BS) and their respective controls (AC and BC) were experimentally challenged in the laboratory to determine their level of susceptibility to *V. aestuarianus* infection. At the juvenile stage, the selected lines exhibited lower mortality (14 and 33%) than the control lines (71 and 80%), suggesting dual-resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* in *C. gigas*. Interestingly, this pattern was not observed at the adult stage, where higher mortality was detected for AS (68%) and BC (62%) than AC (39%) and BS (49%). These results were confirmed by the analysis of the expression of 31 immune-related genes in unchallenged oysters. Differential gene expression discriminated oysters according to their susceptibility to infection at both the juvenile and adult stages, suggesting that resistance to *V. aestuarianus* infection resulted in complex interactions between the genotype, stage of development and immunity status. Finally, survivors of the *V. aestuarianus* challenge at the juvenile stage still exhibited significant mortality at the adult stage during a second and third *V. aestuarianus* challenge, indicating that these survivors were not genetically resistant.

Introduction

The French oyster industry has regularly suffered from massive mortality episodes (Figure 1). In the early 1970s, the production of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* collapsed due to massive mortality related to an iridovirus [1], and the production of the flat oyster *Ostrea edulis* was significantly reduced due to two parasites (*Martelia refringens* and *Bonamia ostreae*) [2]. Once a disease affecting an oyster species has been introduced

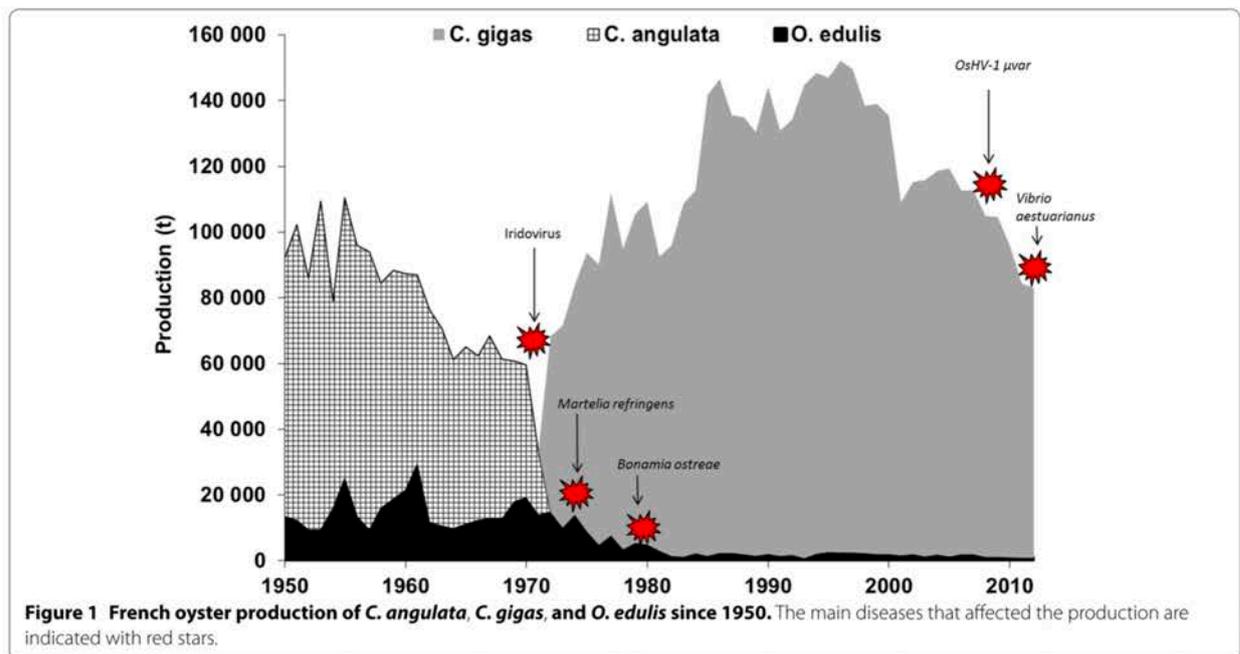
or detected in an area, resources to minimize its effect on oyster populations or production are very constrained. Neither large-scale drug use nor vaccination (because invertebrates have no acquired immunity) is possible in open marine areas due to the scale of the environment, and seawater or other organisms can easily convey pathogens from the reservoir to naïve stocks, thereby favoring the transmission of a disease. In this context, two main solutions have been proposed to sustain French oyster production: (1) develop a selective breeding program to enhance disease resistance using the genetic resources available in oyster populations, and more radically (2) introduce another species that is not sensitive to the disease. This second step was taken in France during the

*Correspondence: pazema@ifremer.fr

¹ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Azéma et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



1970s with the massive introduction of *Crassostrea gigas* from Japan and British Columbia to replace *C. angulata* during the RESOR operation (Figure 1) [3]. However, the introduction of new species is not recommended because it can lead to the introduction of new diseases in local populations [4], competition for habitats and resources, new invasive species and other constraints (regulatory rules, preliminary studies and biological barriers).

French oyster production of *C. gigas* has ranged from 100 000 to 150 000 tons for several decades, but has unfortunately begun to decrease due to two diseases (Figure 1). Indeed, massive mortality events have occurred every year since 2008, with high mortality rates for spat and juveniles (over 70%). A particular OsHV-1 genotype (μ var) that was first described during a period of *C. gigas* mortality in 2004–2005 in Normandy [5] has been ascribed to the mortality [6]. Moreover, significant mortality has been observed in market-sized adults since 2012 [7–9], and *C. gigas* production is expected to decrease again (Figure 1). The main pathogenic agent found in the dying oysters harvested during these mortality episodes belonged to the species *Vibrio aestuarianus*. Because it would not be reasonable to introduce another oyster species to replace *C. gigas*, the possibility of genetic selection for disease resistance might limit the impact of diseases on wild and cultivated oysters.

High mortality rates related to OsHV-1 μ var have been observed in the field since 2008 [10], and it is probable that viral pressure on wild and cultivated oyster

populations has been significant. Therefore, the emergence of high mortality in adults has made it legitimate to investigate whether the selection provoked by viral infection has an impact on the susceptibility of adults to bacterial infections and whether there are correlations or trade-offs between resistance to OsHV-1 and the expected resistance to *V. aestuarianus*. Consequently, it would be interesting to study whether the mass selection breeding program for *C. gigas* currently being managed at Ifremer [11] could enhance disease resistance to both OsHV-1 and *V. aestuarianus*.

Evidence of OsHV-1 resistance was demonstrated in spat *C. gigas* in 2009 using oysters selected based on their higher resistance to the summer mortality phenomenon in 2001 [12–14]. More recently, OsHV-1 resistance was found to be a highly heritable trait in *C. gigas* spat under field and laboratory conditions [11, 15]. However, experimental selective breeding programs focused on *V. aestuarianus* resistance have not been described to date, and a relationship between resistance to OsHV-1 infection and *V. aestuarianus* infection has not been reported.

One hypothesis to explain disease resistance could be linked to host defenses, such as the immune capacity. Previous works identified markers for oyster survival capacity [16–19]. These studies led to the identification of a set of genes whose expression was either up-regulated in oysters able to survive virulent *Vibrio* infection [16, 20] or differentially regulated in the hemocytes of oysters with a high capacity for survival [18].

RESEARCH ARTICLE

Open Access



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

Patrick Azéma^{1*}, Marie-Agnès Travers¹, Julien De Lorgeril², Delphine Tourbiez¹ and Lionel Dégremont¹

Abstract

Since 2008, the emergent virus OsHV-1 μ var has provoked massive mortality events in *Crassostrea gigas* spat and juveniles in France. Since 2012, mortality driven by the pathogenic bacteria *Vibrio aestuarianus* has stricken market-sized adults. A hypothesis to explain the sudden increase in mortality observed in France since 2012 is that selective pressure due to recurrent viral infections could have led to a higher susceptibility of adults to *Vibrio* infection. In our study, two OsHV-1-resistant lines (AS and BS) and their respective controls (AC and BC) were experimentally challenged in the laboratory to determine their level of susceptibility to *V. aestuarianus* infection. At the juvenile stage, the selected lines exhibited lower mortality (14 and 33%) than the control lines (71 and 80%), suggesting dual-resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* in *C. gigas*. Interestingly, this pattern was not observed at the adult stage, where higher mortality was detected for AS (68%) and BC (62%) than AC (39%) and BS (49%). These results were confirmed by the analysis of the expression of 31 immune-related genes in unchallenged oysters. Differential gene expression discriminated oysters according to their susceptibility to infection at both the juvenile and adult stages, suggesting that resistance to *V. aestuarianus* infection resulted in complex interactions between the genotype, stage of development and immunity status. Finally, survivors of the *V. aestuarianus* challenge at the juvenile stage still exhibited significant mortality at the adult stage during a second and third *V. aestuarianus* challenge, indicating that these survivors were not genetically resistant.

Introduction

The French oyster industry has regularly suffered from massive mortality episodes (Figure 1). In the early 1970s, the production of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* collapsed due to massive mortality related to an iridovirus [1], and the production of the flat oyster *Ostrea edulis* was significantly reduced due to two parasites (*Martelia refringens* and *Bonamia ostreae*) [2]. Once a disease affecting an oyster species has been introduced

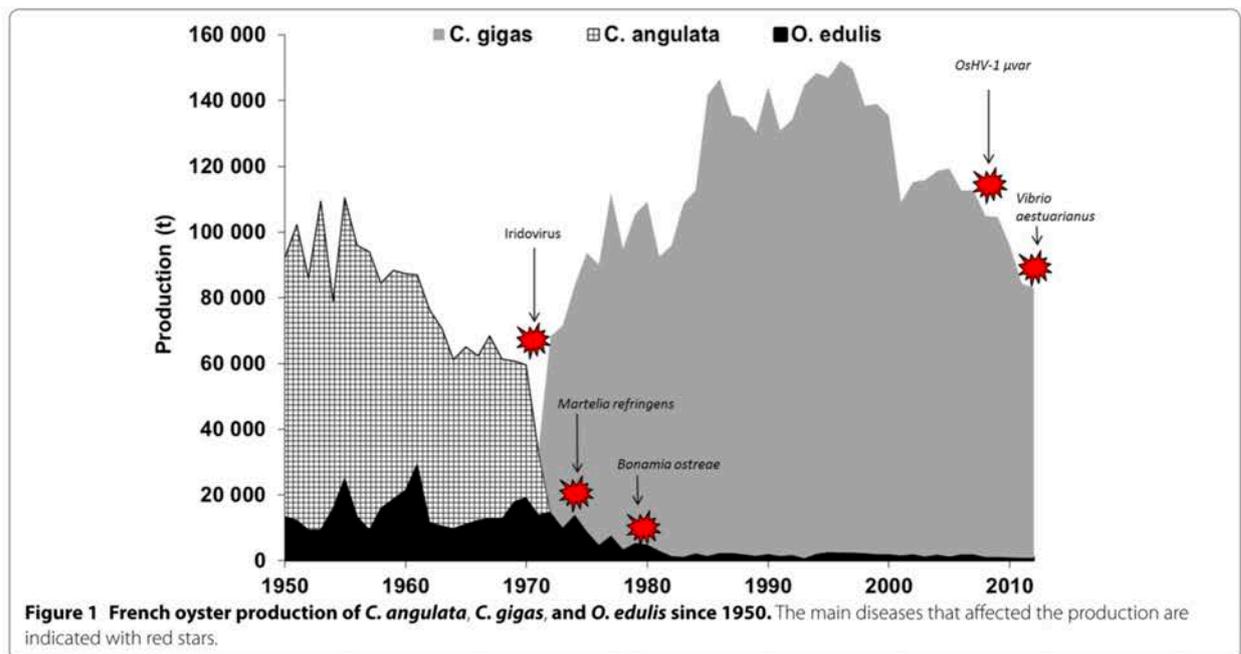
or detected in an area, resources to minimize its effect on oyster populations or production are very constrained. Neither large-scale drug use nor vaccination (because invertebrates have no acquired immunity) is possible in open marine areas due to the scale of the environment, and seawater or other organisms can easily convey pathogens from the reservoir to naïve stocks, thereby favoring the transmission of a disease. In this context, two main solutions have been proposed to sustain French oyster production: (1) develop a selective breeding program to enhance disease resistance using the genetic resources available in oyster populations, and more radically (2) introduce another species that is not sensitive to the disease. This second step was taken in France during the

*Correspondence: pazema@ifremer.fr

¹ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Azéma et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



1970s with the massive introduction of *Crassostrea gigas* from Japan and British Columbia to replace *C. angulata* during the RESOR operation (Figure 1) [3]. However, the introduction of new species is not recommended because it can lead to the introduction of new diseases in local populations [4], competition for habitats and resources, new invasive species and other constraints (regulatory rules, preliminary studies and biological barriers).

French oyster production of *C. gigas* has ranged from 100 000 to 150 000 tons for several decades, but has unfortunately begun to decrease due to two diseases (Figure 1). Indeed, massive mortality events have occurred every year since 2008, with high mortality rates for spat and juveniles (over 70%). A particular OsHV-1 genotype (μ var) that was first described during a period of *C. gigas* mortality in 2004–2005 in Normandy [5] has been ascribed to the mortality [6]. Moreover, significant mortality has been observed in market-sized adults since 2012 [7–9], and *C. gigas* production is expected to decrease again (Figure 1). The main pathogenic agent found in the dying oysters harvested during these mortality episodes belonged to the species *Vibrio aestuarianus*. Because it would not be reasonable to introduce another oyster species to replace *C. gigas*, the possibility of genetic selection for disease resistance might limit the impact of diseases on wild and cultivated oysters.

High mortality rates related to OsHV-1 μ var have been observed in the field since 2008 [10], and it is probable that viral pressure on wild and cultivated oyster

populations has been significant. Therefore, the emergence of high mortality in adults has made it legitimate to investigate whether the selection provoked by viral infection has an impact on the susceptibility of adults to bacterial infections and whether there are correlations or trade-offs between resistance to OsHV-1 and the expected resistance to *V. aestuarianus*. Consequently, it would be interesting to study whether the mass selection breeding program for *C. gigas* currently being managed at Ifremer [11] could enhance disease resistance to both OsHV-1 and *V. aestuarianus*.

Evidence of OsHV-1 resistance was demonstrated in spat *C. gigas* in 2009 using oysters selected based on their higher resistance to the summer mortality phenomenon in 2001 [12–14]. More recently, OsHV-1 resistance was found to be a highly heritable trait in *C. gigas* spat under field and laboratory conditions [11, 15]. However, experimental selective breeding programs focused on *V. aestuarianus* resistance have not been described to date, and a relationship between resistance to OsHV-1 infection and *V. aestuarianus* infection has not been reported.

One hypothesis to explain disease resistance could be linked to host defenses, such as the immune capacity. Previous works identified markers for oyster survival capacity [16–19]. These studies led to the identification of a set of genes whose expression was either up-regulated in oysters able to survive virulent *Vibrio* infection [16, 20] or differentially regulated in the hemocytes of oysters with a high capacity for survival [18].

The objective of this study was to investigate: (1) the resistance to *V. aestuarianus* infection in *C. gigas* at the juvenile and adult stages under laboratory-controlled conditions using two stocks of oysters and (2) to analyze the association of the survival capacity with the basal expression levels of a selection of immune-related genes. For each stock, a control line and a line selected for higher survival at the spat stage under field conditions (which was also related to higher resistance to OsHV-1 infection) were evaluated. First, experimental OsHV-1 infection was performed to confirm the level of resistance of each line to the viral infection. Then, two approaches were used to test for resistance to *V. aestuarianus* infection. The first approach challenged the oysters in primary exposures at the juvenile stage or the adult stage to determine the level of resistance according to the size and/or age of the oysters. The second approach used successive infections at the adult stage with the survivors of the previous experimental infections to determine whether the survivors became resistant to the bacterial infection. Finally, we evaluated the immune status of non-stimulated oysters before the onset of bacterial infection under laboratory conditions.

Materials and methods

Oysters

A mass selection to increase survival in *C. gigas* was performed in two stocks (named A and B) of wild oysters sampled from two sites in the Marennes-Oléron Bay (Charente Maritime, France) in 2008. For each line, a base population G_0 was produced in 2009, and a sub-sample was kept in our facilities to avoid disease-related mortality and to produce the control line of the following generation (G_1 -C). This control allowed the assessment of the effects of changing environmental conditions during the course of the experiment to estimate the response to selection [11]. The other sub-sample of oysters was deployed in the field, where mortality outbreaks caused by OsHV-1 were routinely observed each year since 2009 [21]. Then, the survivors were spawned in 2010 to produce the selected line G_1 -S. The same approach was used in February 2011 and March 2012 to produce G_2 and G_3 , respectively. Four sub-lines were produced for the selected line from G_2 ; further details are given in [11].

The oysters used in this study were the control lines AC and BC of G_3 and the selected lines AS and BS, which were the best sub-lines for survival and OsHV-1 resistance in the field. The field evaluation of the C and S lines at the spat stage during the summer of 2012 confirmed a higher mortality for the C lines (92.9%) compared with the S lines (32.0%). Nevertheless, the oysters used in our experimental infections were either kept in our inland facilities to avoid disease-related mortality or deployed to

the field in October 2012 prior to their evaluation in the laboratory (Figure 2).

Viral and bacterial suspensions

The viral suspension was obtained using the protocol of Schikorski [22]. Briefly, naïve and unselected hatchery-produced oysters were infected by injecting 50 μ L of a previous viral suspension after "anesthesia". Dead oysters were dissected; the mantle and gills were removed, pooled, diluted, crushed and filtered using a 0.22- μ m filter to obtain a clarified tissue homogenate.

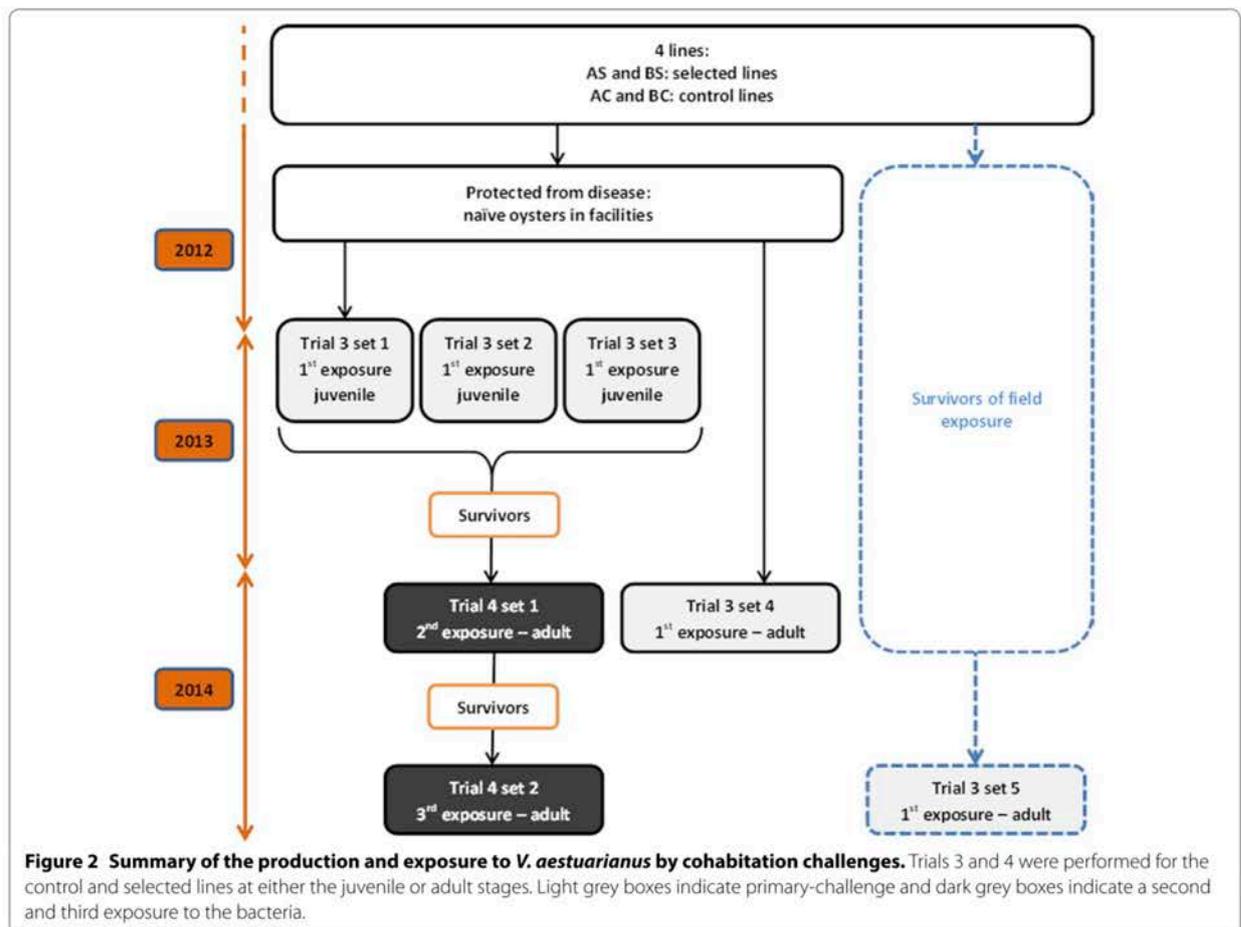
The *Vibrio* strain used in the bacterial challenges was the highly pathogenic strain 02/041 that was isolated during a mortality episode in adults. This strain was previously studied and was included in this study as a reference strain [23]. The *Vibrio* suspension was obtained from an isolate maintained at -80 °C. The bacterial strain was placed in liquid Zobell and incubated for 24 h at 20 °C with constant shaking at 20 rpm. The resulting solution was centrifuged at $3200 \times g$ for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was washed and suspended in sterile artificial sea water (SASW).

Mortality induction protocols

Two types of experimental infection protocols were used to evaluate disease resistance in *C. gigas*: a by-injection protocol and a by-cohabitation protocol. For all trials, the seawater was filtered, UV treated and maintained at 21 °C with adequate aeration and without the addition of food. For the large volume tanks (150 L), a recirculating system was used to optimize the horizontal transmission of the disease. The salinity ranged between 29.5 and 36.7‰ for all trials.

For the by-injection protocol, pathogenic agents were directly injected into the adductor muscles of oysters to test their disease resistance. First, oysters were "anesthetized" in a solution containing magnesium chloride ($MgCl_2$, 50 g/L) in a mixture of seawater and distilled water (1:4, v:v) for 4 h. Subsequently, 50 μ L of the infectious solution (bacterial or viral suspension) was injected into the adductor muscle using a 1 mL micro-syringe equipped with an 18 g needle. The injected oysters were either naïve oysters of the selected or control lines or naïve unselected hatchery-produced oysters that were used as "sources" for the horizontal transmission of the disease to the selected and control lines through a by-cohabitation protocol.

For the by-cohabitation components, we used the protocols previously described in [24, 25]. As described for the by-injection protocol, naïve and unselected hatchery-produced oysters were injected with a specific pathogen and then transferred into tanks for 24 h. Then, they were placed in contact with the naïve



oysters of the selected and control lines to test their disease resistance. A ratio of 10 g of injected oysters (with the shell) per 10 L of sea water was used for all of the experiments. A dead oyster was defined as a moribund animal that was unable to close its valve after 5 min out of the water.

Trial 1: experimental infection by cohabitation between oysters injected with OsHV-1 and the selected and control lines

An experimental infection with OsHV-1 was performed in April 2013 to verify the higher resistance to OsHV-1 infection of the selected lines AS and BS compared with the control lines AC and BC. The oysters were 13 months old, and the mean individual weight was 22 g (Table 1). The AS, BS, AC and BC lines were evaluated throughout the cohabitation with oysters injected with a viral suspension as described above. For each line (AS, BS, AC and BC), four 5 L replicate tanks were used; each tank contained 10 oysters (Table 1). For three replicates, 4 oysters injected with the viral suspension were added to each

tank for 48 h. In the fourth tank, 4 oysters injected with SASW were added for 48 h. The mortality was recorded daily for 11 days.

Trial 2: experimental infection by injection of the selected and control lines with *V. aestuarianus*

The design of this trial consisted of intramuscular injection of the oysters with suspensions with different bacterial concentrations. The bacterial concentration was evaluated spectrometrically at 600 nm and adjusted to an optical density (OD) = 1; then, the suspension was serially diluted to obtain theoretical ODs of 0.0002, 0.002, 0.02 and 0.2, corresponding to 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 bacteria per mL, respectively. The bacterial concentration and purity were verified by plating. Three 5 L tanks were used for each OD and each line; each tank contained ten oysters injected with 50 μ L of *V. aestuarianus* (500 CFU at OD 10^4 and 0.5 million CFU at OD 10^7). For each line, an additional tank was used as a control; this tank contained 10 oysters injected with SASW. Observations for mortality were performed daily for 6 days.

Table 1 Summary of the trials and sets to evaluate OsHV-1 and *V. aestuarianus* susceptibility.

Trial	1	2	3	3	3	3	3	4	4
Set			1	2	3	4	5 ^a	1 ^b	2 ^c
Pathogen	OsHV-1	<i>Vibrio aestuarianus</i>							
Infection protocol	Cohabitation	Injection	Cohabitation						
Number of exposure	1st infection	1st infection	1st infection	1st infection	1st infection	1st infection	1st infection	2nd infection	3rd infection
Date of challenge	Apr 2013	Jan 2013	Feb 2013	Mar 2013	Mar 2013	May 2014	Nov 2014	May 2014	Nov 2014
Age (months)	13	10	11	12	13	26	32	26	32
Individual weight (g)	22	22	22	22	22	120	100	100	170
Stage	Juvenile	Juvenile	Juvenile	Juvenile	Juvenile	Adult	Adult	Adult	Adult
Number of tanks ^f	12	48	3	3	8	2	2	1	1
Tank volume (L)	5	5	150	150	10	150	150	150	150
Lines tank ⁻¹	1	1	4	4	1	4	4	4	3 ^d
Oysters line-1 tank ⁻¹	10	10	25	25	15–20	24–32	28–33	1–88 ^e	1–30 ^e
OsHV-1 detection in moribunds	Yes	No							
<i>V. aestuarianus</i> detection in moribunds	No	Yes							

For all trials, two unselected and control lines (AC and BC) and two lines selected for their higher resistance to OsHV-1 (AS and BS) were evaluated under controlled conditions

^a Oysters used were survivors from field testing

^b Oysters used were survivors from sets 1 to 3 of trial 3

^c Oysters used were survivors from set 1 of trial 4

^d One of the control line had 100% mortality before the trial

^e Selected lines had at least 28 and 12 oysters in sets 4 and 5, respectively, whereas the control lines had less than 5 oysters

^f The number indicated is without the control tanks

Trial 3: primary infection by cohabitation between oysters injected with *V. aestuarianus* and the selected and control lines

Five sets of trials using a by-cohabitation protocol were used to better mimic natural infection. For each trial (with the exception of set 3), three 150 L tanks were used to challenge a larger number of larger animals at the same time. An additional tank was used for the controls, which consisted of oysters intramuscularly injected with SASW and placed as sources in contact with the four lines (Table 1). In each tank, the oysters of the four lines were randomly placed together in the same tank with 25 oysters per line with the shells individually tagged for identification. For set 3 of trial 3, two 10 L tanks were used per line; each tank contained approximately 15–20 oysters (Table 1).

The five sets of trial used to evaluate the resistance of the four lines AS, AC, BS and BC to *V. aestuarianus* are summarized in Table 1 and Figure 2:

- Three sets were performed in February and March 2013. The naïve oysters were 11–13 months old and weighed 22 g (Table 1), which corresponded to the juvenile stage according to the oyster industry. All oysters were always kept in our facilities, and no mortality was recorded.
- The fourth set was conducted during spring 2014. The oysters were 26 months old, and the mean individual weight was 120 g (Table 1), which corresponded to the adult stage. The oysters were always kept in our facilities, and no mortality was recorded.

- The fifth set was conducted during the fall of 2014 with oysters kept for 2 years in the field at Agnas (Charente Maritime, France). The control and selected oyster lines experienced 70 and 34% mortality, respectively. The oysters were 32 months old, and the mean individual weight was 100 g.

Trial 4: successive infections by cohabitation of oysters injected with *V. aestuarianus* and the selected and control lines

All oysters that survived sets 1–3 in trial 3 were again challenged in trial 4 with two additional successive challenges in May 2014 and November 2014 (Figure 2). Between trial 3 and the first set in trial 4 and between the two sets of trial 4, the oysters were kept at the Ifremer facilities in La Tremblade. All effluent from the holding facilities was treated with chlorine. The occurrence of mortality was also recorded during these periods. In set 1 of trial 4, the oysters were 26 months old with an average weight of 100 g, whereas in set 2 of trial 4 the oysters were 32 months old with an average weight of 170 g (Table 1).

Detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA

For all of the trials, moribund oysters from the selected and control lines were sampled for the detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA. Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle + gills) using the QIAgen (Hilden, Germany) QIAamp tissue mini kit combined with the QIAcube automated system according to the manufacturer's protocol. The total DNA amount was adjusted to 5 ng/μL following Nanodrop (Thermo Scientific) measurement.

A real-time PCR assay was conducted on the MX3000 and MX3005 Thermocyclers (Agilent) using the Brilliant III Ultrafast kit (Stratagene). Each reaction was run in duplicate in a final volume of 20 μL containing the DNA sample (5 μL at a 5 ng/μL concentration), 200 nM of each primer (for OsHV-1, DPF 5' ATT GAT GATGTG GAT AAT CTG TG 3' and DPR 5' GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGTTC 3' [26] and for *V. aestuarianus*, DNAj-F 5' GTATGAAATTTAACTGACCCACAA3' and DNAj-R 5' CAATTTCTTTTGAACAACCAC 3' [27]) and 200 nM of an oligonucleotide probe (for *V. aestuarianus* DNAj, probe 5' TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC). The real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s and 60 °C for 20 s. For OsHV-1 DNA quantification, melting curves were also plotted (55–95 °C) to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. Negative controls (without DNA) were included.

Evaluation of the immune status of the selected and control lines

The immune statuses of the oyster lines were evaluated based on the expression of immune-related genes in the AS, AC, BS and BC lines prior to trial 3 set 1 at 12 months and trial 3 set 5 at 32 months. Immune-related genes were selected based on previous studies showing their transcriptomic regulation following vibrio challenge or between oyster lines selected for their resistance/sensitivity to in situ mortality [16, 18]. Oysters were removed from their shells, and the whole soft body was immediately plunged into liquid nitrogen. Then, the oysters were pulverized in groups (three groups of 10 oysters per oyster line) with a Mixer Mill MM 400 (Retsch) under liquid nitrogen conditions. The frozen oyster powder was stored at –80 °C prior to RNA extraction for gene expression analysis.

RNA extraction from the frozen oyster powder was performed with the TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 mg of oyster powder was homogenized in 1 mL of TRIzol by vortexing for 1 h at 4 °C. Next, the RNA samples were treated with 5 U of DNase I (Invitrogen) to eliminate DNA contamination according to the manufacturer's instructions, followed by RNA precipitation to eliminate the degraded DNA (with 100% isopropyl alcohol and 3 M Na-acetate). Then, the RNA samples were dissolved in 50 μL of RNase-free water and quantified using a *NanoDrop* spectrophotometer (Thermo Scientific). The integrity of the total RNA was verified using 1.5% agarose gel electrophoresis. Finally, total RNA was reverse transcribed using the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

qPCR assays were performed on the Light-Cycler 480 System (Roche) in a final volume of 5 μL containing 1 × Light-Cycler 480 master mix, 0.5 μM of each primer and 1 μL of cDNA diluted 1/8 in sterile ultra-pure water. The primer pairs used to amplify the 31 immune-related genes are listed in Table 2. Primer pair efficiencies (E) were calculated by five serial dilutions of pooled cDNA ranging from 1/2 to 1/64 in sterile ultra-pure water using the slopes provided by the LightCycler software according to the equation: $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$. The qPCR program was composed of an initial denaturation step of 15 min at 95 °C, followed by amplification of the target cDNA (35 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 57 °C for 20 s and extension at 72 °C for 25 s with fluorescence detection). Relative expression levels of the immune-related genes were calculated with the method described by Pfaffl [28] and normalized using the mean of values of three constitutively expressed genes (*Cg-EFI* [GenBank

Table 2 Primers and functional categories of the analyzed immune-related genes.

Gene number	Functional category	Name	Sense primer	AntiSense primer
72	Immune response	Metallothionein a	CAGCTCACACAGTCCCTTC	CATGTACAGTTACACGATGC
122	Immune response	Universal stress protein	TTGAGGTTTCCGTGAACGAG	AACAATCACCGGAAGTACG
130	Immune response	Interferon-induced protein 44	AAGATCCAACGATGAAAGAC	TTGTCGACATCACTACAAC
163	Immune response	Big defensin	TTCGCCTGCTTCCATACTGG	GTCATGGTCACTCCTTATTC
189	Immune response	C-type lectin 2 like protein	GTCATCTGACCACAATTACAG	TCGTAGCAGCATTCCAGAG
220	Immune response	MyD88 adaptor	AGGTACCGCTGTGATACGA	TTCAAACGCCCAAGACTG
234	Immune response	Tumor necrosis factor ligand super-family	GGATACGCAAGAGGAAGTGC	TGGACATTAACGACACGCGC
293	Immune response	Interleukin 17	ACTGAGGCTCGATGCAAGTG	AGCCTTCTTGCTTCATGTGG
300	Immune response	Heat shock protein 70	GCATGTGAGCGAGCAAACG	TGGCAGCTTGAACAGCAGC
303	Immune response	Galectin	ACGAAACGCTCTGATTGGTG	TTAGTGGCATGGTAGGTCTG
304	Immune response	L-rhamnose-binding lectin	AGATGATTGTGAAAGCAGCGA	ACTGTAGCGGTATGCTCTG
306	Immune response	Proline rich protein	CACCATGTTCTCTCGGAGGA	GTCGCAATGTTAACCTCAG
307	Immune response	Hemocyte defensin	GTTGTAGAGCGGGCTACTGTG	CTTGGTCAGATTCAGACTGG
351	Immune response	Metallothionein b	GGAAGTGTAGCTGTGGAGAC	CCTTCTTACAGCAGCAGTGC
399	Immune response	Metallothionein c	ATGTCGGATCATTGTTCTCG	ACAGGTTTCTGGTCCGTGAC
8	Cellular differentiation	Angiopoietin-1 receptor a	TGACGTGCTCGCAACATGC	CATTGTGTCCCGTGAAGCC
312	Cellular differentiation	Angiopoietin-1 receptor b	CGAAATCGTCTTACGAACGC	GTTAGCAAGATCCCGTTGAG
324	Cellular differentiation	Early growth response protein	CTACCTCCACAAGCGCATG	ACGTCGTTACTATGTGAGGG
216	Cellular differentiation	Placental protein 11	GCCAGATTTACCTGGAATGG	ATGCGGTGTAGATAGCGATG
375	Cellular differentiation	GTP-binding protein Di-Ras2	TTGGGCGTACAGTGACAACC	TCTCTGTTCTCTGTAACC
396	Cytoskeleton reorganization	Acyl-CoA desaturase	AGATGCAGACCCACACAACG	CGGTTCCAAAGTGAATCTCC
401	Cytoskeleton reorganization	Neurotrypsin	AAACAATGCAAGGGAGAAGC	CTATTGTCAGCAACAATCTGG
441	Cytoskeleton reorganization	Major vault protein	TTCAAGAGTCAAGTGGATGC	ACCATTGGCGGTATTGAAGG
439	Cytoskeleton reorganization	Myosin essential light chain	TACATAACGGGTCATGAGAC	CAACTGGAATACCACCTG
348	Cytoskeleton reorganization	Calcineurin subunit B isoform 1	ACGGTGTATTCTTGTGTCC	TCTTCTGTACATGCAAGTGG
284	Cell adhesion-communication	Integrin beta-PS	CCCACCTAGTGCCAGTCAAG	GAACCTTGTACTGTGTGACGT
420	Cell adhesion-communication	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor precursor	TCGTGAATGCTGAACACACC	TACACCTGTCCAAACCAAGG
283	Respiratory chain	Extracellular superoxide dismutase	AGAGGTGAATGCTACCAGG	AGGCCAAGAATCCGCTCTG
422	Respiratory chain	Glutathione transferase omega-1	TTGGACAGGTTACCACACAG	CAAACCAAGGCCATACCATG
378	Pro- and anti-apoptosis	Caspase 7	AGGGAGACAAGCGCCGTCAG	TCCTCATTGTCTTCTGTTTC
166	No hit	Unknown gene product 166	AAGTCGTATAGGAGCACAGG	GGCTGAGAACAATACTCTCC

AB122066], *Cg-RPL40* [GenBank FP004478] and *Cg-RPS6* [GenBank HS119070]).

Statistical analyses

Survival was analyzed with the SAS 9 software using the GLIMMIX procedure by a logistic regression for binomial data. The general model for the first trial was:

$$Y_i = \text{Logit}(\pi) = \ln \frac{\pi}{1 - \pi} = \mu + \text{stock}_i + \text{selection}_j + \text{stock}_i * \text{selection}_j + \varepsilon$$

where Y_i was the survival probability, μ was the intercept, stock_i represented stock A or line B, and selection_j represented the level of selection for OsHV-1 resistance (selected or control).

For trial 2, the bacterial concentration factor and all interactions between the bacterial concentrations, the stock and the selection factors were added to the model.

For the first three sets of challenges in trial 3, the set factor and its interactions were added to the model. A similar model was also used for the last two sets of challenges in trial 4.

For the gene expression analysis, statistical analysis was performed using the STATISTICA software version 7.1 (StatSoft) using the Mann-Whitney U test (significant value: $p < 0.05$). Hierarchical clustering of the gene expression data was performed with the Multiple Array-Viewer software using the average linkage clustering with the Spearman Rank Correlation as the default distance metric.

Results

Trial 1: experimental infection by cohabitation between oysters injected with OsHV-1 and the selected and control lines

No mortality occurred in the control tanks for each line (AC, AS, BC and BS). The first mortality occurred on day 2, and a peak of mortality was observed on day 5. As expected, the selected oysters presented low mortality (3 and 7% for AS and BS, respectively), whereas the control oysters had significantly higher mortality (60 and 67% for AC and BC, respectively, $p < 0.001$). The mean mortality was 32 and 37% for stocks A and B, respectively. The mortality between these stocks was not significantly different. Moreover, no difference was observed for the interaction between the stocks and the level of selection for resistance to OsHV-1 infection ($p > 0.05$). High amounts of OsHV-1 DNA was detected in all of the moribund oyster samples analyzed ($n = 31$).

Trial 2: experimental infection by injection of the selected and control lines with *V. aestuarianus*

No mortality was observed for oysters injected with SASW in the control tanks. The mortality rates of each line at each injected dose are shown in Figure 3. Very high mortality ranging from 77 to 100% was observed for all lines regardless of the infectious dose. None of the factors were significant with the exception of the bacterial concentration factor ($p = 0.0003$) and the interaction between the stock and level of selection ($p = 0.0005$) (Table 3). At the stock level, the selected line exhibited lower mortality compared to the control line for stock B at each bacterial concentration; the opposite effect was observed for stock A at the two lowest concentrations (Figure 3). The mortality at the lowest bacterial

Table 3 Logit analysis of mortality in Trial 2.

Effect	DF	F	P
Stock	1	2.42	0.1207
Selection	1	0.6	0.4374
Bacterial concentration	3	6.29	0.0003
Stock × selection	1	12.23	0.0005
Stock × bacterial concentration	3	1.31	0.2708
Selection × bacterial concentration	3	0.5	0.6801
Stock × selection × bacterial concentration	3	2.06	0.1042

Oyster lines were challenged at the juvenile stage for primary infection by injection of *V. aestuarianus* for the control and selected lines of both stocks and at different doses

concentration was significantly lower compared to the mortality at the other concentrations ($p < 0.0001$).

Trial 3: primary infection by cohabitation between oysters injected with *V. aestuarianus* and the selected and control lines at the juvenile and adult stages

Primary exposure with the *V. aestuarianus* cohabitation protocol at the juvenile stage (sets 1 to 3)

No mortality occurred in the control tanks of each set of trial 3. All moribund oysters sampled were positive for *V. aestuarianus* DNA ($n = 45$). The mortality of each line at the endpoint for the first three sets of trial 3 (corresponding to the juvenile stage) is presented in Figure 4. In contrast to the by-injection protocol, higher variability in mortality was observed among the lines, with a range from 6 to 90%. A significant interaction was found between the sets and selection ($p = 0.0008$) (Table 4); this interaction was explained at the selection level, with higher mortality observed in set 1 compared to set 3 for the selected lines and the highest mortality observed in

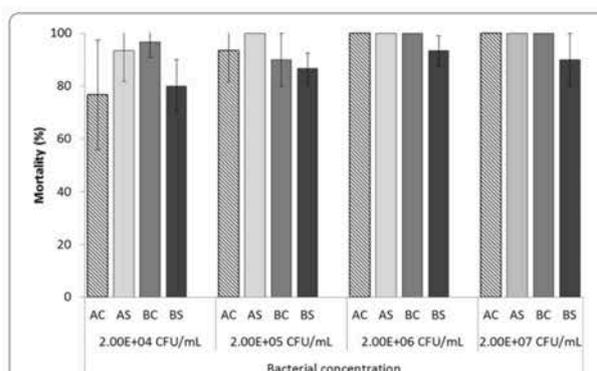


Figure 3 Mean mortality (sd between tanks) in Trial 2. Oyster lines were challenged at the juvenile stage via intramuscular injection of *V. aestuarianus* for the control (AC and BC) and selected lines (AS and BS) at different bacterial concentrations.

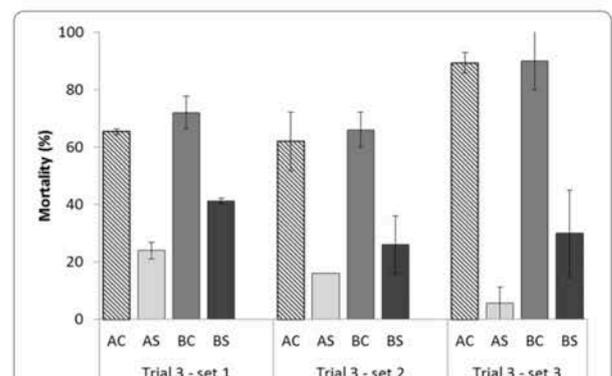


Figure 4 Mean mortality (sd between tanks) in Trial 3 sets 1 to 3. Oyster lines were challenged at the juvenile stage via cohabitation challenges between oysters injected with *V. aestuarianus* and healthy juveniles of the control (AC and BC) and selected lines (AS and BS).

Table 4 Logit analysis of mortality in Trial 3 sets 1 to 3.

Effect	DF	F	P
Set	2	2.41	0.0909
Stock	1	7.46	0.0065
Selection	1	107.19	<.0001
Set × stock	2	0.43	0.6518
Set × selection	2	7.25	0.0008
Stock × selection	1	3.81	0.0515
Set × stock × selection	2	0.64	0.8576

Oyster lines were challenged at the juvenile stage for a primary infection throughout 3 sets of cohabitation between oysters injected with *V. aestuarianus* and the control and selected lines of both stocks

the control lines in set 3 (Figure 4). The mean mortalities of the three sets were 14 and 33% for the AS and BS lines, respectively; this mortality was significantly lower than the mortality observed for the control lines (71 and 80% for AC and BC, respectively, $p < 0.0001$) (Table 4). To a much lesser extent, stock A had significantly lower mortality (43%) than stock B (53%) ($p = 0.0065$).

Primary exposure with the *V. aestuarianus* cohabitation protocol at the adult stage (sets 4 and 5)

For the fourth set of trial 3, the mortality was 87, 45, 62 and 70% for the AS, AC, BS and BC lines, respectively; the mortality decreased to 49, 32, 36 and 53%, respectively, in the fifth set of challenges in trial 3 (Figure 5). None of the factors were significant with the exception of a significantly lower mortality in the fifth set compared to the fourth set ($p = 0.0002$) and a significant interaction between the stocks and level of selection ($p = 0.0012$) (Table 5). At the stock level, the stock A control line

Table 5 Logit analysis of mortality in Trial 3 set 4 and 5.

Effect	DF	F	P
Set	1	13.85	0.0002
Stock	1	0.00	0.9557
Selection	1	2.23	0.1368
Set × stock	1	0.40	0.5278
Set × selection	1	2.39	0.1233
Stock × selection	1	10.72	0.0012
Set × stock × selection	1	0.82	0.3648

Oyster lines were challenged at the adult stage for a primary infection throughout 2 sets of cohabitations between oysters injected with *V. aestuarianus* and the control and selected lines of both stocks

had significantly lower mortality than the selected line, whereas the opposite trend was observed for stock B (Figure 5).

Expression levels of immune-related genes can discriminate oyster lines in terms of susceptibility/resistance to *V. aestuarianus* infection at the juvenile and adult stages

The hierarchical clustering of the 31 immune-related genes or only the differentially expressed genes ($p < 0.05$) could separate the oyster lines in terms of their resistance/sensitivity to bacterial infection at the two developmental stages analyzed (12 and 32 months, Figure 6). At 12 months of age, hierarchical clustering of the gene expression data separated the oyster lines into two major clusters of conditions: the first cluster included the AS and BS lines, while the second cluster included the AC and BC lines (Figure 6A). At 32 months of age, two major clusters of conditions were found that were similar to those observed for the 12 month old oysters, but the oyster lines did not separate in the same manner (Figure 6B): the first cluster included the AC and BS lines, whereas the second cluster included the AS and BC lines. Interestingly, these discriminations of the oyster lines were in accordance with the resistance/sensitivity to infection of the lines at 12 and 32 months of age.

In the juveniles, 11 genes showed differential gene expression patterns, while in the adults only 7 genes showed differential expression patterns. Among these differentially expressed genes, four genes were common to juveniles and adults (306, 283, 284 and 304). These four genes showed the same patterns of expression in the juveniles and adults according to their resistance/sensitivity to infection. Thus, genes expressed at higher levels in the susceptible lines (AC and BC) vs. the resistant lines (AS and BS) in juveniles also appeared to be expressed at higher levels in the susceptible lines (AC and BS) vs.

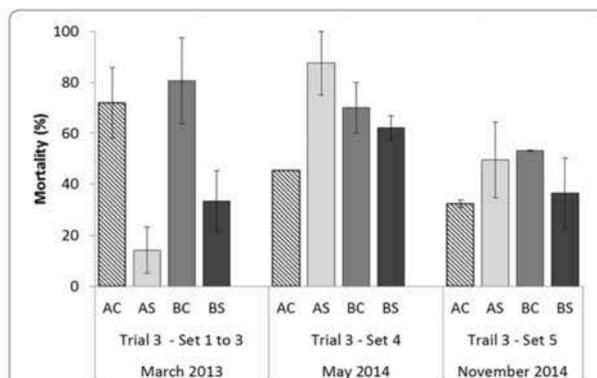
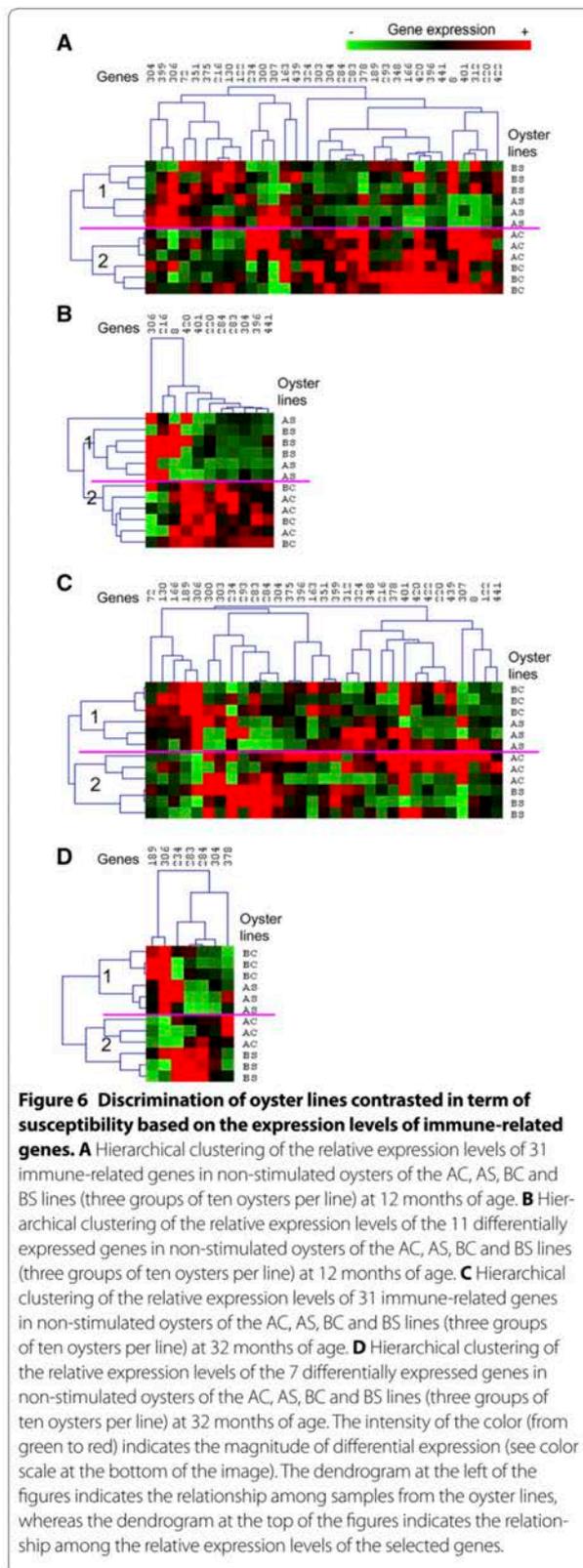


Figure 5 Mean mortality (sd within I) in Trial 3 sets 4 and 5. Oyster lines were challenged at the juvenile stage for the three first sets of trial 3 and at the adult stage for sets 4 and 5 of trial 3 via cohabitation challenges between oysters injected with *V. aestuarianus* and healthy juveniles of the control (AC and BC) and selected lines (AS and BS).



the resistant lines (AS and BC) in adults (genes 283, 284 and 304). Likewise, the gene expressed at a higher level in the resistant lines (AS and BS) vs. the susceptible lines (AC and BC) in juveniles also appeared to be expressed at a higher level in the resistant lines (AS and BC) vs. the susceptible lines (AC and BS) in adults (gene 306). Other differentially expressed genes appeared to be associated with one developmental stage: 7 genes were found to be differentially expressed only in juveniles (216, 8, 420, 401, 220, 396 and 441), and 3 genes were found to be differentially expressed only in adults (189, 234 and 378).

Trial 4: successive infections by cohabitation between oysters injected with *V. aestuarianus* and the selected and control lines

After the three first sets of bacterial challenges of trial 3, the final mortality was 14, 71, 33 and 80% for AS, AC, BS and BC, respectively. During the period between trials 3 and 4, the survivors were kept in a tank with filtered and UV-treated seawater enriched with microalgae. Although this period did not represent a disease challenge, the survivors still experienced significant mortality associated with the detection of *V. aestuarianus* DNA in the moribund oysters. Most of the mortality was observed in July 2013 after a spawning event. The mortality between trial 3 and the first set of challenges of trial 4 was 74, 90, 32 and 97% for AS, AC, BS and BC, respectively (Table 6); consequently, the cumulative mortality due to *V. aestuarianus* before trial 4 reached 78, 96, 54 and 99%, respectively. Although the control lines were tested in trial 4, the remaining oysters numbered less than 5. Therefore, the mortality was not compared with the selected lines. During the first set of challenges in trial 4, the mortality was 46 and 28% for AS and BS, respectively (Table 5). No significant difference in mortality (<5%) was reported between the two sets of challenges in trial 4. Finally, the survivors exhibited some mortality, with 60 and 38% mortality for AS and BS, respectively (Table 6). The cumulative mortality after three successive challenges with *V. aestuarianus* in trials 3 and 4 (including the mortality between trials) was 96, 99, 84 and 100% for AS, AC, BS and BC, respectively (Table 6).

Discussion

While mortality related to OsHV-1 and *V. aestuarianus* was reported in *C. gigas* in France prior to 2008 [27, 29], their impact on French oyster production became predominant due to recurrent and intense mortality in spat and adult oysters. While selective breeding to enhance resistance to OsHV-1 infection in *C. gigas* has been recently demonstrated [11, 15], this demonstration is under investigation for *V. aestuarianus*. Nevertheless, this study aimed to elucidate whether selective pressure

Table 6 Mortality rates per line during three successive challenges.

	AS	AC	BS	BC
Initial number of oysters	160	153	165	155
Mean mortality of sets 1 to 3 of trial 3 (Feb to Mar 2013) (%)	14	71	33	80
Mortality between trial 3 and the first set of trial 4 (%)	74	90	32	97
First set of trial 4 in Mar 2014 (%)	46	40	28	100
Mortality between the two sets of trial 4 (%)	<5	<5	<5	–
Second set of trial 4 in Nov 2014 (%)	60	0	38	–
Final oysters number remaining after three successive challenges	6	1	26	0
Cumulated mortality after three successive challenges (%)	96	99	84	100

Cumulative mortality by cohabitation between oysters injected with *V. aestuarianus* and the control (AC and BC) and selected lines (AS and BS) are shown from sets 1, 2, and 3 of trial 3 and sets 1 and 2 of trial 4

In italics, the number of oysters was less than 5

exerted by viral infections in the field could impact the susceptibility of *C. gigas* to bacterial infection.

In trial 1, the selected lines of both stocks exhibited much lower mortality (AS 3% and BS 7%) than the control lines (AC 60% and BC 67%). Although higher mortality was observed in the field evaluation (50 and 35% for AS and BS, respectively, and 91 and 94% for AC and BC, respectively [11]), our result was consistent with the field evaluation and supported that selection to enhance survival in *C. gigas* spat was effective for herpes virus infection. The lower mortality observed in our study could be explained by the use of larger (20 g versus <7 g) and older (13 months old versus <5 months old) oysters (juvenile versus spat) because OsHV-1 resistance increased with age and size [21]. However, the most important information from trial 1 was the confirmation that AS and BS had higher resistance to OsHV-1 infection than AC and BC before their evaluation of exposure to *V. aestuarianus*.

In trial 2, the mortality of three of the lines reached 100%. The mortality for BS was >90% at higher bacterial concentrations corresponding to 5×10^4 and 5×10^5 CFU per oyster (Figure 3). Although the mortality was slightly lower at the lowest bacterial concentration (corresponding to 500 CFU per oyster and ranging from 76 to 96%; Figure 3), this finding confirmed that strain 02/041 was a highly virulent strain in *C. gigas* juveniles (20 g); this finding was recently demonstrated in spat weighing 1.5 g that exhibited high mortality (>75%) at doses of 10^2 and 10^7 CFU per spat [30]. Consequently, selective breeding to enhance higher resistance to OsHV-1 at the spat stage but does not confer higher resistance to *V. aestuarianus* infection at the juvenile stage. Injection of the bacteria directly into the adductor muscle may bypass the

oysters' natural barriers to infection by *V. aestuarianus*. Due to the high mortality observed for all lines when the injection method is used, the cohabitation method should be applied to evaluate the resistance to *V. aestuarianus* infection of the control and the selected lines because transmission of the bacteria between oysters is what is expected to occur under natural conditions.

The three sets of trial 3 were performed at the juvenile stage, and all exhibited the same mortality patterns. The main finding revealed that the selected lines AS and BS had lower mortality than the control lines AC and BC (Figure 4). This result suggested that selection to increase survival at the spat stage in the field was also efficient in enhancing dual resistance to OsHV-1 infection and *V. aestuarianus* infection at the juvenile stage. A similar result was observed in *Crassostrea virginica* for dual resistance to *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus marinus* [31], but most studies revealed that breeding for higher resistance to a disease did not confer a higher resistance to another disease [32].

Controversially, this pattern was not found at the adult stage, where much higher mortality was observed for both of the selected lines (particularly the AS line). Indeed, line AS exhibited 87% mortality in set 4 of trial 3, whereas the control line AC had lower mortality (45%) (Figure 5). Additionally, while the AS line had higher mortality in adults than in juveniles, the AC line had lower mortality at the adult stage (45%) than at the spat stage (71%) (Figure 5). This same pattern was observed for BS and BC to a lesser extent, except that BS had lower mortality than BC at the adult stage (Figure 5). A similar pattern was observed in set 5 of trial 3, although the mortality was lower than the mortality recorded in set 4 of trial 3. For set 5 of trial 3, it is important to note that the oysters were survivors of field mortality events that could have been related to OsHV-1 and/or *V. aestuarianus* and/or other pathogens. Consequently, the survivors used in set 5 were likely to be genetically more resistant than the naïve oysters used in set 4, as demonstrated for the summer mortality phenomenon in *C. gigas* [33]. Another hypothesis could be related to the reproductive status. Sets 4 and 5 of trial 3 occurred in May and November of 2014, which represented the pre- and post-spawning periods, respectively. Previous experiments have shown that the active gametogenesis period corresponds to higher susceptibility to vibriosis in mollusks [34–37]. Consequently, primary infection of *C. gigas* with *V. aestuarianus* by cohabitation showed a different mortality pattern according to the stage of development and the level of selection. Hence, evaluation of vibriosis resistance in *C. gigas* represents a complex interaction between the genotype and the stage of development, and therefore the size, reproductive status and age of

the oysters as described for OsHV-1 in *C. gigas* [21, 33, 38]. Our study also revealed that selecting for resistance to OsHV-1 infection in spat did not confer either higher resistance or susceptibility to *V. aestuarianus* infection in adults, which was in agreement with similar studies in oyster species [39–41]. Experimental studies working on *V. aestuarianus* should replicate the oyster genotypes. The difference in mortality between the four lines used in our study also suggested a genetic basis for *V. aestuarianus* resistance in *C. gigas*, but this speculation required further investigation.

Our results showed high variability in the expression of selected immune-related genes that was dependent on the animal batch and age. This variability allowed the discrimination of oyster batches and correlated with their sensitivity to bacterial infection. Interestingly, expression of this set of immune-related genes was correlated with sensitivity to vibriosis rather than the genetic background. Because sensitivity to infection evolved depending on the oyster stage tested, the clustering of oyster batches also evolved in an age-dependent manner. At the juvenile stage, the lines selected for their resistance to OsHV-1 infection that presented low sensitivity to vibriosis were clearly discriminated from the control lines that presented higher sensitivity to *V. aestuarianus* infection. At the adult stage, selected line A and control line B showed intermediate sensitivity to vibriosis and were discriminated from control line A and selected line B with higher sensitivity to *V. aestuarianus* infection. Our results showed for the first time the possibility of using gene expression analysis to discriminate between oyster lines according to the resistance/susceptibility at two different developmental stages independent of the genetic background of the oyster lines. Specifically, four genes discriminated between the oyster lines according to their resistance/susceptibility.

These four genes are associated with different immune functions and suggest a complex discrimination of oyster lines through their immune status. The four genes able to discriminate oyster lines are related to antimicrobial functions (the proline rich peptide *Cg-prp* [42]), anti-oxidative responses (the extracellular superoxide dismutase *Cg-SOD* [43]), cell adhesion (the *Integrin beta-PS* [44]) and recognition molecules (the *L-rhamnose-binding lectin* [45]). These results show that it is now necessary to develop global transcriptomic approaches to clearly elucidate the transcriptomic basis of the resistance/susceptibility of oysters.

Finally, trial 4 was designed to test the effect of successive challenges using survivors of a previous challenge. The survivors of an initial exposure to *V. aestuarianus* still exhibited significant mortality in response to the same pathogenic agent at the second exposure. Consequently,

the survivors were not genetically resistant, but they were either less susceptible during the previous exposures or the infection cohabitation did not allow equal exposure of the oysters to the bacteria. Thus, a first contact with *V. aestuarianus* is not protective. This mortality pattern was also found in the abalone *Haliotis tuberculata* during two successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi* [46]. Our result contrasted with the results obtained for the summer mortality phenomenon and OsHV-1, for which the survivors were selected for resistance and exhibited low mortality the following year [33, 38]. Between trials 3 and 4, mortality due to *V. aestuarianus* was mostly observed after a spawning event, thereby reinforcing the importance of the reproductive status on the resistance to the bacteria. Post-spawning oysters were much more susceptible to the disease, as demonstrated with the mortality event due to opportunistic *Vibrio* sp in *C. gigas* [34, 37, 47] and OsHV-1 in *C. gigas* that occurred a couple of days after spawning [48]. Otherwise, the cumulative mortality after three successive exposures to *V. aestuarianus* was very high for all lines (ranging from 84 to 100%) (Table 6). These mortality rates are extremely concerning for French oyster farmers, who cannot continue to remain feasible with this level of loss of *C. gigas* in their oyster stocks.

In conclusion, our study showed that: (1) cohabitation between injected oysters and healthy oysters seemed to be preferable for the genetic evaluation of *V. aestuarianus* resistance in *C. gigas* compared to intramuscular injection; (2) the mortality pattern for primary exposure to *V. aestuarianus* at the juvenile stage was similar to the pattern observed for OsHV-1 infection, with a higher resistance in selected oysters than control oysters, which suggested dual resistance at the juvenile stage; (3) differences in the mortality patterns were highlighted between juveniles and adults during primary infection, suggesting a complex interaction between the genotype and the stage of development for *Vibrio* sensitivity; and (4) selection of immune-related genes allowed for the discrimination of batches depending on their sensitivity to infection at the two stages tested rather than on their genotype. The differences in mortality among the lines also suggested a genetic basis for the resistance to *V. aestuarianus* infection. Similarly, selection to enhance OsHV-1 resistance did not confer increased susceptibility or resistance to *V. aestuarianus* infection. Therefore, to improve resistance to *V. aestuarianus* infection, a breeding program needs to use high intensities of selective pressure. Resistance to *V. aestuarianus* infection should be evaluated through successive exposures to the disease because the oysters remained susceptible to *V. aestuarianus* even if they survived one or several mortality outbreaks related to the disease. Breeding companies

interested in enhancing *Vibrio* resistance should use oysters that were previously selected for resistance to OsHV-1 infection at the spat stage for broodstock. Then, these broodstocks should be evaluated at the adult stage to combine the resistance traits.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. ²Ifremer, IHPE, UMR 5244, Univ. Perpignan Via Domitia, CNRS, Univ. Montpellier, 34095 Montpellier, France.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: PA, MAT and LD. Performed the experiments: PA, DT, MAT, JDL and LD. Analyzed the data: PA, JDL and LD. Wrote the manuscript: PA, MAT, JDL and LD. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We greatly thank Tristan Renault and Pierre Boudry for their support for the initial aim of this study. We thank the hatchery, nursery and genetic teams of the Laboratory of Genetics and Pathology of Marine Molluscs, Ifremer La Tremblade and Ifremer Bouin, for their assistance in oyster production. We thank the pathology team for technical support for the challenges in laboratory conditions. We gratefully acknowledge Agnès Vergnes for her technical support for the gene expression analyses and Aurélien Brun for his contribution to labeling the oysters. This study was supported by Ifremer through the research activity called "Amélioration par la sélection" and by the French Ministries of Ecology and Agriculture through the research activity called "AESTU".

Received: 31 July 2015 Accepted: 13 November 2015

Published online: 09 December 2015

References

- Comps M, Duthoit J-L (1976) Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. CR Acad Sc Paris Série D 283:1595–1597
- Grizel H (1985) Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, p 145
- Grizel H, Héral M (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). I C E S J Mar Sci 47:399–403
- Murray AG, Marcos-Lopez M, Collet B, Munro LA (2012) A review of the risk posed to Scottish mollusc aquaculture from *Bonamia*, *Marteilia* and oyster herpesvirus. Aquaculture 370:7–13
- Martenot C, Fourour S, Oden E, Jouaux A, Travaille E, Malas JP, Houssin M (2012) Detection of the OsHV-1 mu Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). Aquaculture 338:293–296
- Ségarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. Virus Res 153:92–99
- Francois C, Joly J-P, Garcia C, Lupo C, Travers M-A, Pépin J-F, Hatt P-J, Arzul I, Omnes E, Tourbiez D, Faury N, Haffner P, Huchet E, Dubreuil C, Chollet B, Renault T, Cordier R, Hébert P, Le Gagneur E, Parrad S, Gerla D, Annezo J-P, Terre-Terrillon A, Le Gal D, Langlade A, Bedier E, Hittier B, Grizon J, Chabirand J-M, Robert S, Seugnet J-L, Rumebe M, Le Gall P, Bouchoucha M, Baldi Y, Masson J-C (2013) Bilan 2012 du réseau REPAMO—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins
- Francois C, Joly J-P, Garcia C, Lupo C, Travers M-A, Tourbiez D, Chollet B, Faury N, Haffner P, Dubreuil C, Serpin D, Renault T, Cordier R, Hébert P, Le Gagneur E, Parrad S, Gerla D, Cheve J, Penot J, Le Gal D, Lebrun L, Le Gac-Abernot C, Langlade A, Bédier E, Palvadeau H, Grizon J, Chabirand J-M, Robert S, Seugnet J-L, Rumebe M, Le Gall P, Bouchoucha M, Baldi Y, Masson J-C (2014) Bilan 2013 du réseau REPAMO—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins
- Francois C (2015) Bilan 2014 du réseau REPAMO—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins
- Pépin J-F, Soletchnik P, Robert S (2014) Mortalités massives de l'huître creuse. Synthèse—Rapport final des études menées sur les mortalités de naissains d'huîtres creuses *C. gigas* sur le littoral charentais pour la période de 2007 à 2012
- Dégremont L, Nourry M, Maurouard E (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 (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. Aquaculture 317:94–98
- Dégremont L, Bédier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture 299:21–29
- Dégremont L, Soletchnik P, Boudry P (2010) Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions and in comparison with field performance. J Shellfish Res 29:847–856
- Dégremont L, Lamy J-B, Pépin J-F, Travers M-A, Renault T (2015) New insight for the genetic evaluation of resistance to ostreid herpesvirus infection, a worldwide disease, in *Crassostrea gigas*. PLoS One 10:e0127917
- de Lorget J, Zenagui R, Rosa RD, Piquemal D, Bachère E (2011) Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. PLoS One 6:e23142
- Rosa RD, de Lorget 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
- Schmitt P, Santini A, Vergnes A, Dégremont L, de Lorget J (2013) Sequence polymorphism and expression variability of *Crassostrea gigas* immune related genes discriminate two oyster lines contrasted in term of resistance to summer mortalities. PLoS One 8:e75900
- Zhang L, Li L, Zhang G (2011) A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. Fish Shellfish Immunol 30:653–660
- Rosa RD, Santini A, Fievet J, Bulet P, Destoumieux-Garzon 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
- Dégremont L (2013) Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. Aquaculture 416:129–134
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin JF (2011) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Vet Res 42:27
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C (2010) A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microbial Ecol 59:787–798
- Schikorski D, Faury N, Pépin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T (2011) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. Virus Res 155:28–34
- De Decker S, Saulnier D (2011) Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. Fish Shellfish Immunol 30:691–699
- Webb SC, Fidler A, Renault T (2007) Primers for PCR-based detection of Ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. Aquaculture 272:126–139
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. J Microbiol Methods 77:191–197
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45

29. Garcia C, Thébault A, Dégremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, Chollet B, Francois C, Joly J-P, Ferrand S, Kerduou N, Renault T (2011) Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet Res* 42:73
30. Goudenège D, Travers M-A, Lemire A, Petton B, Haffner P, Labreuche Y, Tourbiez D, Mangenot S, Calteau A, Mazel D, Nicolas J-L, Jacq A, Le Roux F. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ Microbiol* (in press)
31. Ragone Calvo LMR, Calvo GW, Burreson EM (2003) Dual disease resistance in a selectively bred Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220:69–87
32. Dégremont L, Garcia C, Allen SK Jr (2015) Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review. *J Invertebr Pathol* 131:226–241
33. Dégremont L, Boudry P, Ropert M, Samain JF, Bédier E, Soletchnik P (2010) Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 299:44–50
34. De Decker S, Normand J, Saulnier D, Pernet F, Castagnet S, Boudry P (2011) Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J Invertebr Pathol* 106:179–191
35. Travers M-A, Le Goïc N, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol* 25:800–808
36. Travers MA, Basuyaux O, Le Goïc N, Huchette S, Nicolas JL, Koken M, Paillard C (2009) Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob Change Biol* 15:1365–1376
37. Wendling CC, Wegner KM (2013) Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and *Vibrio* infection to summer mortality phenomena in Pacific oysters. *Aquaculture* 412:88–96
38. Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, Pépin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact* 2:215–237
39. Burreson EM (1991) Susceptibility of MSX-resistant strains of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to *Perkinsus marinus*. *J Shellfish Res* 10:305–306
40. Dove MC, Nell JA, O'Connor WA (2013) Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). *Aquac Res* 44:1791–1800
41. Frank-Lawale A, Allen SK, Dégremont L (2014) Breeding and domestication of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) lines for culture in the mid-atlantic, USA: line development and mass selection for disease resistance. *J Shellfish Res* 33:153–165
42. Guéguen Y, Romestand B, Fievet J, Schmitt P, Destoumieux-Garzon D, Vandembulcke F, Bulet P, Bachère E (2009) Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol Immunol* 46:516–522
43. Gonzalez M, Romestand B, Fievet J, Huvet A, Lebart M-C, Guéguen Y, Bachère E (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1089–1097
44. Jia Z, Zhang T, Jiang S, Wang M, Cheng Q, Sun M, Wang L, Song L (2015) An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Dev Comp Immunol* 53:253–264
45. Roberts S, Goetz G, White S, Goetz F (2009) Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 11:24–44
46. Travers MA, Meistertzheim AL, Cardinaud M, Friedman CS, Huchette S, Moraga D, Paillard C (2010) Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *J Invertebr Pathol* 105:289–297
47. Li Y, Qin JG, Li XX, Benkendorff K (2009) Spawning-dependent stress responses in pacific oysters *Crassostrea gigas*: a simulated bacterial challenge in oysters. *Aquaculture* 293:164–171
48. Dégremont L, Guyader T, Tourbiez D, Pépin J-F (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* 408:51–57

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



III.3 Deuxième chapitre :

Infections expérimentales simples ou doubles avec *Vibrio aestuarianus* et OsHV-1 chez des huîtres creuses diploïdes et triploïdes aux stades naissain, juvénile et adulte.

Les résultats de ce travail ont été valorisés sous la forme d'une publication dans la revue Journal of Invertebrate Pathology : "Single or dual experimental infections with Vibrio aestuarianus and OsHV-1 in diploid and triploid Crassostrea gigas at spat, juvenile and adult stages." [198].

Le contexte de l'étude et une synthèse des principaux résultats obtenus est présentée ci-après.

Lors des épisodes de mortalités observés depuis 2012, il a été observé une co-détection fréquente d'ADN de OsHV-1 et de *Vibrio aestuarianus*. L'association d'agents pathogènes a été décrite lors de phénomène de mortalités. Les études suggèrent des interactions complexes entre les différents agents pathogènes. Les conséquences de la co-détection de *V. aestuarianus* et OsHV-1 sont encore peu documentées.

L'effet de la ploïdie dans les mortalités ne demeure pas clairement déterminé [54]. Certaines études conduites en conditions extérieures montrent que la triploïdie ne confère ni un avantage ni un inconvénient pour la survie à des infections par OsHV-1 chez *Crassostrea gigas* [199]. Il en est de même pour des infections par des *Vibrio* chez *C. virginica* [200]. Dans certaines études, les huîtres triploïdes ont montré de meilleures performances de survie que les huîtres diploïdes. C'est le cas de la résistance à *Haplosporidium nelsoni* ou *Perkinsus marinus* chez *C. virginica* aux Etats-Unis [201] ou la résistance aux infections par *Bonamia roughleyi* chez *Sarcostrea glomerata* en Australie [202].

L'effet de la ploïdie sur la résistance aux maladies a également été investiguée par des infections bactériennes expérimentales en utilisant des souches de *V. aestuarianus* et de *V. tasmaniensis*. Toutefois les résultats observés n'ont pas été probants [91]. Ces résultats ont notamment été mis en relation avec les différences d'allocation d'énergie entre huîtres diploïdes et huîtres triploïdes selon la période de l'année.

Bien que cela n'ait pas été précisément mesuré en conditions de laboratoire, les huîtres creuses du Pacifique triploïdes sont décrites sur le terrain comme étant plus sensibles à *V. aestuarianus* et subiraient des pertes plus importantes dans certains environnements que les animaux diploïdes issus du captage naturel (références des études du CREEA et Bassin Arcachon). Cette hypothèse a fait l'objet de nombreux débats au sein des instances professionnelles ostréicoles françaises et l'opportunité de maintenir l'élevage de ce type d'animaux a été discutée. Certaines organisations ont fait une demande de moratoire en souhaitant suspendre l'élevage des animaux triploïdes. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'avait été réalisée afin de mesurer l'effet de la ploïdie sur la sensibilité des animaux à des infections à *V. aestuarianus* en conditions expérimentales.

Les objectifs présentés dans le deuxième chapitre de cette partie de ce chapitre étaient doubles.

1. Nous avons exploré les effets d'une double infection par OsHV-1 et par *V. aestuarianus*. Les animaux utilisés ont été les lots de 4^{ème} génération de sélection massale des mêmes populations testées dans les expériences présentées dans le deuxième chapitre, lesquels étaient des animaux de 3^{ème} génération de sélection massale. Ces animaux avaient donc subi une pression de sélection supplémentaire au stade naissant sur estran, sur les mêmes sites. Afin de réaliser des infections avec les deux agents infectieux, les animaux à tester ont été mis en

contact avec des animaux « naïfs » ayant été préalablement injectée avec soit une suspension virale, soit avec une suspension bactérienne, les animaux sources étant en quantité équivalente pour chacune des modalités. Parallèlement, des lots des mêmes animaux à tester ont été infectés soit par OsHV-1, soit par *V. aestuarianus*, afin de pouvoir comparer ces trois conditions.

2. Afin d'explorer l'influence de la ploïdie sur les mortalités, des huîtres triploïdes des lots de troisième génération de sélection massale ont été produites par la technique chimique, soit l'équivalent triploïde des lots testés dans l'article 2 de la partie 2. Des infections expérimentales ont été mises en œuvre avec ces animaux triploïdes, d'une part en induisant une infection par OsHV-1, d'autre part en induisant une infection par *V. aestuarianus*, enfin en réalisant une infection par un mélange de suspensions infectieuses contenant les deux agents pathogènes.



Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages



Patrick Azéma, Marie-Agnès Travers, Abdellah Benabdelmouna, Lionel Dégremont*

Ifremer, RBE-SG2M-LGPMM, station de la Tremblade, F-17390, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2016

Revised 3 August 2016

Accepted 4 August 2016

Available online 5 August 2016

Keywords:

Vibrio aestuarianus

OsHV-1

Dual exposure

Ploidy

Selection

Crassostrea gigas

ABSTRACT

French production of the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, is currently threatened by two pathogens, OsHV-1 and *V. aestuarianus*. While oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 are now available for the industry, the impact of *V. aestuarianus* on such oysters is unknown, especially for triploids. In addition, experimental infection has used the virus or the bacteria alone, but there have been no investigations of dual exposure to these pathogens. This study is the first report of single or dual exposure in spat (Spat1 and Spat2), juvenile and adult naïve oysters. For each of the two stocks evaluated, unselected oysters and oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 infection were tested, as well as their triploid siblings of the selected oysters produced using cytochalasin B. We confirmed that resistance to OsHV-1 infection and susceptibility to *V. aestuarianus* increased with age and size, although selected oysters were not significantly impacted by OsHV-1 whatever their ploidy, size or age. We found different mortality patterns depending on the pathogen tested. The mortality pattern was similar for oysters exposed to OsHV-1 or to both pathogens in the Spat1 trial (4 months old and 1.9 g). The mortality pattern was similar for oysters exposed to *V. aestuarianus* or to both pathogens in the Adult trial (25 months old and 63.1 g). Surprisingly, mortality was much higher (ranging from 75.9% to 100%), in particular for the selected oysters, for the Spat2 (8 months old/3.9 g) and Juvenile trials (16 months old/18.4 g) given a dual exposure, regardless of the level of selection for OsHV-1 and the ploidy state. Our findings highlight an important threat for oyster farmers: oysters exposed to both pathogens could experience dramatic mortality rates, even in oysters selected for their higher resistance to OsHV-1. Finally, our study demonstrated for the first time that triploid oysters were more susceptible to experimental challenges with *V. aestuarianus* at the spat stage than their diploid siblings. However, the difference in mortality between the triploids and diploids remained limited and ranged from 22.9% to 6.6% for spat and adults, respectively with a relatively regularly decrease in the difference with increased age.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

French production of the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, is currently threatened by two pathogens. Indeed, massive mortality events that were formerly episodic and geographically limited have occurred every year since 2008, with high mortality rates for the spat and juveniles (over 70%). A particular OsHV-1 genotype (μ var) has been identified as a causal agent implicated in the mortality (Segarra et al., 2010) which was then found during

a period of *C. gigas* mortality in 2004–2005 in Normandy (Martenot et al., 2012). Moreover, significant mortality has been observed in market-sized adults since 2012 (François, 2015; François et al., 2013, 2014). The primary pathogenic agent found in the dying oysters sampled during these mortality episodes was *Vibrio aestuarianus*. Although more widespread and regular mortality have been reported in France since 2008, it is still not possible to attribute those to either a particular OsHV-1 strain or a higher virulence of *V. aestuarianus* (Goudenège et al., 2015) because these two pathogens have been described in France since 1991 and 2001 respectively (Labreuche et al., 2006; Nicolas et al., 1992). Genetics, pollutants, cultural practices and other factors could also be involved to explain the intense mortality caused by OsHV-1.

The co-detection of OsHV-1 with different species of *Vibrio*, including *Vibrio* belonging to the *V. splendidus* clade and

* Corresponding author at: Ifremer, Avenue Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

E-mail addresses: Pazema@ifremer.fr (P. Azéma), marie.agnes.travers@ifremer.fr (M.-A. Travers), Abdellah.Benabdelmouna@ifremer.fr (A. Benabdelmouna), ldegremo@ifremer.fr (L. Dégremont).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.002>

0022-2011/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

V. aestuarianus species, has been observed during several mortality events in France (François et al., 2009; Lemire et al., 2015; Saulnier et al., 2010) and New Zealand (Keeling et al., 2014). Recently, mortality was reported to be higher in the presence of OsHV-1 associated with *Vibrio* species than in the presence of OsHV-1 only (Petton et al., 2015).

Several breeding investigations have confirmed the high genetic basis for survival for *C. gigas* in the spat stage (Dégremont et al., 2010) and therefore to OsHV-1 infection (Dégremont, 2011; Dégremont et al., 2015b). More recently, a mass selection breeding program lead to significant genetic progress enhancing survival and OsHV-1 resistance in *C. gigas* (Dégremont et al., 2015c). Regarding *V. aestuarianus*, one study suggested that the *Vibrio* resistance trait had a genetic basis (De Decker, 2007). Later, the genetic parameters were estimated, with a higher genetic variation from spat to adults, although heritability was weak (0.2) (Azema et al., 2015a). This study also showed no significant genetic correlation between resistance to OsHV-1 infections and resistance to *V. aestuarianus* infections. Conversely, selected oysters at the spat stage in the field seemed to exhibit dual resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* experimental infections at the spat stage but not at the adult stage (Azema et al., 2015b). No experimental infection study to date has used a dual-pathogen exposure with OsHV-1 and *V. aestuarianus* even though both pathogens have been reported in numerous mortality events in France (François et al., 2014). A dual exposure could counteract the genetic mechanism of single disease-resistance and bypass host defenses.

The French cultured production of *C. gigas* is based on both wild-caught and hatchery-produced spat, representing 70% and 30% of the cultivated spat, respectively. This proportion varies among years due to the availability of wild-caught spat, which strongly depends on diseases and environmental conditions as well as on the number of collectors that are deployed by oyster farmers to harvest the spat. For hatchery-produced spat, production has increased threefold during the last 10 years, reaching nearly 3 billion individual spat in 2012 (Dégremont and Benabdelmouna, 2014). This increase was primarily driven by triploid oysters, which have a better growth and yield compared to their diploid counterparts (Dégremont et al., 2012; Hand et al., 2004). In addition, triploids are preferred over diploids in the summer because diploids are less marketable when in the spawning condition (Allen and Downing, 1986; Nell, 2002). In France, all triploid oysters are produced by private hatcheries, crossing diploid females from their own stocks with tetraploid males from a unique stock produced and maintained at the Ifremer hatchery in La Tremblade (Guo et al., 1996). Triploidy can also be induced using several methods (pressure, heat shock, chemicals) by blocking the extrusion of either the first or the second polar body that occurs during the first hour post-fertilization (Gérard et al., 1999). The induction methods offer the advantage of obtaining triploid offspring that share the same genetic background as their diploid siblings.

The effect of ploidy on pathogen-caused mortality remains unclear (Dégremont et al., 2015a). Some studies conducted in field conditions revealed that triploidy confers neither an advantage nor a disadvantage in survival based upon resistance to OsHV-1 infection in *C. gigas* (Dégremont et al., 2016) or on the abundance of *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in *C. virginica* (Walton et al., 2013). In contrast, other studies found a higher disease resistance in triploids compared to diploids; for example, resistance to *Haplosporidium nelsoni* or *Perkinsus marinus* in *C. virginica* (Dégremont et al., 2012) and resistance to *Bonamia roughleyi* in *S. glomerata* (Hand et al., 1998). The effect of ploidy on disease resistance was also investigated through experimental infections by *Vibrio aestuarianus* and *V. tasmaniensis* LGP32, but inconsistent results were observed. These results were explained by different patterns of energy allocation in

diploid and triploid Pacific oysters at different times of the year (De Decker et al., 2011).

Spawning is an important factor on the susceptibility to stress and mortality in diploid *C. gigas*. The energy expended during reproduction compromises the immune status of oysters, leaving them easily subject to mortality if a stress occurs in post-spawning stage, such heat stress (Li et al., 2007) or pathogens, including OsHV-1 (Dégremont et al., 2013) and *Vibrio* sp. (Wendling and Wegner, 2013). Nevertheless, the partial sterility of triploids and their different energy allocations for growth and gametogenesis might not confer on them a higher resistance to stress and mortality. Furthermore, the perception of the French oyster farmer about the mortality of his stock suggests that triploids could be more sensitive to *V. aestuarianus* than diploids.

To answer this question for the French oyster industry, we designed an experiment to investigate single and dual exposure to *V. aestuarianus* and OsHV-1 in *C. gigas*. Two lines selected for their higher resistance to OsHV-1 infection, as well as their respective controls (i.e., not selected), were tested at 4, 8, 16 and 25 months old, corresponding to Spat1, Spat2, Juvenile and Adult trials respectively. To date, lines selected for their higher resistance to *V. aestuarianus* infection are not available and could not be tested in this study. In addition, and only for the selected stocks, chemically induced triploids were also evaluated using the same protocol as their diploid siblings. The main objectives of this study were to test the impact of dual disease exposure on two common genetic improvements used in oysters, selective breeding for a single disease-resistance and triploidization, for each stage of development.

2. Materials and methods

2.1. Oysters

A mass selection scheme to increase survival in *C. gigas* was performed in two stocks (named A and B) of wild oysters sampled in 2008 from two sites in the Marennes-Oléron Bay (Charente Maritime, France). For each stock, a base population, G_0 , was produced in 2009. A sub-sample was kept in our facilities to avoid disease-related mortality and to produce the control line of the following generation (G_1 -C). The other sub-sample of oysters was deployed in the field, where mortality outbreaks caused by OsHV-1 have been routinely observed each year since 2009 (Dégremont et al., 2015c). The survivors were spawned in 2010 to produce the selected line G_1 -S. The same approach was used in February 2011, March 2012 and March 2013 to produce G_2 , G_3 and G_4 , respectively; further details are given in Dégremont et al. (2015c).

In our study, we used the selected and the control lines of each stock, A and B, produced for G_4 in 2013. The selected lines, named AS and BS, respectively, for stock A and B, and the control lines (named AC and BC) were all diploids. Twenty minutes post-fertilization of the eggs with the spermatozoa for AS and BS, half of the embryos were treated with cytochalasin B for 15 min to suppress the expulsion of the second polar body (PB2) according to a modified protocol (Dégremont et al., 2016; Gérard et al., 1999). The resulting triploid embryos were named 3nAS and 3nBS, which are siblings of AS and BS, respectively. The DNA ploidy level of each triploid line was verified using flow cytometry (FCM) from a sample of larvae as previously described (Dégremont et al., 2016). To our knowledge, this approach doesn't produce tetraploid larvae and spat but it is rather well known to produce a majority of triploids, small amount of diploids and some rare aneuploids. Our protocol used additional steps of sorting by size of larvae and spat in combination with extensive flow cytometry analyses to constitute pure triploid batches with undetectable proportions of spat of unwanted ploidy levels.

2.2. Viral and bacterial suspension

The *V. aestuarianus* strain used in the bacterial challenges was the highly pathogenic strain 02/041 that was isolated during a mortality episode in adults and has been previously studied (De Decker and Saulnier, 2011; Garnier et al., 2007). The *Vibrio* suspension was obtained from an isolate maintained at -80°C . The bacterial strain was placed in liquid Zobell and incubated for 24 h at 20°C with constant shaking at 20 rpm. The resulting solution was centrifuged at 3200g for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was washed and suspended in sterile artificial sea water (SASW) before adjustment to $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$. Purity and bacterial concentration were determined by plating on Zobell agar.

The viral suspension was obtained using the protocol of Schikorski et al. (2011). Briefly, after being experimentally infected by injecting $50\ \mu\text{l}$ of an OsHV-1 μvar suspension, dead oysters were dissected. The mantle and gills were removed, pooled, diluted, crushed and filtered using a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter to obtain a clarified tissue homogenate. The absence of bacteria was confirmed by plating on Zobell agar at 20°C . The viral suspension was maintained at 4°C and renewed when necessary.

2.3. Mortality induction protocols

All lines (AC, AS, 3nAS for the stock A; BC, BS and 3nBS for the stock B) were evaluated for resistance to either OsHV-1 or *V. aestuarianus* and to both pathogen infections under experimental infections in four trials: Spat1, Spat2, Juvenile and Adult, for which oysters were 6, 9, 15 and 25 months old, respectively, and weighing about 1.9, 3.9, 18.4 and 63.1 g, respectively (Table 1). The stage name used in our study referred to the stage used by the French oyster farmers which is related to the size of the oysters (spat < 5 g, juvenile 5–25 g, adult > 25 g). For each pathogen exposure (OsHV-1, *V. aestuarianus* and both), as well as for one control, three 10-L tanks were used for the Spat1, Spat2 and Juvenile groups, and 6 tanks for the Adult group, each containing the six lines. The density per line and per tank was 25 oysters for Spat1 and Spat2, which was reduced to 15 for Juveniles and 5 for Adults, to maintain a reasonable biomass in each tank (Table 1). All tanks were filled with filtered and UV-treated seawater and maintained at 21°C with adequate aeration and without adding food. The salinity averaged 32‰ for all challenges. Each oyster was individually tagged for identification.

A cohabitation experimental protocol was adapted to evaluate disease resistance in *C. gigas*. First, naïve oysters were anaesthetized (Suquet et al., 2009) and injected with $50\ \mu\text{l}$ of infectious suspensions (bacterial or viral suspension) into the adductor muscle using a 1 mL micro-syringe equipped with an 18-g needle. The injected oysters were transferred into 10-L tanks for 24 h. In the second step, they were placed for 48 h in contact with the 6 lines to test their disease resistance. The control tank used the same protocol but with naïve oysters injected with SASW and placed

in contact with the 6 lines. Approximately 50 g of injected oysters ($n = 4$) were placed in each 10-L tank. For dual infection, an equivalent weight of oysters injected with viral suspension ($n = 2$) and oysters injected with bacterial suspension ($n = 2$) was simultaneously placed in the tanks. We considered a dead oyster as an animal that was unable to close its valves after 5 min out of the water. Trials lasted 15 days for Spat1, Spat2, and Juvenile and one month for Adult.

2.4. Detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA

For the Juvenile and Adult trials, moribund oysters of all lines were sampled for the detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus* DNA. Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle + gills) using the QIAgen (Hilden, Germany) QIAamp tissue mini kit combined with the use of the QIAcube automated sample preparation system according to the manufacturer's protocol. The total DNA amount was adjusted to $5\ \text{ng}/\mu\text{l}$ following NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) measurement.

A real-time PCR assay was conducted on MX3000 and MX3005 Thermocyclers (Agilent, Santa Clara, USA) using the Brilliant III Ultrafast kit (Stratagene). Each reaction was run in duplicate in a final volume of $20\ \mu\text{l}$ containing a DNA sample ($5\ \mu\text{l}$ at $5\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $200\ \text{nM}$ of each primer (for OsHV-1: DPF 5' ATT GAT GATGTG GAT AAT CTG TG 3' and DPR 5' GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGTTCC 3' (Webb et al., 2007); for *V. aestuarianus*: DNAj-F 5' GTATGAAAT TTTAACTGACCCACAA3'; and DNAj-R 5' CAATTTCTTCGAACAAC-CAC 3' (Saulnier et al., 2009)) and $200\ \text{nM}$ of oligonucleotide probe (for *V. aestuarianus* DNAj probe 5' TGGTAGCCGACAGCTTCGGCGAC). Real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min at 95°C , followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. The standard curve was determined on serially diluted titrated plasmids provided by the National Reference Laboratory (Ifremer La Tremblade). For OsHV-1 DNA quantification, melting curves were also plotted ($55\text{--}95^{\circ}\text{C}$) to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. Negative controls (without DNA) were included.

2.5. Statistical analyses

Mortality was analyzed using the Genmod procedure with the SAS 9 software (SAS Institute Inc., 2012) by a logistic regression for binomial data.

To compare the selection factor, only mortality data from the diploid lines AS, BS, AC and BC were analyzed for each trial (Spat1, Spat2, Juvenile and Adult) and for each experimental infection condition (OsHV-1, *V. aestuarianus* and both pathogens) using the following model:

$$Y_{ij} = \text{Logit}(\pi) = \ln \frac{\pi}{1 - \pi} \\ = \mu + \text{stock}_i + \text{selection}_j + \text{stock}_i * \text{selection}_j + \varepsilon$$

Table 1
Summary of the trials to evaluate OsHV-1 and *V. aestuarianus* susceptibility.

Trial	Spat1	Spat2	Juvenile	Adult
Infection protocol	Cohabitation	Cohabitation	Cohabitation	Cohabitation
Date of challenge	Jun 2013	Oct 2013	Jun 2014	Mar 2015
Age (months)	4	8	16	25
Individual weight (g)	1.9	3.9	18.4	63.1
Stage	Spat	Spat	Juvenile	Adult
Number of tanks/condition ^a	3	3	3	6
Tank volume (l)	10	10	10	10
Lines tank ⁻¹	6	6	6	6
Oysters line ⁻¹ tank ⁻¹	25	25	15	5

^a Condition: control, OsHV-1 exposure, *V. aestuarianus* exposure, dual pathogen exposure.

where Y_{ij} was the mortality probability, μ was the intercept, $stock_i$ represented stock A or stock B, and $selection_j$ represented the level of selection for OsHV-1 resistance (selected S or control C).

To compare the ploidy factor, only mortality data from AS, BS, 3nAS and 3nBS were analyzed for each trial (Spat1, Spat2, Juvenile and Adult) and each experimental infection condition (OsHV-1, *V. aestuarianus* and both pathogens) using the following model:

$$Y_{ij} = \text{Logit}(\pi) = \ln \frac{\pi}{1 - \pi} = \mu + stock_i + ploidy_j + stock_i * ploidy_j + \varepsilon$$

where Y_{ij} was the mortality probability, μ was the intercept, $stock_i$ represented stock A or stock B, and $ploidy_j$ represented the ploidy of the lines (diploid or triploid).

In addition, mortality among the experimental infection conditions within a trial was analyzed either for the selection factor or the ploidy factor using the following model:

$$Y_i = \text{Logit}(\pi) = \ln \frac{\pi}{1 - \pi} = \mu + experimental\ infection_i + \varepsilon$$

where Y_i was the mortality probability, μ was the intercept, and $experimental\ infection_i$ represented the pathogens used (OsHV-1, *V. aestuarianus*, and both pathogens).

3. Results

No mortality occurred in the control tanks for all experimental infection trials, and all mortality data for each line are provided in [supplementary Tables 1 and 2](#).

3.1. Comparison of the mortality between diploid unselected (AC and BC) and diploid selected (AS and BS) oysters for their higher resistance to OsHV-1 infection

3.1.1. Experimental infections by OsHV-1

For the experimental infection by OsHV-1 only, mortality started three days post-infection for the unselected oysters (AC/BC) and lasted one week. The mean final cumulative mortality among the tanks of the unselected oysters reached 90.2% in the Spat1 trial and was significantly higher than the selected oysters (AS/BS) at 33.6% ($p < 0.0001$) (Fig. 1A) (Table 2). Similar findings were observed for the Spat2 and Juvenile trials, although the mortality of the unselected oysters decreased to 79.3% and 60.3%, respectively, and to a lesser extent for the selected oysters, to 6.1% and 14.7% (Fig. 1A). For the Adult trial, the mortality of the unselected oysters (17.5%) was not significantly higher than the mortality of the selected oysters (1.7%) ($p = 0.48$) (Table 2) (Fig. 1A). All other factors tested were not significant with the exception of the tank factor for the Spat2 ($p = 0.04$) and Juvenile ($p = 0.02$) (Table 2) trials.

3.1.2. Experimental infections by *V. aestuarianus*

The onset of mortality was 5 days post-infection, and a peak was observed 5–10 days later. For Spat1, the final cumulative mortality reached 15.6% for the unselected oysters (AC/BC) and was significantly higher than the mortality for the selected oysters (AS/BS) (4.7%) ($p < 0.01$) (Fig. 1B). All other factors were not significant with the exception of the tank factor ($p < 0.01$) (Table 2). Similar results were observed in the Spat2 trial, although mortality was higher, at 47.9% and 34.6% for the unselected and selected oysters, respectively (Fig. 1B) (Table 2). This trend was confirmed in the Juvenile trial, with mortality rising to 68.3% and 64.2% for unselected and selected oysters and reaching 75.6% and 76.7%, respectively, for the Adult trial (Fig. 1B). None of the other factors was significant with the exception of the tank factor in Juvenile trial ($p < 0.01$) (Table 2).

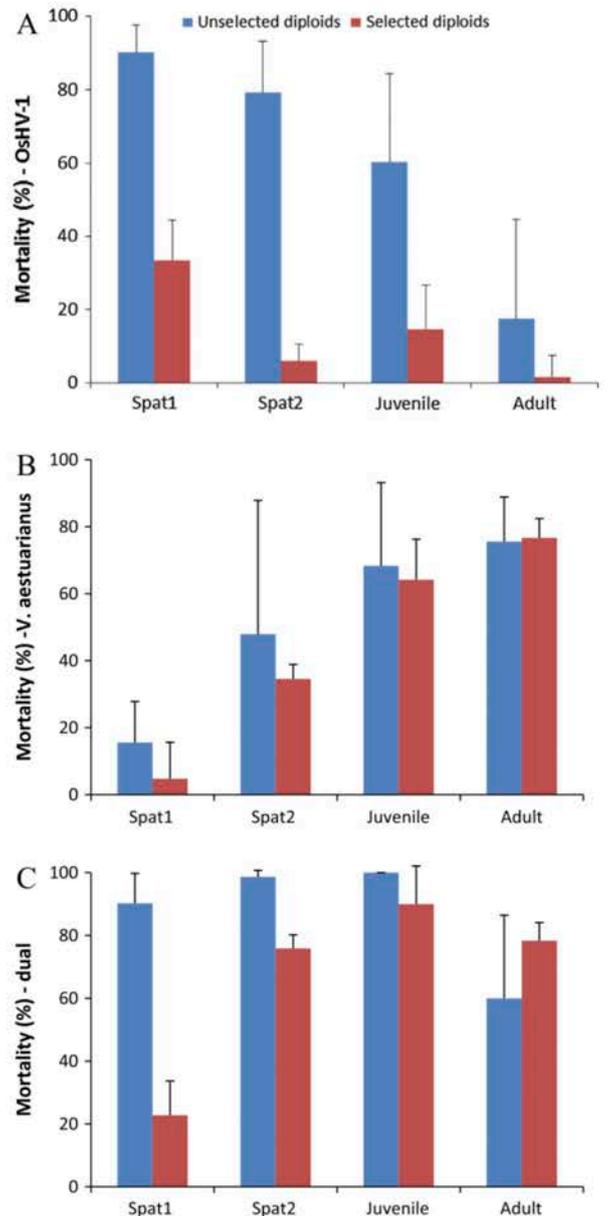


Fig. 1. Mean final mortality (+SD between stocks A and B) for unselected and selected diploid oysters after either single pathogen exposure to OsHV-1 (A) and *V. aestuarianus* (B) or dual pathogen exposure (C). Trials lasted 15 days for Spat1, Spat2 and Juvenile and one month for Adult. See Table 1 for more details of each trial.

3.1.3. Experimental infections by OsHV-1 and *V. aestuarianus*

For the experimental infection involving the two pathogens, the onset of mortality was 5 days post-infection, and a peak was observed 5–10 days later for the Spat2, Juvenile and Adult trials, while mortality was faster for Spat1. For Spat1, the mean final cumulative mortality reached 90.2% for the unselected oysters (AC/BC) and 22.8% for the selected oysters (AS/BS) (Fig. 1C). A significant difference in mortality was found between the AS/BS and AC/BC. In contrast, mortality increased for both groups, to 98.7% for the unselected oysters and 75.9% for the selected oysters for Spat2 and was not significantly different ($p = 0.96$) (Fig. 1C) (Table 2). Mortality was high and not significantly different in juvenile trial in unselected (100%) and selected oysters (90%) (Fig. 1C) (Table 2). Lower mortality was reported for the Adult trial, but it

Table 2

Logit analysis of mortality for selected and unselected lines among diploid oysters for single or dual pathogen exposure.

Pathogen	Factor	DF	Spat1		Spat2		Juvenile		Adult	
			F	p	F	p	F	p	F	p
OsHV-1	Replicate	2	0.93	0.40	3.33	0.04	4.01	0.02	0.91	0.48
	Selection	1	80.49	<0.0001	107.86	<0.0001	24.32	<0.0001	0.00	0.98
	Stock	1	0.03	0.86	3.7	0.06	0.96	0.33	0.07	0.98
	Stock * selection	1	2.68	0.10	1.15	0.28	0.21	0.65	0.00	0.98
<i>Vibrio aestuarianus</i>	Replicate	2	5.08	<0.01	25.92	<0.0001	5.79	<0.01	1.35	0.25
	Selection	1	9.57	<0.01	7.88	<0.01	0.23	0.63	0.01	0.93
	Stock	1	0.08	0.77	0.23	0.63	0.77	0.38	1.92	0.17
	Stock * selection	1	0.41	0.52	0.32	0.57	0.14	0.71	0.01	0.93
Both	Replicate	2	6.70	<0.01	7.60	<0.01	0.39	0.68	0.96	0.44
	Selection	1	95.78	<0.0001	0.00	0.96	0.00	0.98	5.05	0.03
	Stock	1	0.98	0.32	0.00	0.97	0.00	1.00	3.61	0.06
	Stock * selection	1	0.22	0.64	0.00	0.98	0.00	1.00	0.41	0.53

Stock * selection: interaction between the stocks (A or B) and the selection level (unselected or selected oysters for their higher resistance to OsHV-1).

still remained high, at 60.0% and 76.3%, for the unselected and selected oysters, respectively (Fig. 1C). None of the factors was significant for the Adult trial except the selection factor with lower mortality for the unselected oysters ($p = 0.03$) (Table 2).

3.1.4. Comparison of mortality among single or dual disease exposure

For Spat1, the final cumulative mortality among the lines was significantly different among the disease conditions tested ($p < 0.0001$), with the lowest mortality for the exposure to *V. aestuarianus* (10.1%), and similar mortality for the oysters exposed either to OsHV-1 (61.9%) or both diseases (56.5%). For the Spat2 and Juvenile trials, the dual exposure to pathogens involved significantly higher mortality (87.3% and 95.0%, respectively) than single disease exposure ($p < 0.0001$). In a closer look, the unselected oysters in the Spat2 trial exposed to OsHV-1 had higher mortality (79.3%) than those exposed to *V. aestuarianus* (47.9%), while it was the opposite for the selected oysters, at 6.1% and 34.6%, when exposed to the virus and the bacteria, respectively (Fig. 1A and B). For Juveniles, unselected oysters had similar mortality when exposed either to OsHV-1 (60.3%) or *V. aestuarianus* (68.3%), while the selected oysters had significantly higher mortality when exposed to the bacteria (64.2%) in comparison to OsHV-1 (14.7%) (Fig. 1A and B). For Adults, the final cumulative mortality among the lines was significantly different among the disease conditions tested ($p < 0.0001$), with the lowest mortality for the exposure to OsHV-1 (8.0%), and similar mortality for the oysters exposed either to *V. aestuarianus* (76.2%) or both diseases (70.5%).

3.2. Comparison of the mortality between diploid (AS/BS) and triploid (3nAS/3nBS) oysters using lines selected for their higher resistance to OsHV-1 infection

3.2.1. Experimental infections by OsHV-1

For the experimental infections with OsHV-1 only, the onset of mortality was 5 days post-infection and no peak of mortality was observed. The mean final cumulative mortality among lines (AS, BS, 3nAS, 3nBS) remained low, at 32.1% for Spat1, 7.9% for Spat2, 13.2% for Juveniles and 2.5% for Adults. For each trial, the tank factor was not significant. The interaction between ploidy and stock was significant for the Spat1 trial ($p = 0.02$) (Table 3). At the stock level, triploid oysters (3nAS) (24.5%) had significantly lower mortality than diploid oysters (AS) (40.0%) for stock A ($p = 0.02$), while it was the opposite for stock B (<0.0001), with 27.2% for diploids (BS) and 36.6% for triploids (3nBS) (Fig. 2A). For Spat2, Juvenile and Adult trials, mortality was not significantly different between diploid (6.1%, 14.7% and 1.7% for Spat2, Juvenile and Adult,

respectively) and triploid (9.7%, 11.7 and 3.3%) as well as between stocks (Fig. 2A) (Table 3).

3.2.2. Experimental infections by *V. aestuarianus*

For the experimental infections with *V. aestuarianus* only, the onset of the mortality was 5 days post-infection, and a peak was observed 5–10 days later. The mean final cumulative mortality among the lines increased from 16.2% for Spat1 to 41.7% for Spat2, 69.0% for Juveniles and 80.0% for Adults. For each trial, the tank factor was significant for the Spat1, Spat2 and Juvenile (Table 3). In contrast, the interaction between ploidy and stock was not significant (Table 3). For all trials, mortality was similar between the two stocks, with the exception of Juveniles, for which stock A (78.9%) had significant higher mortality than line B (59.2%) (Table 3). In contrast, triploids (3nAS/3nBS) had a significantly higher mortality than their diploid counterpart (AS/BS), at 27.6% and 4.7%, respectively, in Spat1 and 48.9% and 34.6% in Spat2 (Fig. 2B). Finally, final cumulative mortality was not significantly different between triploids (73.9% and 83.3%) and diploids (64.2% and 76.7%) in Juveniles and Adults, respectively (Fig. 2B) (Table 3).

3.2.3. Experimental infections by OsHV-1 and *V. aestuarianus*

For the experimental infection involving the two pathogens, the onset of mortality was 5 days post-infection, and a peak was observed 5–10 days later. The mean final cumulative mortality among the lines was the lowest for Spat1 (22.5%) and high for Spat2 (82.2%), Juveniles (93.3%) and Adults (83.3%). Within trials, the replicate factor was significant for Spat1 and Spat2, but not for Juveniles and Adults (Table 3). Mortality was not significantly different between the two stocks for each trial, as well as the interaction between stock and ploidy (Table 3). The final mean cumulative mortality was not significantly different between ploidy for Spat1, Juveniles and Adults, with 22.8% and 22.3% for diploid (AS/BS) and triploid (3nAS/3nBS), respectively, for Spat1, 90.0% and 96.7% for Juveniles, and 78.3% and 88.3% for Adults (Table 3) (Fig. 2C). In contrast, triploids (88.5%) had a higher mortality than diploids (75.9%) in Spat2 ($p < 0.01$) (Table 3) (Fig. 2C).

3.2.4. Comparison of mortality among single or dual disease exposure

For Spat1, the final cumulative mortality was significantly different among the disease conditions tested ($p = 0.04$), with the lowest mortality for the exposure to *V. aestuarianus* (16.2%), intermediate when the two diseases were involved (22.5%) and the highest for the exposure to OsHV-1 (32.1%). For Spat2 and Juvenile trials, the dual exposure to diseases involved significantly higher mortality (82.2% and 93.3%, respectively) than single disease exposure ($p < 0.0001$), with 41.7% and 69.0% for *V. aestuarianus*,

Table 3

Logit analysis of mortality for triploid and diploid oysters among selected lines for single or dual pathogen exposure.

Pathogen	Factor	DF	Spat1		Spat2		Juvenile		Adult	
			F	p	F	p	F	p	F	p
OsHV-1	Replicate	2	1.19	0.30	1.03	0.36	1.55	0.22	0.00	1.00
	Ploidy	1	0.32	0.57	1.37	0.24	0.25	0.62	0.00	1.00
	Stock	1	0.00	0.96	0.02	0.89	0.01	0.92	0.00	1.00
	Stock * ploidy	1	5.48	0.02	0.48	0.49	0.25	0.62	0.00	0.98
<i>Vibrio aestuarianus</i>	Replicate	2	14.45	<0.0001	22.49	<0.0001	5.53	<0.01	2.01	0.08
	Ploidy	1	23.90	<0.0001	6.30	0.01	2.25	0.14	0.57	0.45
	Stock	1	0.43	0.51	0.19	0.66	6.48	0.01	0.00	0.97
	Stock * ploidy	1	2.80	0.10	0.14	0.70	4.40	0.04	2.88	0.09
Both	Replicate	2	4.27	0.02	14.03	<0.0001	0.83	0.44	0.73	0.60
	Ploidy	1	0.02	0.88	7.90	<0.01	0.00	0.97	1.35	0.25
	Stock	1	0.43	0.51	0.99	0.32	0.00	0.97	0.37	0.54
	Stock * ploidy	1	0.99	0.32	0.01	0.94	0.00	0.98	0.39	0.53

Stock * ploidy: interaction between the stocks (A or B) and the ploidy (diploid or triploid oysters selected for their higher resistance to OsHV-1).

respectively, and 7.9% and 13.2% for OsHV-1, respectively. Finally, exposure to *V. aestuarianus* or exposure to the bacteria and OsHV-1 involved high but similar mortalities, of 80.0% and 83.3%, respectively, which were significantly higher than the mortality observed when oysters were exposed to OsHV-1 only (2.5%) ($p < 0.0001$).

3.3. Quantification and detection of OsHV-1 and *V. aestuarianus*

For both Juvenile and Adult trials, all moribund oysters exposed to OsHV-1 were detected as positive, with a high amount of viral DNA $> 10^{+7}$ copies per mg of fresh oyster tissue (Table 4). However, 33% and 66% also tested positive for *V. aestuarianus*, but at a lower amount ($7.7 \cdot 10^{+2}$ and $1.2 \cdot 10^{+5}$ copies of bacterial DNA per mg of tissues for Juveniles and Adults, respectively), suggesting a cross contamination.

After exposure to *V. aestuarianus*, this pathogen was detected in 96% and 100% of the moribund oysters analyzed, ranging from $1.2 \cdot 10^{+6}$ to $1.1 \cdot 10^{+8}$ copies of bacterial DNA per mg of fresh oyster tissue (Table 4). OsHV-1 was also detected in 40 and 54% of Juveniles and Adults, respectively, but a low level, with $1.0 \cdot 10^{+3}$ and $3.9 \cdot 10^{+3}$ copies per mg of tissues, respectively. Again, this suggested a cross contamination.

For the dual exposure experiments, 82 and 89% were positive for OsHV-1 in Juveniles and Adults, respectively, with a high amount of DNA virus, exceeding 10^{+7} (Table 4). Similarly, all oysters also tested positive to *V. aestuarianus* and again at a high amount, with $4.8 \cdot 10^{+5}$ and $7.1 \cdot 10^{+7}$ DNA copies per mg of fresh oyster tissue (Table 4). Regardless of the stock (A or B), the level of selection (unselected or selected for higher resistance to OsHV-1) and the ploidy (diploid or triploid), most of the individuals tested had very high DNA quantities of both pathogens (Fig. 3A and B).

4. Discussion

Three main findings were revealed in this study. The first concerned different mortality patterns among pathogen exposure and among stages (spat, juvenile and adult), the second was the consequence of the dual disease exposure on oysters selected for their higher resistance to OsHV-1, and the third reveals for the first time the impact of the ploidy level on disease-resistance for each and both diseases tested.

Field grow-out means that oysters are continuously exposed to pathogens present in the environment. Nevertheless, OsHV-1 is mostly reported in *C. gigas* spat during mortality events in France,

while it is *V. aestuarianus* in adults (Barbosa Solomieu et al., 2015). Our experimental infections reinforced this statement, as previously demonstrated by Azema et al. (2015a), with oysters more susceptible to the virus than the bacteria at the spat stage, while it was the opposite in adults regardless of the lines tested (Figs. 1A, B and 2A, B).

Our study confirms that oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 had significantly lower mortality than unselected oysters from spat to adults when they were exposed to the virus only (Fig. 1A). The difference in mortality between the unselected and selected oysters decreased from Spat1 to Adult, confirming the development of the resistance to OsHV-1 infection with age and size for the unselected oysters (Dégremont, 2013). In addition, our study confirmed that selecting for resistance to OsHV-1 infection in the spat stage did not confer either higher resistance or susceptibility to *V. aestuarianus* infection in adults (Fig. 1B), which is in agreement with a recent study (Azema et al., 2015b). Such findings have been commonly reported for disease-resistant oysters when tested against another disease for which they were not selected, underlying the absence of significant positive or negative genetic correlations between the resistances to two pathogens (Burreson, 1991; Dove et al., 2013; Frank-Lawale et al., 2014; Gay, 2004; Gomez-Leon et al., 2008).

Dual exposure to the bacterium and the virus in Spat2 and Juveniles using 8-month-old to 16-month-old and 3.9 and 18.4 g oysters revealed a significant increase in mortality in comparison with single disease exposure, either by OsHV-1 or by *V. aestuarianus*. This finding was previously observed with other experimental infections, which induced higher mortalities when injecting a mix of *Vibrio* strains (Gay et al., 2004). This result could be due to increased virulence linked to bacterial cooperation (De Decker et al., 2013; Lemire et al., 2015). Moreover, it was observed in juvenile oysters that a rapid *Vibrio* spp. colonization followed by viral replication precedes oyster death (Petton et al., 2015). In our study, we can also hypothesize a direct cooperation between OsHV-1 and *V. aestuarianus* resulting in an increased virulence, as documented for human herpes viruses and bacteria (Slot, 2002) or human respiratory diseases involving influenza virus and bacteria (Smith and Sweet, 2002). Viruses can aid bacteria in all aspects of their pathogenesis (penetration, growth, interference with host immune response, and causation of damage to the host), and conversely bacterial proteases may help the influenza virus to infect cells. We can also propose that the two pathogens act independently but led to additive effects at the animal level (individual co-infection) or the population level. Interestingly, whatever the molecular mechanisms, additive or cooperative effects of those two pathogens were observed in Spat2 and Juvenile oysters only.

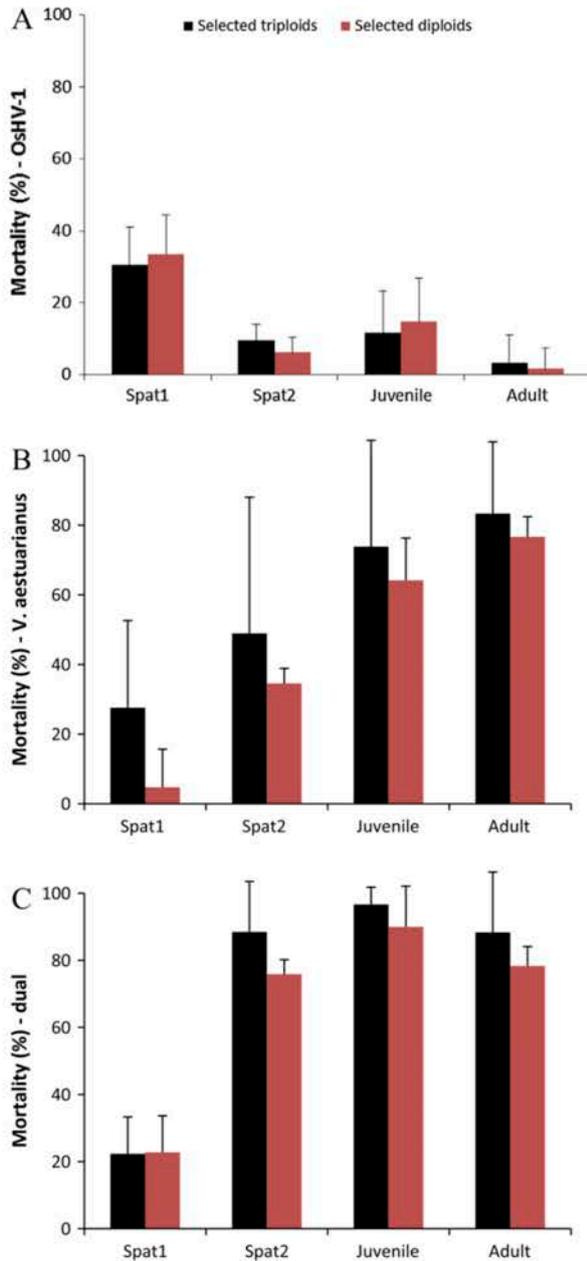


Fig. 2. Mean final mortality (+SD between stocks A and B) of diploid and triploid oysters after either single pathogen exposure to OsHV-1 (A) and *V. aestuarianus* (B) or dual pathogen exposure (C). Trials lasted 15 days for Spat1, Spat2 and Juvenile and one month for Adult. See Table 1 for more details of each trial.

Either these developmental stages or the physiological status of those animals can be particularly permissive to those two organisms. Indeed, reproductive status may have increased the susceptibility of the oysters tested to pathogens, as previously reported in *C. gigas* for OsHV-1, *Vibrio tasmaniensis* and *V. aestuarianus* (De Decker et al., 2011; Dégremont et al., 2016; Li et al., 2007; Samain et al., 2007; Wendling and Wegner, 2013). Our experimental oysters were produced in February 2013, and might not have experienced a first spawning event in the Spat1 stage during June 2013 due to their young age and their small size, while they might have spawned in Spat2 (October 2013) and Juvenile (June 2014) stages. Biologically speaking, spat and juveniles would be unable to reproduce, but here we referred to the stages used by the French oyster farmers which graded their oysters by size. In addition, the last trial of Adults was undertaken in March, which corresponds to the sexual initiation of gametogenesis when the water temperature is low (Fabioux et al., 2005). Unfortunately, we did not control the ripeness of the oysters before our experimental infection. Such control should be systematically undertaken in future experiments.

The novelty of our study about the dual exposure concerned in particular the selected oysters for their higher resistance to OsHV-1 infection. Selection to improve the resistance to OsHV-1 infection in *C. gigas* can be easily achieved throughout selective breeding programs (Dégremont et al., 2015b,c). In the future, oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 infection should be used more frequently by oyster farmers, as commercial hatcheries have been developing their own selected lines. Similarly, wild oyster populations of *C. gigas* subsequently exposed to several generations of selective disease pressure should develop a higher resistance to OsHV-1 infection, as observed for *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the USA (Elston et al., 1987). Nevertheless, the higher mortality for dual exposure than single exposure obviously had a greater effect on the selected oysters (AS/BS/3nAS/3nBS), and to a lesser extent the unselected oysters (AC/BC) (Figs. 1A–C and 2A–C). We noted that regardless of the stock (A or B), the level of ploidy (2n or 3n) and the level of selection (unselected or selected for higher resistance to OsHV-1), most of the individuals were highly infected by both pathogens in the Juvenile and Adult stages during the dual exposure (Fig. 3A and B). Thus, such exposure counteracted the genetic progress for the resistance to OsHV-1 and bypassed the defense of the host against the virus. Consequently, selection to improve OsHV-1 resistance could be irrelevant when those oysters are exposed to both the virus and the bacteria, although a small difference in mortality in favor of the selected oysters remained (10–13%) (Fig. 1C). The underlying mechanisms of such mortality are unknown and further investigations should address this point. Meanwhile, such mortality seems not to occur in the field, as oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 have always exhibited higher survival than unselected oysters each year since 2001 in the Marennes-Oléron Bay (Dégremont et al., 2010, 2015c). Nevertheless, our findings highlighted an important threat for oyster farmers. Thus, selective

Table 4

Detection and mean quantification of OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* for moribund oysters in Juvenile and Adult trials.

Trial	Pathogen exposure	OsHV-1			<i>V. aestuarianus</i>		
		Positive/analyzed	Prevalence (%)	Quantification	Positive/analyzed	Prevalence (%)	Quantification
Juvenile	OsHV-1	9/9	100	$2.8 \cdot 10^{-7}$	3/9	33	$7.7 \cdot 10^{-2}$
	<i>V. aestuarianus</i>	10/25	40	$1.0 \cdot 10^{-3}$	24/25	96	$1.2 \cdot 10^{-6}$
	Both	14/17	82	$1.7 \cdot 10^{-7}$	17/17	100	$4.8 \cdot 10^{-5}$
Adult	OsHV-1	3/3	100	$8.2 \cdot 10^{-8}$	2/3	66	$1.2 \cdot 10^{-5}$
	<i>V. aestuarianus</i>	7/13	54	$3.9 \cdot 10^{-3}$	13/13	100	$1.1 \cdot 10^{-8}$
	Both	16/18	89	$1.4 \cdot 10^{-8}$	18/18	100	$7.1 \cdot 10^{-7}$

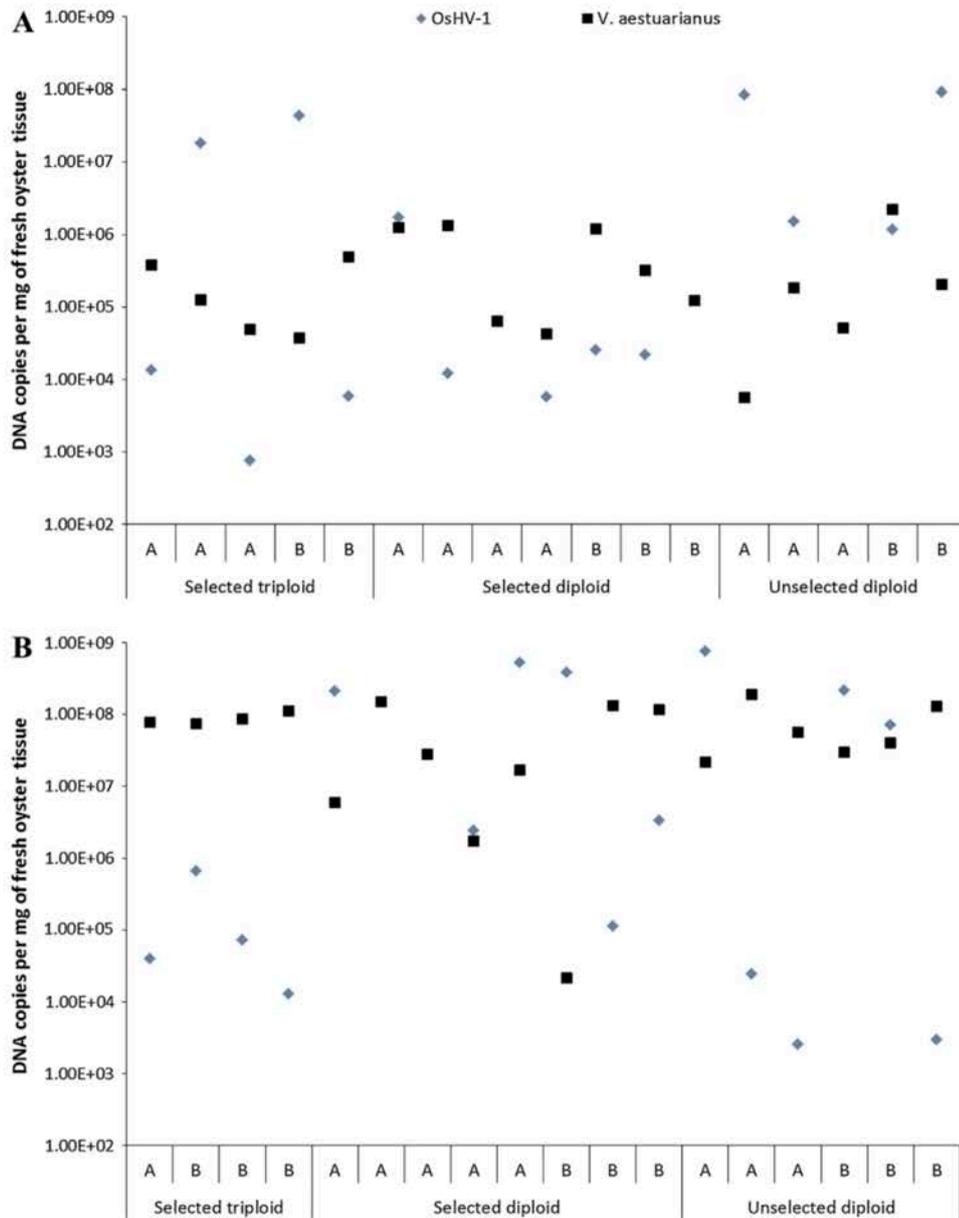


Fig. 3. DNA copies of OsHV-1 and *V. aestuarianus* detected in individual moribund selected triploid and diploid oysters and unselected diploids after a dual pathogen exposure in Juveniles (A) and Adults (B).

breeding programs should focus on dual resistance, which should be possible according to a recent study showing no significant genetic correlation between the resistance to OsHV-1 and the resistance to *V. aestuarianus* (Azema et al., 2015a).

Triploid oysters grown by the farmers are mostly all-triploid oysters produced by mating diploid females to tetraploid males (Guo et al., 1996). Commercial hatcheries used their own diploid stocks while the tetraploid oysters come from a unique stock produced by the patented method of Benabdelmouina and Ledu (2007). In our study, the chemically induced triploids have the main advantage of not confounding the ploidy and the germplasm factors. Selected triploids performed as well as their diploid siblings when exposed to OsHV-1, whatever their age or size, in experimental infection under laboratory conditions. This confirmed results obtained in field conditions that OsHV-1 resistance was not substantially altered by triploidization and that mortality

related to OsHV-1 is similar between diploids and triploids in *C. gigas* when the same germplasm is used for both ploidy states (Dégremont et al., 2016).

As observed for the selected diploids, the susceptibility of triploids to *V. aestuarianus* increased with size and age (Fig. 2A). Interestingly, our study clearly showed that triploid oysters seemed more susceptible to *V. aestuarianus* than their diploid siblings, particularly at the spat stage. This is the first report in the literature. Nevertheless, the difference in mortality between the two ploidy states remained limited and regularly decreased from Spat1 to Adult, with 22.9%, 14.6%, 9.7% and 6.6%, respectively. One of the hypotheses to explain the higher susceptibility of triploids would be a higher risk of infection by the bacteria due to their higher filtration rate. This statement is speculative only because no studies, surprisingly, have compared the filtration rate between diploid and triploid oysters. A second hypothesis considers reproductive effort.

Despite much lower mature gamete production in triploid oysters relative to diploid, their reproductive effort can be significant, even in young individuals (Normand et al., 2009). In addition, a study revealed that active gametogenesis periods correspond to higher susceptibility to vibriosis and that there is a significant interaction of the season with ploidy (De Decker et al., 2011). In our study, such interaction was not reported because triploids had always higher mortality than diploids (Fig. 2B) throughout the four trials.

Although, the chemically induced triploids showed a higher susceptibility to *V. aestuarianus*, than their diploid siblings, further investigations are now necessary to focus on all-triploids used by farmers.

The difference in mortality among tanks observed, in particular when *V. aestuarianus* was involved (Table 2) could be explained by the mortality induction protocols used, which may not be identical among the tanks. Naïve oysters were injected with 50 µl of infectious suspensions (bacterial or viral suspension) into the adductor muscle and then placed for 48 h in contact with the 6 lines to test their disease resistance. If the injected oysters excrete bacteria or virus in a limited amount (< to the minimal infective dose) during this period, we failed to trigger the mortality in one tank, as observed for one tank of *V. aestuarianus* in Spat2. Conversely, if the injected oysters excreted high quantities of bacteria or virus, one tank had much higher mortality for the others as observed for *V. aestuarianus* in Juvenile. Thus, the donors combined to the genetic resistance of oysters could explain the difference observed among tank, although the ranking of the batches evaluated were mostly identical among the tanks.

Finally, the detection at a low level of OsHV-1 DNA for the bacterial challenge and *V. aestuarianus* DNA for the viral challenge for some of the moribund oysters is more likely to be related to degraded DNA due to the UV-treated seawater. Their detection could be explained by the seawater pumped into the Marennes-Oléron Bay, where mortality related to OsHV-1/*V. aestuarianus* is now commonly reported. Thus, filtration and UV-treated seawater likely removed most bacteria and viral particles, and the DNA detected was likely inactive or degraded DNA. The absence of mortality for controls confirmed this statement.

5. Conclusions

This study is the first to investigate the mortality of a single or a dual exposure to the two main disease agents affecting the French oyster production of *C. gigas*. Although only two stocks were used in our study, the oysters also reflected different source of oysters used by farmers with unselected oysters, oysters selected for their higher resistance to OsHV-1, and their selected triploid siblings. The experimental infections conducted from spat to adult using naïve oysters clearly revealed different mortality patterns depending on the pathogen tested. Thus, resistance to OsHV-1 infection and susceptibility to *V. aestuarianus* increased with age and size, although selected oysters were not significantly impacted by OsHV-1 whatever their size or age. We clearly showed that the mortality pattern was similar when oysters were exposed to OsHV-1 or exposed to both pathogens for Spat1 (4 months old and 1.9 g). Similarly, the mortality pattern was similar when oysters were exposed to *V. aestuarianus* or exposed to both pathogens in Adults (25 months old and 63.1 g). Surprisingly, mortality was much higher for Spat2 and Juveniles (8–16 months old and 3.9–18.4 g) for the dual exposure than a single pathogen exposure, regardless of the level of selection for OsHV-1 and the ploidy. Our finding highlighted an important threat for oyster farmers, where oysters exposed to both pathogens at the same time could experience dramatic mortality, even in oysters selected for their higher resistance to OsHV-1. Finally, our study reports for the first

time a potential impact of triploidy on the susceptibility to *V. aestuarianus*. Tested triploid oysters were more susceptible to *V. aestuarianus* than their diploid siblings, although the difference in mortality between both ploidy states remained limited and regularly decreased from Spat1 to Adults, at 22.9% and 6.6%, respectively. Our study highlighted the importance of developing rapid selective breeding programs for dual resistance to OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: PA, MAT and LD. Production of the animals: PA, AB, LD. Performed the experiments: PA. Analyzed the data: PA and LD. Wrote the manuscript: PA, MAT, AB and LD. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We wish to express our gratitude to Elise Maurouard, Jean-Christophe Billy and Aurélien Brun for their technical support for oyster maintenance, to Nicole Faury for her support in furnishing viral suspensions for all OsHV-1 challenges and to Philippe Haffner and Delphine Tourbiez for their support in preparing the experimental room. The oysters used in this work were produced and maintained in controlled conditions at the Ifremer hatchery in La Tremblade and at the Ifremer nursery in Bouin. We are very grateful to the nursery and the genetic teams for their assistance in oyster production and to the pathology team for its technical support for mortality monitoring.

This study was supported by IFREMER through the research activity called "Amélioration par la sélection" and by the French Ministries of Ecology and Agriculture through the research activity called "AESTU".

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.002>.

References

- Allen Jr., S.K., Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). 1. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197–208.
- Azema, P., Travers, A., Lamy, J.-B., Dégremont, L., 2015a. Genetic parameters for OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* resistance in *Crassostrea gigas*: first results using controlled challenges. *J. Shellfish Res.* 34, 606.
- Azema, P., Travers, M.-A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., Dégremont, L., 2015b. 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. *Vet. Res.* 46, 139.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., Travers, M.-A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 2–10.
- Benabdelmouna, A., Ledu, C., 2007. Obtention de mollusques bivalves tétraploïdes à partir de géniteurs diploïdes. Patent FR2913982A1, France, 2007, pp. 21.
- Burreson, E.M., 1991. Susceptibility of MSX-resistant strains of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 10, 305–306.
- De Decker, S., 2007. A study of the *Vibrio* pathogens virulence in relation to the variability of the oyster's response. Journées Doctoriales, Université de Poitiers, Poitiers (France).
- De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S., Boudry, P., 2011. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 179–191.
- De Decker, S., Reynaud, Y., Saulnier, D., 2013. First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* 392, 1–7.
- De Decker, S., Saulnier, D., 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.*, 691–699.

- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317, 94–98.
- Dégremont, L., 2013. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 416–417, 129–134.
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P., 2010. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299, 21–29.
- Dégremont, L., Guyader, T., Tourbiez, D., Pépin, J.-F., 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., Benabdellmouna, A., 2014. Mortality associated with OsHV-1 in spat *Crassostrea gigas*: role of wild-caught spat in the horizontal transmission of the disease. *Aquacult. Int.* 22, 1767–1781.
- Dégremont, L., Garcia, C., Allen Jr., S.K., 2015a. Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 226–241.
- Dégremont, L., Garcia, C., Frank-Lawale, A., Allen, S.K., 2012. Triploid Oysters in the Chesapeake Bay: comparison of Diploid and Triploid *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 31, 21–31.
- 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.
- Dégremont, L., Leduc, C., Maurouard, E., Nourry, M., Benabdellmouna, A., 2016. Effect of ploidy on the mortality of *Crassostrea gigas* spat caused by OsHV-1 in France using unselected and selected OsHV-1 resistant oysters. *Aquac. Res.* 47, 777–786.
- Dégremont, L., Nourry, M., Maurouard, E., 2015c. 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.
- Dove, M.C., Nell, J.A., O'Connor, W.A., 2013. Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). *Aquac. Res.* 44, 1791–1800.
- Elston, R.A., Kent, M.L., Wilkinson, M.T., 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64, 237–242.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Penec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470.
- François, C., 2015. Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. <<http://archimer.ifremer.fr/doc/00256/36691/>>.
- François, C., Garcia, C., Arzul, I., Joly, J.-P., Miossec, L., Chollet, B., Ferrand, S., Robert, M., Tourbiez, D., Omnes, E., Cobret, L., Faury, N., Haffner, P., Saulnier, D., Pépin, J.-F., Renault, T., Antajan, E., Rauffet, F., Ropert, M., Mouillard, G., Gerla, D., Annezo, J.-P., Le Gal, D., Langlade, A., Bédier, E., Nourry, M., Chabirand, J.-M., Fillon, A., Robert, S., Courtois, O., 2009. Bilan 2008 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. <<http://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19709/>>.
- François, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Lupo, C., Travers, M.-A., Pépin, J.-F., Hatt, P.-J., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Huchet, E., Dubreuil, C., Chollet, B., Renault, T., Corderier, R., Hebert, P., Le Gagneur, E., Parrad, S., Gerla, D., Annezo, J.-P., Terre-Terrillon, A., Le Gal, D., Langlade, A., Bédier, E., Hittier, B., Grizon, J., Chabirand, J.-M., Robert, S., Seugnet, J.-L., Rumebe, M., Le Gall, P., Bouchouca, M., Baldi, Y., Masson, J.-C., 2013. Bilan 2012 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. <<http://archimer.ifremer.fr/doc/00143/25470/>>.
- François, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Lupo, C., Travers, M.-A., Tourbiez, D., Chollet, B., Faury, N., Haffner, P., Dubreuil, C., Serpin, D., Renault, T., Corderier, R., Hebert, P., Le Gagneur, E., Parrad, S., Gerla, D., Cheve, J., Penot, J., Le Gal, D., Lebrun, L., Le Gac-Abernot, C., Langlade, A., Bédier, E., Palvadeau, H., Grizon, J., Chabirand, J.-M., Robert, S., Seugnet, J.-L., Rumebe, M., Le Gall, P., Bouchouca, M., Baldi, Y., Masson, J.-C., 2014. Bilan 2013 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. <<http://archimer.ifremer.fr/doc/00197/30798/>>.
- Frank-Lawale, A., Allen, S.K., Dégremont, L., 2014. Breeding and domestication of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) lines for culture in the mid-Atlantic. USA: line development and mass selection for disease resistance. *J. Shellfish Res.* 33, 153–165.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J.-L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53, 187–196.
- Gay, M., 2004. Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus* PhD Thesis, Université de La Rochelle.
- Gay, M., Berthe, F.C.J., Le Roux, F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 49–56.
- Gérard, A., Leduc, C., Phelipot, P., Naciri-Graven, Y., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174, 229–242.
- Gomez-Leon, J., Villamil, L., Salger, S.A., Sallum, R.H., Remacha-Trivino, A., Leavitt, D. F., Marta, G.-C., 2008. Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis. Aquat. Organ.* 79, 95–105.
- Goudenège, D., Travers, M.A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., Tourbiez, D., Manganot, S., Calteau, A., Mazel, D., Nicolas, J.L., Jacq, A., Le roux, F., 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ. Microbiol.* 17, 4189–4199.
- Guo, X., DeBrosse, G.A., Allen Jr., S.K., 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142, 149–161.
- Hand, R.E., Nell, J.A., Smith, I.R., Maguire, G.B., 1998. Studies on triploid oysters in Australia. XI. Survival of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) through outbreaks of winter mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation. *J. Shellfish Res.* 17, 1129–1135.
- Hand, R.E., Nell, J.A., Thompson, P.A., 2004. Studies on triploid oysters in Australia XIII. Performance of diploid and triploid Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), progeny from a third generation breeding line. *Aquaculture* 233, 93–107.
- Keeling, S.E., Brosnahan, C.L., Williams, R., Gias, E., Hannah, M., Bueno, R., McDonald, W.L., Johnston, C., 2014. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1—an opportunistic longitudinal study. *Dis. Aquat. Organ.* 109, 231–239.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367–379.
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., Le Roux, F., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* 9, 1523–1531.
- Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C.A., Li, X.X., Benkendorf, K., 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R2353–R2362.
- Martenot, C., Fourour, S., Oden, E., Jouaux, A., Travaille, E., Malas, J.P., Houssin, M., 2012. Detection of the OsHV-1 μ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture* 338, 293–296.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, 69–88.
- Nicolas, J.-L., Comps, M., Cochenne, N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12, 11–13.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P., 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquat. Biol.* 7, 229–241.
- Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., Le Roux, F., 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front. Microbiol.* 6. <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00686>>.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boulet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227–243.
- SAS Institute Inc., 2012. SAS/STAT[®] 12.1 User's Guide.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiological studies. *J. Microbiol. Methods* 77, 191–197.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59, 787–798.
- Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., Pepin, J.-F., 2011. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.* 42, 27.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99.
- Slot, J., 2002. Interactions between Herpesviruses and bacteria in Human periodontal diseases. In: Brogden, K.A., Guthmiller, J.M. (Eds.), *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington DC. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2484/>>.
- Smith, H., Sweet, C., 2002. Cooperation between viral and bacterial pathogens in causing human respiratory disease. In: Brogden, K.A., Guthmiller, J.M. (Eds.), *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington DC. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2479/>>.
- Suquet, M., de Kermaisan, G., Araya, R.G., Queau, I., Lebrun, L., Le Souchu, P., Mingant, C., 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 22, 29–34.
- Walton, W.C., Rikard, F.S., Chaplin, G.J., Davis, J.E., Arias, C.R., Supan, J.E., 2013. Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and *Vibrio* abundances. *Aquaculture* 414, 260–266.
- Webb, S.C., Fidler, A., Renault, T., 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272, 126–139.
- Wendling, C.C., Wegner, K.M., 2013. Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and *Vibrio* infection to summer mortality phenomena in Pacific oysters. *Aquaculture* 412, 88–96.

III.4 Conclusions de la troisième partie

III.4.1 Les protocoles utilisés ont permis de déterminer une méthode d'évaluation pour les infections à *Vibrio aestuarianus* plus efficace

Afin d'étudier la réponse à une infection par *Vibrio aestuarianus* de deux lignées d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, sélectionnées sur estran au stade naissain, et de leurs deux lignées témoins, nous avons utilisé deux protocoles : un protocole par injection d'une suspension bactérienne dans le muscle adducteur, le second par cohabitation, i.e. par mise en contact avec des huîtres préalablement injectées avec une suspension bactérienne. Ces deux protocoles avaient déjà été utilisés lors d'études précédentes, ici nous avons pu les comparer en vue de leur utilisation pour évaluer la sensibilité à une infection. Le protocole par injection permet de mettre en contact un nombre de bactéries défini, c'est un protocole qui est aisément reproductible, mais qui reste difficile à mettre en œuvre pour un nombre important d'animaux. Le protocole par cohabitation permet d'infecter un plus grand nombre d'animaux, en reproduisant au mieux une infection qui surviendrait naturellement, mais le nombre de bactéries infectant les animaux testés ne peut toutefois pas être connu de manière précise.

Cette étude a montré que pour mener une évaluation du caractère de résistance à une infection par *V. aestuarianus*, il est préférable d'utiliser un protocole d'infection expérimentale par cohabitation plutôt qu'un protocole par injection.

En effet, lorsqu'un protocole par injection est utilisé, les mortalités constatées sont supérieures à 90%, quelle que soit la dose de bactérie injectée et il est difficile d'observer de la variabilité dans la sensibilité à l'infection bactérienne entre les différentes lignées testées. Cependant, avec le protocole par injection, une différence a pu être observée selon les doses injectées : la dose la plus faible a entraîné des mortalités significativement inférieures à celles rapportées pour les doses les plus importantes. Cependant, ce protocole n'a pas permis de

discriminer efficacement les différentes lignées étudiées. Ce résultat peut être expliqué par le franchissement de barrières naturelles par l'injection dans le muscle adducteur, ce qui peut avoir outrepassé des mécanismes de défense intervenant dans les voies d'accès normalement empruntées par les agents pathogènes, qui peuvent être constituées par la cavité palléale, le système digestif, les branchies, etc.

A contrario, l'utilisation du protocole par cohabitation a permis d'observer une grande variabilité de sensibilité cohabitation s'est également révélé adapté pour évaluer la résistance à une infection par OsHV-1. De plus, ce protocole s'est montré reproductible d'une expérience à l'autre pour un même stade de développement. L'observation de différences entre lots sélectionnés ou non pour leur survie sur estran au stade naissain a donc été possible : le protocole par cohabitation est un protocole plus adapté que le protocole par injection pour l'évaluation de la sensibilité aux infections induites par OsHV-1 et par *V. aestuarianus* et pour l'estimation de la part de la variance génétique de ces caractères.

III.4.2 Les profils de mortalités sont fonction du stade de développement des lots étudiés

III.4.2.1 Primo-infection au stade juvénile

Les profils de mortalité observés lors d'une primo-infection au stade juvénile ont été identiques pour les infections à OsHV-1 et à *V. aestuarianus* : les lignées sélectionnées ont montré des taux de mortalité significativement plus faibles que ceux observés pour les lignées témoins.

En ce qui concerne l'infection par OsHV-1, ces résultats sont cohérents avec les évaluations réalisées sur le terrain et montre que la sélection mise en œuvre au stade naissain sur estran permet d'améliorer significativement la survie à l'infection par OsHV-1, même en utilisant une sélection massale.

En ce qui concerne l'infection par *V. aestuarianus*, ces résultats suggèrent que la sélection sur estran au stade naissain a eu pour conséquence une meilleure survie à l'infection bactérienne. Ils suggèrent également une meilleure résistance des lignées sélectionnées sur estran au stade naissain aux infections à OsHV-1 et à *V. aestuarianus* pour le stade juvénile. Au cours du processus de sélection sur estran, les animaux ont été en contact avec le virus, comme en témoigne les analyses réalisées sur les animaux moribonds [7], mais probablement également

en contact avec d'autres agents potentiellement infectieux et notamment des Vibrions, ce qui a pu avoir pour effet de réaliser une sélection pour les deux agents infectieux ou une sélection pour une robustesse générale du naissain.

III.4.2.2 Une exposition simultanée induit de forts taux de mortalité chez les juvéniles

Une exposition simultanée aux deux agents pathogènes étudiés montre une augmentation significative de mortalité, notamment aux stades de développement intermédiaires (naissain tardif ou juvénile) en comparaison avec des infections par un seul des agents. Il avait été observé des mortalités supérieures lorsque deux agents bactériens de l'espèce *Vibrio* étaient associés : deux espèces de *V. splendidus* [13] ou des espèces de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* [137]. Cette plus grande virulence d'un mélange d'espèces bactériennes peut être expliquée par une coopération bactérienne (quorum sensing) [119, 120]. En complément, lors d'une infection par OsHV-1, une rapide colonisation par des espèces de *Vibrio* est observée et qu'une intense réplication virale précède la mort des animaux [180]. Une interaction directe entre virus et bactéries aboutissant à une plus grande virulence est d'ailleurs observée pour d'autres infections, cela a notamment été démontré chez l'homme [203, 204]. Les virus peuvent collaborer avec les bactéries au regard des processus pathologiques (pénétration, croissance, interférences avec le système immunitaire). De même, les bactéries peuvent favoriser à leur tour le développement de l'infection virale en causant des dommages à l'hôte (production de protéases) et aident les virus à infecter les hôtes. Les deux agents pathogènes peuvent également agir indépendamment mais leurs effets combinés peuvent aboutir à une plus grande virulence.

III.4.2.3 Primo-infection au stade adulte, influence du statut reproducteur

Toutefois, ces profils de mortalité n'ont pas été retrouvés lors des primo-infections expérimentales réalisées sur les mêmes lignées au stade adulte et les animaux ont présenté des taux de mortalités beaucoup plus importants au stade adulte au cours de deux expériences successives. Ainsi, en cohérence avec les résultats présentés dans le premier chapitre, les animaux plus âgés ont montré une sensibilité supérieure à l'infection bactérienne au stade adulte par rapport au stade juvénile. De plus, les deux populations utilisées ont montré des

profils de mortalité très différents et ces résultats suggèrent une interaction complexe entre le génotype et le stade de développement.

Le profil général de mortalité observé dans la première expérience sur les adultes a été retrouvé dans la deuxième expérience, même si les taux de mortalité constatés étaient inférieurs. Pour expliquer cette différence, deux hypothèses peuvent être mises en avant. D'une part, les animaux utilisés avaient subi des mortalités sur le terrain, en relation avec une infection par OsHV-1 ou à *V. aestuarianus* ou tout autre agent infectieux, et avaient donc subi une pression de sélection supplémentaire ce qui a pu augmenter leur résistance. D'autre part, la première expérience menée sur les adultes s'est déroulée en mai, tandis que la seconde expérience a été réalisée en novembre, ce qui représente une période de pré-ponte, avec une gamétogénèse avancée pour la première et une période post-ponte pour la seconde. Les animaux avaient donc un statut reproducteur différent. Des expériences ont montré que la période de gamétogénèse correspond à une période de plus grande sensibilité chez les mollusques [140, 205-207]. De plus, les huîtres, juste après la ponte montrent également une plus grande sensibilité, ce qui montre l'importance de statut reproducteur dans la sensibilité aux maladies. Cette plus grande sensibilité a été montrée avec des événements de mortalité faisant intervenir des vibrions chez *C. gigas* [91, 138, 207], mais également lors d'épisodes faisant intervenir OsHV-1 [208]. La prise en compte du statut reproductif mériterait donc de faire l'objet d'observation lors d'évaluation de la sensibilité des huîtres à une infection, qu'elle soit d'origine virale ou bactérienne.

Ces résultats suggèrent que les mortalités constatées suite à une infection bactérienne, et plus spécifiquement à *V. aestuarianus* résultent d'une interaction complexe entre le génotype, le stade de développement, le stade de reproduction et le statut immunitaire.

III.4.2.4 *C. gigas* peut être infecté successivement par *V. aestuarianus* ne protègent pas les huîtres d'infections ultérieures

Un des essais réalisés au cours de cette étude s'est attaché à déterminer si les huîtres ayant survécu à une infection bactérienne montrait une meilleure résistance à une autre infection. Ainsi, nous avons réalisé des infections successives avec les animaux qui avaient résisté aux précédentes infections, les animaux survivants étant maintenus entre les deux expériences

dans des conditions d'élevage favorables à leur maintien, avec une température stable et un apport nutritif régulier.

Nous avons constaté que les animaux survivants restaient sensibles à l'infection et qu'un premier contact avec la bactérie ne les protégeait pas. Nous avons cependant constaté que les taux de mortalités observés sur les animaux survivants réinfectés étaient inférieurs aux taux initiaux sans qu'il soit possible de déterminer si les animaux étaient moins sensibles ou si l'exposition des animaux à la bactérie était de moindre intensité. Ces profils de mortalités avaient déjà été constatés pour d'autres espèces de mollusque, notamment *Haliotis tuberculata*, après deux infections successives avec l'agent infectieux *V. harveyi* [209]. Les résultats obtenus pour des infections successives à *V. aestuarianus* contrastent avec ceux obtenus avec une infection par OsHV-1, notamment lors des épisodes de mortalité constatés en environnement extérieur. En effet, les survivants à une infection virale montrent des taux de mortalités beaucoup plus bas l'année suivante [210, 211].

Finalement, les taux de mortalité obtenus après plusieurs infections successives à *V. aestuarianus* ont été extrêmement importants (de 84% à 100%) pour toutes les lignées étudiées.

III.4.3 Impact de la sélection sur les profils de mortalité

Au cours de leur cycle de production, les huîtres sont en permanence en contact avec des agents potentiellement infectieux présents dans l'environnement. Toutefois, il a été observé sur estran que les mortalités rapportées en lien avec la présence d'OsHV-1 touchaient principalement les animaux à un stade précoce tandis que les épisodes de mortalités qui impliquaient *Vibrio aestuarianus* touchaient les animaux plus âgés [181]. Ces observations ont également été observées au cours d'infection induites en conditions expérimentales [132] et il a été démontré que le naissain est plus sensible aux infections par OsHV-1 et que les adultes sont plus sensibles aux infections par *V. aestuarianus*. Ces résultats ont été confirmés au cours des expériences menées par la présente étude.

Par ailleurs, notre étude confirme plusieurs autres résultats. Les populations sélectionnées pour une meilleure résistance sur estran au stade naissain [7] montrent une meilleure résistance aux infections expérimentales par OsHV-1 quel que soit le stade de développement. On observe toutefois que les différences observées entre les deux populations sélectionnées ou non sélectionnées s'amenuisent avec l'âge, ce qui confirme le développement d'une

résistance avec ce dernier paramètre. Notre étude confirme également que la sélection pour une meilleure résistance à une infection par OsHV-1 ne confère pas une meilleure résistance ou une plus grande susceptibilité à une infection par *V. aestuarianus*, notamment au stade adulte, en accord avec les expériences menées dans le cadre de ce travail. Le fait qu'une sélection pour améliorer la résistance à une maladie ne confère pas une meilleure résistance à une autre maladie, sous-entendant qu'il n'y a pas de corrélation génétique pour ces deux caractères avait déjà été observé dans d'autres études sur *C. virginica* [212, 213], *Sarcostrea glomerata* [193] ou *C. gigas* [13].

III.4.4 Impact du niveau de ploïdie sur la résistance aux infections

Un des principaux apports de cette étude est l'utilisation d'animaux triploïdes. La triploïdie a été induite chimiquement, à partir des animaux diploïdes sélectionnés pour une meilleure résistance à OsHV-1, ce qui permet de ne pas confondre la polyploïdie et les facteurs génétiques. En ce qui concerne les infections expérimentales par OsHV-1, nos résultats montrent que la triploïdie n'affecte pas la résistance à OsHV-1 et les mortalités observées sont du même ordre pour les huîtres triploïdes et pour les huîtres diploïdes.

III.4.5 L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire permet de discriminer les lots étudiés selon leur statut immunitaire

Avant la mise en œuvre des expériences d'infection expérimentale, des animaux ont été prélevés dans chaque lot et analysés afin de déterminer un profil d'expression de gènes relatifs à l'immunité. Le choix des gènes a été fondé sur des études précédentes qui avaient déterminé un ensemble de gènes dont l'expression avait varié au cours d'infection par des vibrions.

Nos résultats ont montré une grande variabilité dans l'expression de gènes relatifs à l'immunité selon l'âge et la population étudiée. Cette variabilité a permis de discriminer les différentes lignées d'animaux et a montré une corrélation entre l'expression de gènes relatifs à l'immunité des lignées et leur sensibilité à l'infection bactérienne plutôt qu'à leur fond génétique. Ainsi, il a été possible de différencier les lots présentant des sensibilités différentes

vis-à-vis de l'infection bactérienne et ce aux deux stades de développement pour lesquels l'expression des gènes avait été déterminée.

Cette étude montre donc la possibilité d'utiliser l'analyse de l'expression de gènes relatifs à l'immunité pour discriminer des lots d'huîtres selon leur sensibilité à une infection bactérienne, à deux âges différents et indépendamment de leur fond génétique. Parmi l'ensemble des gènes étudiés, l'expression de quatre d'entre eux était commune aux deux âges et aux lignées étudiées. Ces gènes étaient relatifs à des fonctions antimicrobiennes, des réponses anti-oxydatives, à l'adhésion cellulaire et à la reconnaissance cellulaire. Ainsi, une approche globale de transcriptomique devrait permettre d'élucider les bases transcriptomiques de la résistance des huîtres à une infection bactérienne.

IV. QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GÉNÉRALE

L'histoire de l'ostréiculture est émaillée de successions de phases de développement, pouvant faire intervenir différentes espèces, et de phases de régression, notamment dues à la surexploitation ou à des épizooties. En France, l'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, a été introduite lors de l'opération RESUR, afin de remplacer l'huître portugaise, *C. angulata*, qui a presque disparu suite à une épizootie, faisant intervenir au moins un agent pathogène de type iridovirus [214]. L'huître creuse du Pacifique est actuellement l'huître majoritairement cultivée à travers le monde, suite à son introduction volontaire, accidentelle ou suite à son implantation invasive.

En France, dès son introduction, des épisodes récurrents de mortalités ont affecté *C. gigas*. D'abord décrites sur des adultes en période estivale, et de ce fait qualifiées de mortalités estivales, des mortalités importantes ont également affecté, à partir des années 90, des animaux aux stades naissain et juvéniles. On parle alors de surmortalités ou de mortalités massives. Ces surmortalités ont été décrites comme ayant une étiologie complexe et multifactorielle. Les études menées entre 2001 et 2005 dans le cadre du programme de recherche pluridisciplinaire MOREST (MORTalités ESTivales) ont établi que ces phénomènes faisaient intervenir, de manière concomitante des paramètres environnementaux tels la température, le niveau trophique, les apports des bassins versants ou le sédiment, des conditions physiologiques particulières (notamment liées à l'effort de reproduction) en association avec des micro-organismes potentiellement pathogènes tels l'herpès virus OsHV-1 et des vibrions appartenant principalement au clade *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *Vibrio aestuarianus* [215]. Au cours du projet MOREST, les bases génétiques de la résistance aux mortalités estivales et aux surmortalités ont été mises en évidence [19, 62, 185] et ont permis de sélectionner des lignées résistantes et des lignées sensibles [216], lignées qui ont été utilisées pour étudier des locus de caractères quantitatifs (QTL, quantitative trait locus) [217] et des marqueurs génétiques [218, 219] et physiologiques [220, 221] de la résistance .

Depuis 2008, la situation a sensiblement évolué et un nouveau pallier a été franchi. En effet, à partir de cette année, les mortalités observées se sont accrues en intensité, engendrant des taux de mortalité jusqu'à 90% [222]. Ces mortalités massives ont touché en particulier les jeunes animaux et ont fait craindre pour l'avenir de la filière, déclenchant une grave crise ostréicole. Un nouveau variant a été identifié, OsHV-1 μ var, et ce variant a « remplacé » le variant classiquement détecté dans l'ensemble des zones de production françaises dès 2009, véhiculé par les nombreux transferts de naissains qui sont pratiqués dans le cycle de production de

l'ostréiculture française, sur l'ensemble des façades maritimes [223]. Le nouveau variant a également été détecté dans la plupart des régions de productions ostréicoles européennes utilisant des naissains d'origine française [179]. La virulence supérieure de ce nouveau variant n'a pas été strictement démontrée mais reste une hypothèse prépondérante pour expliquer les mortalités massives observées à partir de 2008.

Cette crise a été aggravée à partir de 2012 par l'apparition de mortalités sur les animaux adultes, de taille commerciale, et dont l'agent étiologique principal a été identifié comme appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* [14-16]. Ainsi, la production ostréicole française a-t-elle été réduite de 100 000 tonnes commercialisées en 2008 à 80 000 tonnes en 2014.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces mortalités notamment l'émergence d'une nouvelle souche plus virulente de *V. aestuarianus*, une sensibilité accrue des huîtres, en particulier due à une corrélation négative apparente entre les mortalités au stade naissain dues à l'infection par OsHV-1 et l'infection au stade adulte par *V. aestuarianus*.

IV.1 Synthèse des principaux résultats obtenus

IV.1.1 Paramètres génétiques de la sensibilité aux infections par *Vibrio aestuarianus* et par OsHV-1 μ var

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* et la résistance à l'infection par OsHV-1 augmentaient avec l'âge et la taille des animaux. L'héritabilité pour le caractère de résistance à l'infection par *V. aestuarianus* est nulle pour le stade naissain à modérée pour le stade adulte. Les expériences menées confirment que l'héritabilité est importante pour la résistance à l'infection par OsHV-1 quel que soit le stade. Les corrélations génétiques entre la résistance aux deux infections étudiées sont nulles quels que soient les stades étudiés. Les expériences menées en conditions expérimentales sont fortement corrélées aux expériences menées sur le terrain pour un même stade de développement et un même agent infectieux détecté majoritairement.

L'étude des paramètres génétiques de la résistance aux infections par OsHV-1 montre qu'il est possible de mettre en œuvre un programme de sélection pour améliorer la résistance aux deux maladies. Dans un premier temps, une sélection peut être menée dès le stade naissain pour améliorer la résistance à l'infection par OsHV-1. Il est ensuite possible de mener une sélection pour améliorer la résistance à l'infection par *V. aestuarianus* avec les animaux sélectionnés au stade naissain.

Les expériences menées ont également confirmé que les facteurs environnementaux jouent un rôle majeur pour le développement de l'infection par *V. aestuarianus*. Parmi les facteurs environnementaux reconnus comme pouvant entraîner une baisse des capacités immunitaires sont citées la température, la quantité et la qualité des ressources alimentaires et les nombreux polluants. Par ailleurs, des facteurs de stress liés aux pratiques culturales peuvent également diminuer les capacités du système immunitaire.

En utilisant des animaux issus des mêmes familles déployés sur estran au même âge mais à des tailles et à des poids différents, nous avons montré le rôle prépondérant d'OsHV-1 dans les mortalités et le rôle limité de *V. aestuarianus* au printemps. Cependant, la détection concomitante de *V. aestuarianus* et d'OsHV-1 en automne, associée à des mortalités, suggère le rôle conjoint de ces deux agents pathogènes dans les mortalités à des stades de développement ultérieurs. La taille est un facteur significatif pour expliquer l'intensité des mortalités, la plupart des familles étant plus sensibles à l'infection par OsHV-1 aux petites tailles. Quelques familles sont résistantes quelle que soit leur taille, ces familles étant les plus intéressantes à sélectionner pour une meilleure résistance à une infection virale. Quelques familles sont sensibles quelle que soit leur taille, ce qui représente un grand intérêt pour les études sur les facteurs génétiques intervenant dans la résistance à l'infection par OsHV-1.

IV.1.2 Influence de la sélection pour une meilleure résistance aux infections par OsHV-1 sur les infections par *Vibrio aestuarianus* à différents âges

Dans le premier chapitre de la deuxième partie, nous avons montré que les animaux sélectionnés sur estran pour leur résistance à l'infection par OsHV-1 au stade naissain ne présentent pas de sensibilité supérieure à l'infection par *V. aestuarianus*. Les animaux sélectionnés présentaient une robustesse générale vis-à-vis des infections étudiées aux stades naissain et juvénile mais ne présentaient plus cette robustesse au stade adulte.

L'analyse de l'expression de 31 gènes intervenant dans la réponse immunitaire sur des animaux avant expérimentation a permis de discriminer les animaux en fonction de leur sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*. Ces résultats suggèrent que la résistance à *V. aestuarianus* résulte d'une interaction complexe entre le génotype, le stade de développement et le statut immunitaire. Les animaux survivants aux expérimentations ont montré des taux de mortalités importants lorsqu'ils ont été de nouveau infectés par *V. aestuarianus* indiquant que ces survivants n'étaient pas génétiquement résistants.

Dans le deuxième chapitre la deuxième partie, nous avons montré qu'il existe différents profils de mortalité selon le stade de développement et selon l'agent pathogène considéré en réalisant des infections expérimentales avec chacun des agents pathogènes et avec une double infection simultanée. Ainsi, au stade naissain, l'infection par OsHV-1 montre le même profil qu'une double infection. Au stade adulte, l'infection par *V. aestuarianus* montre le même profil de mortalité qu'une double infection. Les juvéniles, eux, s'avèrent très sensibles aux deux infections simultanées. La plus grande virulence des deux agents pathogènes ensemble est en accord avec d'autres infections expérimentales menées avec des mixtures de différentes bactéries [120]. De plus, il a été démontré récemment qu'au début de l'infection virale, il y a une colonisation des animaux par des *Vibrio*. Ce profil de forte mortalité par coopération ou addition des effets des deux agents pathogènes ne se retrouve qu'au stade juvénile, pour lequel il a été suggéré la possible influence du stade physiologique. En effet, aux périodes pendant lesquelles les pathologies expérimentales ont été réalisées, les animaux étaient en gamétogenèse, stade physiologique au cours duquel les animaux sont plus fragiles. Enfin, l'effet de la sélection pour une meilleure résistance au stade naissain est annulé par la double infection, notamment chez les juvéniles.

L'ensemble de ces résultats, ainsi que les données bibliographiques concernant les facteurs de virulence d'OsHV-1 et de *V. aestuarianus*, nous permettent, au terme de cette étude de proposer un schéma général des liens existant entre pathologie et génétique pour les deux agents pathogènes étudiés ainsi que pour leur association.

IV.1.3 Les infections par OsHV-1 ou par *Vibrio aestuarianus* peuvent-elles être considérées et gérées comme des maladies ?

IV.1.3.1 Respect des principes de Koch et de Hill

Les résultats obtenus permettent de définir les infections par *Vibrio aestuarianus* et par OsHV-1 comme des maladies animales à part entière qu'il conviendrait de traiter comme telles. L'analyse selon les postulats de Koch d'un processus pathogénique permet de déterminer si une maladie observée est déclenchée à un agent pathogène défini [224]. Pour satisfaire aux postulats de Koch, le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains, le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*, le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsque introduit dans un organisme sain et le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Ces postulats ont été enrichis sur la base des techniques moléculaires qui ont été récemment développées, notamment si la séquence nucléique caractéristique de l'agent pathogène étudié est détectée. Cela suppose de disposer d'outils moléculaire permettant de détecter l'agent pathogène même lorsqu'il est présent en très faible quantité. Les postulats de Koch ont également été enrichis par les apports de l'épidémiologie. Ainsi, les critères de Hill, du nom de l'épidémiologiste Sir Bradford Hill (1897-1991) établis en 1965 sont un groupe de conditions minimales pour fournir une preuve adéquate d'une relation causale entre deux événements, une simple corrélation n'étant pas synonyme de causalité [225].

Ces critères sont la force de l'association (risque relatif ou Odds ratio), la cohérence (répétition des observations dans différentes populations), la spécificité (une cause produit un effet), la relation temporelle (les causes doivent précéder les conséquences), la relation dose-effet, la plausibilité biologique, preuve expérimentale et l'analogie (possibilité d'explications alternatives).

Dans son avis de juillet 2015, l'EFSA a confirmé que les postulats de Koch et les critères de Hill sont présents pour l'infection par OsHV-1 [226]. Petton et al (2015) ont nuancé ces critères en démontrant que la présence initiale de *Vibrio* au sein des huîtres accentuait la mortalité constatée [180]. L'avis de l'EFSA ne retient pas les postulats de Koch pour

l'infection par *Vibrio aestuarianus*, par manque de données expérimentales. Toutefois, nos travaux en conditions expérimentales ont permis de montrer que l'infection par *V. aestuarianus* satisfait à ces différents critères de manière répétée, pour différentes populations d'animaux et pour différents stades de développement. Ces résultats sont également confortés par des travaux récents ayant investigués l'infection par *V. aestuarianus* avec différentes souches bactériennes [227]

Ainsi, pourrions-nous considérer la vibriose à *V. aestuarianus* comme une maladie de l'huître à part entière et que la gestion de cette maladie pourrait être mis en œuvre afin d'en limiter les effets. La bactérie ne semble être majoritairement présente que dans les animaux et les animaux malades semblent être la principale source d'agents pathogènes. De plus certains facteurs apparaissent particulièrement favorisants. Parmi les facteurs environnementaux, la température, la densité des animaux, les perturbations dues aux manipulations et aux changements de milieu apparaissent comme potentiellement significatifs. Parmi les facteurs physiologiques, la gamétogenèse semble être une période particulièrement sensible pour le développement de la maladie. Enfin, la présence d'un ou de plusieurs agents microbiologiques présents dans le milieu et potentiellement pathogènes pourraient agir en association de *V. aestuarianus* et aggraver l'intensité de la maladie.

IV.1.3.2 Quel sont les facteurs qui peuvent expliquer une plus forte mortalité lors d'une infection par OsHV-1 ?

Depuis 2008, les mortalités observées sur estran pour les animaux déployés au stade présentent des taux beaucoup plus élevés que les années précédentes, ce qui a fait craindre des difficultés pour la filière de se maintenir économiquement. Un nouveau variant du virus OsHV-1 a été mis en évidence et dénommé μ var. Il a été observé que le variant μ var avait supplanté le variant classique en l'espace de deux années. Actuellement, seul le variant μ var est retrouvé dans les analyses diagnostiques, avec toutefois des mutations observées. Plusieurs facteurs peuvent expliquer les effets différents du variant μ var et du variant de référence.

1/ le variant μ var présente une virulence supérieure au variant de référence. Cette hypothèse est prépondérante pour expliquer les différences de taux de mortalité observés. Toutefois, cela n'a pas été testé formellement en conditions expérimentales.

2/ le variant μ var présente une activité à partir d'une température plus basse (environ 16°C) par rapport au variant de référence (environ 19°C). Ainsi, le variant μ var intervient-il plus tôt dans la saison que le variant classique pour infecter le naissain. Il aurait de ce fait pu supplanter les autres formes et devenir prédominant. De plus, la période d'activité du virus est plus longue, ce qui peut aboutir à des mortalités plus importantes, pouvant survenir jusque tard dans la saison.

3/ les huîtres peuvent présenter une résistance plus faible aux infections (et pas seulement à celle induite par OsHV-1 mais aussi aux infections bactériennes par exemple) due à la dégradation de l'environnement. Ainsi les très nombreux polluants (pesticides, métaux lourds) agissent négativement sur la santé des huîtres. Les polluants fragilisent également le matériel chromosomique l'huître. Le virus OsHV-1 tue alors plus facilement les huîtres les plus fragiles.

4/ les changements dans les pratiques culturales ont pu favoriser l'augmentation des mortalités. En France la production de naissain par les écloséries a grandement augmenté entre 2000 et 2010. En 2000 la production de naissain était de 300 millions d'unité, elle s'élevait à 1 milliard d'unité en 2006 et à 3 milliard d'unité en 2010. Les écloséries produisaient alors du naissain non sélectionné et la production était constituée principalement de naissain naïf. Dans le même temps, les techniques pour récupérer le naissain d'origine naturelle sur des collecteurs se sont améliorées et il a été possible de déroquer du naissain de plus petite taille. Ce naissain pouvait donc être vendu avant le début des mortalités et participer aux mortalités. En conséquence, la biomasse d'huître naïve a augmenté dans tous les sites en France et la mortalité a créé un cercle vicieux. Lorsque les conditions environnementales étaient favorables, la maladie a pu s'exprimer, tuant plus de naissain et produisant toujours plus de particules virales. Cette forte concentration en virus a pu dépasser le seuil de résistance sur des animaux (qu'ils soient d'origine sauvage ou d'éclosérie) qui auraient pu normalement résister à la maladie si la quantité de naissain avait été inférieure.

IV.1.3.3 Comment expliquer l'absence d'établissement de sélection naturelle mesurable sur le terrain ?

Il est vraisemblable que les huîtres naturelles qui se reproduisent actuellement dans les stocks sauvages sont des reproducteurs ayant survécu à des mortalités liée à la présence d'OsHV-1 μ var et ont dû développer une certaine résistance aux infections virales. Cette résistance est

mesurable chez les animaux survivants qui ont servi de reproducteur pour la production de naissain en écloserie et cela a abouti à la productions de naissain présentant une résistance aux infections par OsHV-1 très supérieure au naissain produit naturellement et collecté dans le milieu. Il n'est toutefois actuellement pas possible de mesurer une résistance suite à la pression virale lorsqu'elle est exercée sur le terrain. Les huîtres produites en écloserie par ponte massive en utilisant des reproducteurs sauvages échantillonnés dans le milieu naturel montrent des taux de mortalité lors d'infection virale qui restent importants, généralement compris entre 70 et 80% pour les lots produits entre 2008 et 2016.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer pourquoi la résistance aux infections par OsHV-1 n'augmente pas dans le milieu naturel, comme on pourrait s'y attendre selon le théorème de Fisher de la sélection naturelle.

1/ Dans le milieu naturel, les générations d'huîtres se chevauchent et des reproducteurs anciens peuvent libérer des gamètes portant des allèles défavorables ou des allèles neutres à chaque période de ponte. Cela peut diminuer le taux d'adaptation par dilution génétique. Les stocks d'huîtres sauvages sont difficiles à estimer, de nombreux bancs sont inaccessibles ou être dans des conditions favorables et protégés des infections par OsHV-1 qui surviennent sur les huîtres cultivées. Des estimations menées sur le bassin normand montrent que la population des animaux sauvages pourrait représenter la moitié de la population totale.

2/ L'introduction répétée de reproducteurs non sélectionnés provenant de diverses origines géographiques (en France, hors de France et/ou d'écloserie) et qui ne sont pas adapté à un environnement particulier peut limiter les progrès de la sélection. Ce phénomène est également appelé charge de migration, il s'oppose aux effets de sélection divergente au sein des populations et diminue là aussi le taux d'adaptation par dilution.

3/ La sélection naturelle ne s'exerce pas seulement sur un caractère mais sur l'ensemble d'un phénotype. Comme le filtre sélectif le plus important s'exerce au niveau du stade larvaire, il pourrait y avoir un trade-off, ou corrélation négative entre la survie à ce stade et la survie aux infections à OsHV-1 aux stades ultérieurs. Ce phénomène pourrait retarder l'adaptation des populations d'huîtres au virus.

4/ La survie de *C. gigas* aux infections par OsHV-1 est un caractère qui se comporte essentiellement de façon additive. Toutefois, il est possible que l'architecture génétique de la résistance aux infections par OsHV-1 ne soit pas purement additive au niveau des gènes.

De plus des effets d'épistasie peuvent intervenir et freiner le taux d'adaptation, notamment sous l'effet des polluants nombreux, variés et pouvant avoir des effets de synergie que l'on retrouve dans le milieu marin.

Ces différents effets peuvent se combiner entre eux et ainsi expliquer que, malgré une pression importante des infections à OsHV-1 μ var exercée chaque année, le naissain capté naturellement continue de présenter une sensibilité importante aux infections à OsHV-1 μ var.

IV.2 Perspectives

Les paramètres génétiques évalués au cours de cette étude pour des caractères de résistance montrent que les composantes génétiques de la survie doivent être prises en compte dans les études relatives à la survie des huîtres. Ils permettent d'envisager différentes voies de recherche pour i) mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de résistance aux infections par OsHV-1 et par *V. aestuarianus*, ii) sélectionner des lignées doublement résistantes à OsHV-1 et à *V. aestuarianus* et iii) améliorer la gestion du risque zoonositaire chez l'huître creuse *C. gigas* pendant les épisodes de mortalité.

IV.2.1 Compréhension des mécanismes sous-jacents de résistance aux infections par OsHV-1 et *V. aestuarianus*

Les études en génétique quantitative ne permettent pas de déterminer les mécanismes sous-jacents de la résistance aux maladies. Les études explorant ces mécanismes montrent une très grande complexité du système immunitaire des mollusques marins, les animaux étant confrontés à un milieu extrêmement changeant et présentant une grande quantité d'agents biotiques et abiotiques en contact permanent et direct des animaux par l'intermédiaire du système circulatoire semi-ouvert [170, 228, 229].

Afin de pouvoir extrapoler à un ensemble de populations les résultats obtenus en conditions expérimentales, la mise à disposition de populations déjà étudiées d'un point de vue

phénotypiques est une perspective intéressante. Nos travaux ont permis de déterminer des différences de sensibilités pour deux maladies ayant un impact notable sur la production ostréicole selon leur stade de développement et de déterminer différents phénotypes pour l'infection par OsHV-1.

Un des phénotypes montre que des familles d'huîtres sont particulièrement sensibles quel que soit leur stade de développement. De fait, en conditions naturelles, ces familles pourraient difficilement subsister en dehors d'un milieu protégé, notamment aux abords immédiats des parcs ostréicoles. Ces familles présentent un intérêt scientifique utile dans la mesure où elles permettraient de mener des comparaisons avec des familles résistantes. Ces comparaisons pourraient permettre d'annoter précisément le génome de l'huître pour les caractères de résistance. Avec les outils génomiques récemment développés, cette annotation pourrait permettre de poursuivre la mise en évidence de QTLs relatifs à la survie [217].

Une autre manière de comparer des populations différentes est d'étudier les différences de sensibilité entre des huîtres triploïdes et des huîtres diploïdes. Des travaux récents ont ainsi étudiés la sensibilité d'huîtres diploïdes et d'huîtres triploïdes ayant le même fond génétique, par triploïdisation chimique. En ce qui concerne l'infection par OsHV-1, la ploïdie n'a pas d'influence sur les mortalités observées [199]. En ce qui concerne l'infection par *V. aestuarianus*, il semblerait que les animaux triploïdes présentent une plus grande sensibilité. Toutefois, le rendement final reste en faveur des huîtres triploïdes.

IV.2.1.1 Possibilité de création de lignées doublement résistantes à OsHV-1 et à *V. aestuarianus*

La création de lignées doublement résistantes aux infections à OsHV-1 et *V. aestuarianus* est une option intéressante mais qui nécessite des moyens importants pour réaliser une sélection familiale sur plusieurs générations. Les programmes de sélection chez les huîtres proposent différentes stratégies d'amélioration. Il est possible de mener une sélection sur la croissance, notamment si les mortalités n'ont pas un impact majeur au cours du cycle de production. Si des mortalités sont observées, une sélection sur le caractère de résistance peut être mise en œuvre.

En France, les producteurs sont confrontés à deux phénomènes de résistance bien distincts. Au stade naissain, il s'agit de l'infection herpétique, au stade adulte de l'infection bactérienne.

Nous avons montré qu'un programme de sélection familial séquentiel peut être mis en œuvre. Dans un premier temps, le caractère de résistance au stade naissain est privilégié. Dans un second temps les familles les plus résistantes à l'infection par OsHV-1 sont utilisées pour mener une sélection pour améliorer les caractères de survie à l'infection par *Vibrio aestuarianus*.

Cela suppose que cette démarche de cultiver des huîtres sélectionnées soient acceptées et mise en œuvre avec le concours de la profession.

IV.2.1.2 Perspectives pour la gestion des maladies des mollusques

Dans la mesure où les huîtres sont cultivées en milieu ouvert dans lequel de nombreux agents potentiellement pathogène sont présents et dans lequel on retrouve également des populations sauvages, l'éradication de ces agents n'est actuellement pas envisageable. Seules des mesures de gestion visant la diminution de la gravité des mortalités en atténuant les facteurs de risques semblent être adaptées. Différentes études montrent que les pratiques culturales, en modifiant les conditions environnementales des huîtres et en introduisant des facteurs de stress supplémentaires peuvent moduler les conditions physiologiques des animaux et grandement influencer l'ampleur des mortalités [230].

La meilleure connaissance des paramètres génétiques de la résistance de *Crassostrea gigas* aux deux principales pathologies les affectant permet de mieux connaître les caractéristiques phénotypiques des lots étudiés, selon le site d'accueil. Il est ainsi possible de d'étudier plus précisément les facteurs pouvant limiter au mieux l'impact de ces maladies, selon des approches épidémiologiques, pouvant faire intervenir de la modélisation [231, 232]. Cela suppose également que les parcours de vie des animaux soient connus et qu'une véritable gestion et traçabilité des lots soient mises en œuvre.

La mise en œuvre d'une grande enquête éco-épidémiologique pour déterminer les facteurs favorisant l'apparition des maladies a été récemment entreprise, comportant notamment une méta-analyse de l'ensemble des articles scientifiques parus relatifs aux mortalités des mollusques. Des expérimentations sur les possibilités de tracer les lots de façon pragmatique et opérationnelle devraient être étudiées en collaboration avec la recherche fondamentale, la recherche appliquée, l'administration et les professionnels.

BIBLIOGRAPHIE

1. FAO, *FAO year book: fishery and aquaculture statistics 2014*. FAO, Rome, 2016.
2. Fisheries, F., *Aquaculture Department (2012) The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome. **197**.
3. Lapègue, S., et al., *P4021 Genomic patterns of differentiation in native and introduced populations of the cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* and in hybrid progenies*. Journal of Animal Science, 2016. **94**(7supplement4): p. 88-89.
4. Takeuchi, T., Y. Takemoto, and T. Matsubara, *Haematological study of bacteria affected oysters*. Hiroshima-ken Suisan Shikenjo Hokoku (Report of Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station), 1960. **22**(1): p. 1-7.
5. Glude, J.B. *A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972*. in *Third U. S. Japan. Meeting on Aquaculture*. 1974. Tokyo.
6. Maurer, D., M. Comps, and E. His, *Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon*. Haliotis, 1986. **15**: p. 309-317.
7. Degremont, L., M. Nourry, and E. Maurouard, *Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations*. Aquaculture, 2015. **446**: p. 111-121.
8. Renault, T., et al., *Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of pacific oysters, *Crassostrea gigas* - a comparative-study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae*. Veterinary Research, 1995. **26**(5-6): p. 539-543.
9. Davison, A.J., et al., *A novel class of herpesvirus with bivalve hosts*. Journal of General Virology, 2005. **86**(1): p. 41.
10. Nicolas, J.-L., M. Comps, and N. Cochennec, *Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas**. Bulletin of the european Association of fish Pathologists, 1992. **12**(1): p. 11-13.
11. Segarra, A., et al., *Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008*. Virus Res, 2010. **153**(1): p. 92-9.
12. Gay, M., F.C.J. Berthe, and F. Le Roux, *Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas**. Diseases Of Aquatic Organisms, 2004. **59**(1): p. 49-56.
13. Gay, M., et al., *Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations*. Dis Aquat Organ, 2004. **62**(1-2): p. 65-74.
14. Francois, C., et al., *Bilan 2012 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*, 2013.
15. Francois, C., et al., *Bilan 2013 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*, 2014.
16. Francois, C., *Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*, 2015.
17. Renault, T., *Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, mortality outbreaks and infectious diseases*, in *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality 2012*, Nova Sciences Publishers. p. 203-225.
18. McCallum, H.I., et al., *Does terrestrial epidemiology apply to marine systems?* Trends in Ecology & Evolution, 2004. **19**(11): p. 585-591.

19. Degremont, L., et al., *Summer mortality in juvenile cupped oysters: response to selection in the field and in laboratory*. *Aquaculture*, 2005. **247**(1-4): p. 11-12.
20. Delaporte, M., et al., *Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007. **353**(1): p. 45-57.
21. Lambert, C., et al., *Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites*. *Aquaculture*, 2007. **270**(1-4): p. 276-288.
22. Tresset, A. and J.-D. Vigne, *Last hunter-gatherers and first farmers of Europe*. *Comptes Rendus Biologies*, 2011. **334**(3): p. 182-189.
23. Vandeputte, M. and P. Prunet, *Genetics of adaptation in fish: effects of domestication, stress resistance and adaptation to the environment*. *Productions Animales*, 2002. **15**(5): p. 365-371.
24. Price, E.O., *Behavioral Aspects of Animal Domestication*. *The Quarterly Review of Biology*, 1984. **59**(1): p. 1-32.
25. Vigne, J.-D., *The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere*. *Comptes Rendus Biologies*, 2011. **334**(3): p. 171-181.
26. Diamond, J., *Evolution, consequences and future of plant and animal domestication*. *Nature*, 2002. **418**: p. 700-707.
27. Vandeputte, M. and S. Launey, *The genetic management of fish domestication*. *Productions Animales*, 2004. **17**(3): p. 237-242.
28. Fisher, R.A., *On the mathematical foundations of theoretical statistics*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*, 1922. **222**: p. 309-368.
29. Kempthorne, O., *An introduction to genetic statistics*. *An introduction to genetic statistics.*, 1957.
30. Lush, J.L., *The genetics of populations*1948: Ames, Iowa.
31. Hazel, L.N., *The genetic basis for constructing selection indexes*. *Genetics*, 1943. **28**(6): p. 476-490.
32. Henderson, C.R., *Estimation of Variance and Covariance Components*. *Biometrics*, 1953. **9**(2): p. 226-252.
33. Henderson, C.R., *Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model*. *Biometrics*, 1975. **31**(2): p. 423-447.
34. Risse, J., *Histoire de l'élevage en France*, 1994, L'Harmattan.
35. Henderson, C.R., *Applications of linear models in animal breeding*. *Applications of linear models in animal breeding.*, 1984.
36. McCullers, J.A., *Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus*. *Clinical microbiology reviews*, 2006. **19**(3): p. 571-582.
37. Miki, T. and S. Jacquet, *Complex interactions in the microbial world: underexplored key links between viruses, bacteria and protozoan grazers in aquatic environments*. *Aquatic Microbial Ecology*, 2008. **51**(2): p. 195-208.
38. Liu, B.H., *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*1997: CRC press.
39. Hayes, B.J., et al., *Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges*. *Journal of dairy science*, 2009. **92**(2): p. 433-443.

40. Harris, D.L. and S. Newman, *Breeding for profit: synergism between genetic improvement and livestock production (a review)*. Journal of animal science, 1994. **72**(8): p. 2178-2200.
41. Bonaiti, B., et al., *La méthode française d'évaluation génétique des reproducteurs laitiers*. INRA Prod. Anim, 1990. **3**(2): p. 83-92.
42. Verrier, E., et al., *Amélioration génétique des animaux*, in *Polycopié AgroParisTech2009*, AgroParisTech. p. 125.
43. Lippman, Z.B. and D. Zamir, *Heterosis: revisiting the magic*. Trends in genetics, 2007. **23**(2): p. 60-66.
44. Lamkey, K.R. and J.W. Edwards, *Quantitative genetics of heterosis*. The genetics and exploitation of heterosis in crops, 1999(thegeneticsande): p. 31-48.
45. Lind, C., et al., *Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture*. Reproduction in domestic animals, 2012. **47**(s4): p. 255-263.
46. Duarte, C.M., N. Marbá, and M. Holmer, *Rapid Domestication of Marine Species*. Science, 2007. **316**(5823): p. 382-383.
47. Fontaine, P., et al., *Domestication of new species and sustainable development in fish culture*. Cahiers Agricultures, 2009. **18**(2-3): p. 119-124.
48. Gjedrem, T. and N. Robinson, *Advances by selective breeding for aquatic species: a review*. Agricultural Sciences, 2014. **5**(12): p. 1152.
49. Dupont-Nivet, M., et al., *Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs*. Aquaculture, 2006. **252**(2-4): p. 161-170.
50. Gjedrem, T., *The first family-based breeding program in aquaculture*. Reviews in Aquaculture, 2010. **2**(1): p. 2-15.
51. Chevassus, B., et al., *Enhanced individual selection for selecting fast growing fish: the "PROSPER" method, with application on brown trout (Salmo trutta fario)*. Genetics Selection Evolution, 2004. **36**(6): p. 643-661.
52. Stear, M., et al., *The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance*. Research in Veterinary Science, 2001. **71**(1): p. 1-7.
53. Lapegue, S., et al., *Development of SNP-genotyping arrays in two shellfish species*. Molecular Ecology Resources, 2014. **14**(4): p. 820-830.
54. Degremont, L., C. Garcia, and S.K. Allen, Jr., *Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review*. Journal of Invertebrate Pathology, 2015. **131**: p. 226-41.
55. Cheney, D.P., B.F. MacDonald, and R.A. Elston, *Summer mortality of Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998*. Journal of Shellfish Research, 2000. **19**(1): p. 353-359.
56. Pernet, F., et al., *Associations between farming practices and disease mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas in a Mediterranean lagoon*. Aquaculture Environment Interactions, 2014. **5**(2): p. 99-106.
57. Degremont, L., et al., *Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas)*. Aquaculture, 2005. **249**(1-4): p. 213-229.
58. Paul-Pont, I., N.K. Dhand, and R.J. Whittington, *Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters Crassostrea gigas*. Aquaculture, 2013.
59. Elston, R.A., *Infectious diseases of the Pacific oyster, Crassostrea gigas*. 1993.

60. Elston, R.A., et al., *Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Journal of Fish Diseases, 1987. **10**: p. 121-132.
61. Friedman, C.S., et al., *Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, Crassostrea gigas Thunberg*. Aquaculture, 1991. **94**(1): p. 1.
62. Degremont, L., et al., *Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (Crassostrea gigas). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth*. Aquaculture, 2007. **262**(1): p. 41-53.
63. Burge, C.A., et al., *Summer seed mortality of the Pacific oyster, Crassostrea gigas Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors*. Journal of Shellfish Research, 2007. **26**(1): p. 163-172.
64. Lacoste, A., et al., *A Vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters Crassostrea gigas in the Bay of Morlaix (North Brittany, France)*. Diseases of Aquatic Organisms, 2001. **46**(2): p. 139-145.
65. Pepin, J.F., A. Riou, and T. Renault, *Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR*. Journal of Virological Methods, 2008. **149**(2): p. 269-276.
66. Sauvage, C., et al., *Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR*. Virus Research, 2009. **142**(1-2): p. 181-187.
67. Oden, E., et al., *Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in Crassostrea gigas by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities*. Aquaculture, 2011. **317**(1-4): p. 27-31.
68. Schikorski, D., et al., *Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster Crassostrea gigas: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples*. Virus Res, 2011. **155**(1): p. 28-34.
69. Elston, R. and L. Holsinger, *Resistant flat oysters offer hope against bonamiasis*. Parasitology Today, 1988. **4**(5): p. pp. 120-121.
70. Pichot, Y., et al., *Research on Bonamia ostreae gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster Ostrea edulis L.* Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes, 1979. **43**(1): p. 131-140.
71. Culloty, S.C., M.A. Cronin, and M.F. Mulcahy, *An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters Ostrea edulis L. to the parasite Bonamia ostreae (Pichot et al., 1980)*. Aquaculture, 2001. **199**(3-4): p. 229-244.
72. Launey, S., et al., *Population bottleneck and effective size in Bonamia ostreae-resistant populations of Ostrea edulis as inferred by microsatellite markers*. Genetical Research [Genet. Res.]. 2001. **Vol. 78**(no. 3): p. pp. 259-270.
73. NaciriGraven, Y., et al., *Selecting the flat oyster Ostrea edulis (L.) for survival when infected with the parasite Bonamia ostreae*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998. **224**(1): p. 91-107.
74. Boettcher, K.J., et al., *Roseovarius crassostreae sp. nov., a member of the Roseobacter clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 4): p. 1531-7.

75. Maloy, A.P., B.J. Barber, and K.J. Boettcher, *A PCR-based diagnostic assay for the detection of Roseovarius crassostreae in Crassostrea virginica affected by juvenile oyster disease (JOD)* Dis Aquat Org, 2005. **67**(1-2): p. 155-162.
76. Mariojous, C. and J. Prou, *Changes, Adaptations, and Resilience: The Case of French Oyster Farming*, in *Marine Productivity: Perturbations and Resilience of Socio-ecosystems*, H.-J. Ceccaldi, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing. p. 299-307.
77. Grizel, H. and M. Héral, *Introduction into France of the Japanese oyster (Crassostrea gigas)*. I C E S Journal of Marine Science, 1991. **47**(3): p. 399-403.
78. Shatkin, G., S.E. Shumway, and R. Hawes, *Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (Crassostrea gigas) to the Gulf of Maine: A review of global experience*. Journal of Shellfish Research, 1997. **16**(2): p. 463-477.
79. Beninger, P.G. and A. Veniot, *The oyster proves the rule: mechanisms of pseudofeces transport and rejection on the mantle of Crassostrea virginica and C. gigas*. Marine Ecology Progress Series, 1999. **190**: p. 179-188.
80. Beninger, P.G., A. Veniot, and Y. Poussart, *Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing*. Marine Ecology Progress Series, 1999. **178**: p. 259-269.
81. Buroker, N.E., *Sexuality with respect to shell length and group-size in the Japanese oyster Crassostrea gigas*. Malacologia, 1983. **23**(2): p. 271-279.
82. Lango-Reynoso, F., et al., *Elements of reproductive strategy in oysters, Crassostrea gigas, from the "Rade de Brest", France*. Invertebrate Reproduction & Development, 1999. **36**(1-3): p. 141-144.
83. Lango-Reynoso, F., J. Chavez-Villalba, and M. Le Pennec, *Reproductive patterns of the Pacific oyster Crassostrea gigas in France*. Invertebrate Reproduction & Development, 2006. **49**(1-2): p. 41-50.
84. Soletchnik, P., et al., *Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (Crassostrea gigas): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages*. Aquatic Living Resources, 1997. **10**(3): p. 177-185.
85. Chavez-Villalba, J., et al., *Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster Crassostrea gigas*. Journal of Shellfish Research, 2003. **22**(3): p. 721-731.
86. Taris, N., et al., *Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (Crassostrea gigas)*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006. **333**(1): p. 147-158.
87. Travers, M.A., et al., *Influence of temperature and spawning effort on Haliotis tuberculata mortalities caused by Vibrio harveyi: an example of emerging vibriosis linked to global warming*. Global Change Biology, 2009. **15**(6): p. 1365-1376.
88. Li, Y., et al., *Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of Crassostrea gigas: an explanation for summer mortality in Pacific oysters*. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2007. **293**(6): p. R2353-R2362.
89. Berthelin, C., K. Kellner, and M. Mathieu, *Storage metabolism in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France)*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 2000. **125**(3): p. 359-369.

90. Soletchnik, P., N. Faury, and P. Gouletquer, *Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Ole'ron bay (France)*. *Aquaculture*, 2006. **252**(2-4): p. 328-338.
91. De Decker, S., et al., *Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011. **106**(2): p. 179-191.
92. Zhang, G., et al., *The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 49-54.
93. Gonzalez, M., et al., *Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **338**(2): p. 1089-1097.
94. Green, T.J., et al., *Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009. **26**(5): p. 799-810.
95. Olicard, C., et al., *Cytotoxic, cellular and antiviral activities of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, tissue extracts* 2003: Marine biotechnology: an overview of leading fields. 9th ESMB meeting (European Society for Marine Biotechnology meeting), Nantes, 12-14 May 2002. no. 36, pp. 73-78. Actes de colloques. Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer [Actes Colloq. IFREMER]. 2003.
96. Olicard, C., et al., *Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas**. *Antiviral Research*, 2005. **66**(2-3): p. 152.
97. Xue, Q.G. and T. Renault, *Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000. **76**(3): p. 155-163.
98. Gagnaire, B., et al., *Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)*. *Aquatic Toxicology*, 2007. **84**(1): p. 92-102.
99. Hulata, G., *Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies*. *Genetica*, 2001. **111**(1-3): p. 155-173.
100. Nell, J., *The Australian oyster industry*. *World Aquaculture*, 2002. **33**: p. 8-10.
101. Piferrer, F., et al., *Polyloid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment*. *Aquaculture*, 2009. **293**(3-4): p. 125-156.
102. Gérard, A., et al., *The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB*. *Aquaculture*, 1999. **174**(3-4): p. 229-242.
103. Allen, S.K. and S.L. Downing, *Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1986. **102**(2): p. 197-208.
104. Allen, S.K. and S.L. Downing, *Performance of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* - gametogenesis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1990. **47**(6): p. 1213-1222.
105. Guo, X., G.A. DeBrosse, and S.K. Allen Jr, *All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids*. *Aquaculture*, 1996. **142**(3-4): p. 149-161.

106. Nell, J.A., P.J. O'Riordan, and D.M. Ogburn, *Consumer evaluation of diploid and triploid Pacific oysters subjected to high pressure treatment*. Journal of Shellfish Research, 2006. **25**(3): p. 1101-1104.
107. Normand, J., M. Le Pennec, and P. Boudry, *Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave*. Aquaculture, 2008. **282**(1-4): p. 124-129.
108. Burgeot, T., et al., *Environmental stress of the Pacific oyster Crassostrea gigas during summer period*. Marine Environmental Research, 2006. **62**: p. S380-S381.
109. Geret, F., et al., *Effects of Low-Dose Exposure to Pesticide Mixture on Physiological Responses of the Pacific Oyster, Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology, 2013. **28**(12): p. 689-699.
110. Gagnaire, B., et al., *Diploid and triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters*. Aquaculture, 2006. **254**(1-4): p. 606-616.
111. Moreau, P., T. Burgeot, and T. Renault, *In vivo effects of metaldehyde on Pacific oyster, Crassostrea gigas: comparing hemocyte parameters in two oyster families*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(11): p. 8003-8009.
112. Moreau, P., et al., *Pesticides and Ostreid Herpesvirus 1 Infection in the Pacific Oyster, Crassostrea gigas*. Plos One, 2015. **10**(6).
113. Paillard, C., F. Le Roux, and J.J. Borrego, *Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution* Aquatic Living Resources, 2004. **17**: p. 477-498
114. Thompson, F.L., T. Iida, and J. Swings, *Biodiversity of Vibrios*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2004. **68**(3): p. 403-431.
115. Gevers, D., et al., *Re-evaluating Prokaryotic species*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(9): p. 733-739.
116. Hoffmann, M., et al., *Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of Vibrio species within the Harveyi clade*. Lett Appl Microbiol, 2012. **54**(2): p. 160-5.
117. Nicolas, J., et al., *Bacterial problems associated with scallop Pecten maximus larval culture* Diseases of Aquatic Organisms, 1996. **27**(1): p. 67-76.
118. Sugumar, G., et al., *Vibrio splendidus biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster Crassostrea gigas larvae* Diseases of Aquatic Organisms, 1998. **33**(2): p. 111-118.
119. Lemire, A., et al., *Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters*. Isme Journal, 2015. **9**(7): p. 1523-1531.
120. De Decker, S., Y. Reynaud, and D. Saulnier, *First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in Vibrio strains pathogenic for Pacific oyster Crassostrea gigas involving a quorum sensing system*. Aquaculture, 2013. **392**: p. 1-7.
121. Tison, D.L. and R.J. Seidler, *Vibrio-Aestuarianus - a New Species from Estuarine Waters and Shellfish*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983. **33**(4): p. 699-702.
122. Vezzulli, L., et al., *Aquatic ecology of the oyster pathogens Vibrio splendidus and Vibrio aestuarianus*. Environmental Microbiology, 2015. **17**(4): p. 1065-1080.

123. Domeneghetti, S., et al., *Mortality occurrence and pathogen detection in Crassostrea gigas and Mytilus galloprovincialis close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy)*. Fish & Shellfish Immunology, 2014. **41**(1): p. 37-44.
124. Garnier, M., et al., *Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Microbial Ecology, 2007. **53**(2): p. 187-196.
125. Saulnier, D., et al., *A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster Crassostrea gigas and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity*. Microbial Ecology, 2010. **59**(4): p. 787-798.
126. Degremont, L. and A. Benabdelmouna, *Mortality associated with OsHV-1 in spat Crassostrea gigas: role of wild-caught spat in the horizontal transmission of the disease*. Aquaculture International, 2014. **22**(6): p. 1767-1781.
127. Eiler, A., M. Johansson, and S. Bertilsson, *Environmental influences on Vibrio populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas)*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(9): p. 6004-6011.
128. Montes, M., et al., *Characterization of Vibrio strains isolated from turbot (Scophthalmus maximus) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison*. J Appl Microbiol, 2003. **95**(4): p. 693-703.
129. Wang, Y.L., et al., *Antibiotic resistance and plasmid profile of environmental isolates of Vibrio species from Mai Po Nature Reserve, Hong Kong*. Ecotoxicology, 2006. **15**(4): p. 371-378.
130. Goudenège, D., et al., *A single regulatory gene is sufficient to alter Vibrio aestuarianus pathogenicity in oysters*. Environmental Microbiology, 2015: p. n/a-n/a.
131. Garnier, M., Y. Labreuche, and J.-L. Nicolas, *Molecular and phenotypic characterization of Vibrio aestuarianus subsp francensis subsp nov., a pathogen of the oyster Crassostrea gigas*. Systematic and Applied Microbiology, 2008. **31**(5): p. 358-365.
132. Azéma, P., et al., *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 : GSE, 2017. **49**: p. 23.
133. Solomieu, V.B., T. Renault, and M.-A. Travers, *Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology, 2015. **131**: p. 2-10.
134. Labreuche, Y., et al., *Effects of extracellular products from the pathogenic Vibrio aestuarianus strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster Crassostrea gigas*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(4): p. 367-79.
135. Labreuche, Y., et al., *Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, following bacterial infection with Vibrio aestuarianus strain 01/32*. Microbes and Infection, 2006. **8**(12-13): p. 2715-2724.
136. Labreuche, Y., et al., *Vibrio aestuarianus zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster Crassostrea gigas and impairs the host cellular immune defenses*. Fish & Shellfish Immunology, 2010. **29**(5): p. 753-758.
137. De Decker, S., *Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse Crassostrea gigas et deux Vibrio pathogènes, V. splendidus et V. aestuarianus : épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse*, 2010, Université de La Rochelle.

138. Li, Y., et al., *Spawning-dependent stress responses in pacific oysters Crassostrea gigas: A simulated bacterial challenge in oysters*. Aquaculture, 2009. **293**(3-4): p. 164-171.
139. Gagnaire, B., et al., *Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg)*. Fish & Shellfish Immunology, 2006. **20**(4): p. 536-547.
140. De Decker, S. and D. Saulnier, *Vibriosis induced by experimental cohabitation in Crassostrea gigas: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes*. Fish & Shellfish Immunology, 2011. **30**(2): p. 691-699.
141. Le Deuff, R.M., et al., *Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Bulletin of the european Association of fish Pathologists, 1994. **14**(2): p. 69-72.
142. Renault, T., et al., *Herpesviruses associated with mortalities among pacific oyster, Crassostrea gigas, in France - comparative-study*. Revue De Medecine Veterinaire, 1994. **145**(10): p. 735-742.
143. Renault, T. and I. Arzul, *Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: Specific viral DNA detection by PCR*. Journal of Fish Diseases, 2001. **24**(3): p. 161.
144. Friedman, C.S., et al., *Herpes virus in juvenile Pacific oysters Crassostrea gigas from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes*. Diseases of Aquatic Organisms, 2005. **63**(1): p. 33.
145. Burge, C.A., F.J. Griffin, and C.S. Friedman, *Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster Crassostrea gigas in Tomales Bay, California, USA*. Diseases of Aquatic Organism, 2006. **72**(1): p. 31-43.
146. Jenkins, C., et al., *Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in Crassostrea gigas (Pacific oysters) in Australia*. Diseases Of Aquatic Organisms, 2013. **105**(2): p. 109-126.
147. Keeling, S.E., et al., *New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1-an opportunistic longitudinal study*. Dis Aquat Organ, 2014. **109**(3): p. 231-9.
148. Arzul, I., T. Renault, and C. Lipart, *Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: Demonstration of interspecies transmission*. Diseases of Aquatic Organisms, 2001. **46**(1): p. 1.
149. Renault, T., C. Lipart, and I. Arzul, *A herpes-like virus infecting Crassostrea gigas and Ruditapes philippinarum larvae in France*. Journal of Fish Diseases, 2001. **24**(6): p. 369.
150. Comps, M. and N. Cochenec, *A Herpes-like virus from the European oyster Ostrea edulis L*. Journal of Invertebrate Pathology, 1993. **62**: p. 201-203.
151. Martenot, C., et al., *Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, Crassostrea gigas between 2008 and 2010*. Virus Research, 2011. **160**(1-2): p. 25-31.
152. Schikorski, D., et al., *Experimental infection of Pacific oyster Crassostrea gigas spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility*. Vet Res, 2011. **42**: p. 27.
153. Paul-Pont, I., et al., *Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (Crassostrea gigas) in the Hawkesbury River estuary, Australia*. Aquaculture, 2014. **422**: p. 146-159.

154. Barbosa-Solomieu, V., et al., *Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (Crassostrea gigas)*. *Virus Res*, 2005. **107**(1): p. 47-56.
155. Mineur, F., J. Provan, and G. Arnott, *Phylogeographical analyses of shellfish viruses: inferring a geographical origin for ostreid herpesviruses OsHV-1 (Malacoherpesviridae)*. *Marine Biology*, 2015. **162**(1): p. 181-192.
156. Paul-Pont, I., N.K. Dhand, and R.J. Whittington, *Spatial distribution of mortality in Pacific oysters Crassostrea gigas: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission*. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 2013. **105**(2): p. 127-138.
157. Whittington, R.J., et al., *Protection of Pacific oyster (Crassostrea gigas) spat from mortality due to ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 mu Var) using simple treatments of incoming seawater in land-based upwellers*. *Aquaculture*, 2015. **437**: p. 10-20.
158. Arzul, I., et al., *Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic Crassostrea gigas adults*. *Virus Research*, 2002. **84**(1-2): p. 151-160.
159. Garcia, C., et al., *Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with Crassostrea gigas spat mortality in France between 1998 and 2006*. *Veterinary Research*, 2011. **42**.
160. Renault, T., et al., *Ostreid Herpesvirus 1 Infection among Pacific Oyster (Crassostrea gigas) Spat: Relevance of Water Temperature to Virus Replication and Circulation Prior to the Onset of Mortality*. *Applied and environmental microbiology*, 2014. **80**(17): p. 5419-26.
161. Pernet, F., et al., *Spatial and Temporal Dynamics of Mass Mortalities in Oysters Is Influenced by Energetic Reserves and Food Quality*. *Plos One*, 2014. **9**(2).
162. Sauvage, C., et al., *Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR*. *Virus Research*, 2009. **142**(1-2): p. 181-187.
163. Normand, J., J.-L. Blin, and A. Jouaux, *Rearing practices identified as risk factors for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection in Pacific oyster Crassostrea gigas spat*. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 2014. **110**(3): p. 201-11.
164. Fuhrmann, M., B. Petton, and F. Pernet, *Disease transmission and associated mortalities of Pacific oyster (Crassostrea gigas): does salinity matter?* *Journal of Shellfish Research*, 2015. **34**(2): p. 631-631.
165. Barranger, A., et al., *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*, 2014. **146**: p. 93-104.
166. Rittschof, D. and P. McClellan-Green, *Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology*. *Marine Pollution Bulletin*, 2005. **50**(4): p. 369-373.
167. Dégremont, L., *Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile Crassostrea gigas selected for high resistance to the summer mortality phenomenon*. *Aquaculture*, 2011. **317**(1-4): p. 94-98.
168. Segarra, A., et al., *Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2014. **119**: p. 5-11.
169. Loker, E.S., et al., *Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood*. *Immunological reviews*, 2004. **198**(1): p. 10-24.
170. Green, T.J., et al., *Antiviral immunity in marine molluscs*. *The Journal Of General Virology*, 2015. **96**(9): p. 2471-82.

171. He, Y., et al., *Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc*. Fish & Shellfish Immunology, 2015. **46**(1): p. 131-144.
172. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 343-349.
173. Moreau, P., et al., *Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and Vibrio aestuarianus infections*. Autophagy, 2015. **11**(3): p. 516-526.
174. Bachère, E., et al., *The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view*. Fish & shellfish immunology, 2015. **46**(1): p. 50-64.
175. Segarra, A., et al., *Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, Crassostrea gigas*. Veterinary Research, 2014. **45**.
176. Green, T.J., et al., *Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, has antiviral activity against herpesviruses*. Antiviral Research, 2014. **110**: p. 168-174.
177. Francois, C., et al., *Bilan 2008 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins.*, 2009.
178. Le Roux, F., et al., *Phylogenetic study and identification of Vibrio splendidus-related strains based on gyrB gene sequences*. Dis Aquat Organ, 2004. **58**(2-3): p. 143-50.
179. Health, E.P.o.A. and welfare, *Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, Crassostrea gigas*. EFSA Journal, 2010. **8**(11): p. 1894-n/a.
180. Petton, B., et al., *Crassostrea gigas mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.
181. Barbosa Solomieu, V., T. Renault, and M.-A. Travers, *Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology, 2015. **131**: p. 2-10.
182. Soletchnik, P., et al., *Les pratiques culturales peuvent-elles permettre de réduire la surmortalité du naissain d'huîtres creuses? Récapitulatif des essais d'élevage et expérimentations zootechniques menés sur le territoire français entre 2008 et 2010*, 2011.
183. François, C., et al., *Bilan 2011 du réseau Repamo*, 2012. p. 57 pp. Direct access : <http://wwz.ifremer.fr/repamo/Documentation/Rapports-d-activites>.
184. Soletchnik, P., C. Lambert, and K. Costil, *Summer mortality of Crassostrea gigas (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions*. Journal of Shellfish Research, 2005. **24**(1): p. 197-207.
185. Samain, J.F., et al., *Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes*. Aquaculture, 2007. **268**(1-4): p. 227-243.
186. Soletchnik, P., et al., *Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France*. Aquaculture, 2007. **271**(1-4): p. 384-400.
187. Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay, *Introduction to Quantitative Genetics* 1996: Harlow, England. 464.
188. Azéma, P., et al., *The use of size and growing height to improve Crassostrea gigas farming and breeding techniques against OsHV-1*. Aquaculture, 2017. **471**: p. 121-129.
189. Degremont, L., *Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in Crassostrea gigas*. Aquaculture, 2013. **416**: p. 129-134.

190. Petton, B., et al., *Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters Crassostrea gigas*. Aquaculture Environment Interactions, 2015. **6**(3): p. 205-222.
191. Whittington, R.J., et al., *Further observations on the influence of husbandry practices on OsHV-1 mu Var mortality in Pacific oysters Crassostrea gigas: Age, cultivation structures and growing height*. Aquaculture, 2015. **438**: p. 82-97.
192. Ragone Calvo, L.M., G.W. Calvo, and E.M. Burreson, *Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, Crassostrea virginica, strain tested in Chesapeake Bay*. Aquaculture, 2003. **220**(1-4): p. 69-87.
193. Dove, M.C., J.A. Nell, and W.A. O'Connor, *Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster Saccostrea glomerata (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (Martelia sydneyi) and winter mortality (Bonamia roughleyi)* Aquaculture Research, 2013. **44**(11): p. 1791-1800
194. Kong, N., et al., *Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) using a molecular pedigree*. Aquaculture Research, 2015. **46**(2): p. 499-508.
195. Garcia, C., et al., *Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with Crassostrea gigas spat mortality in France between 1998 and 2006*. Vet Res, 2011. **42**: p. 73.
196. Renault, T., et al., *Herpes-like virus infecting Japanese oyster (Crassostrea gigas) spat*. Bulletin of the european Association of fish Pathologists, 1994. **14**(2): p. 64-66.
197. Azema, P., et al., *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, 2015. **46**(1): p. 139.
198. Azéma, P., et al., *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, 2016. **139**: p. 92-101.
199. Degremont, L., et al., *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, 2016. **47**(3): p. 777-786.
200. Walton, W.C., et al., *Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, Crassostrea virginica: Survival, growth, shape, condition index and Vibrio abundances*. Aquaculture, 2013. **414**: p. 260-266.
201. Dégremon, L., et al., *Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid Crassostrea virginica*. Journal of Shellfish Research, 2012. **31**(1): p. 21-31.
202. Hand, R.E., et al., *Studies on triploid oysters in Australia. XI. Survival of diploid and triploid Sydney rock oysters (Saccostrea commercialis (Iredale and Roughley)) through outbreaks of winter mortality caused by Mikrocytos roughleyi infestation*. Journal of Shellfish Research [J. Shellfish Res.]. 1998. **17**,(4.): p. 1129-1135.
203. Slots, J., *Interactions between herpesviruses and bacteria in human periodontal disease*. 2002.
204. Kamma, J.J. and J. Slots, *Herpesviral–bacterial interactions in aggressive periodontitis*. Journal of clinical periodontology, 2003. **30**(5): p. 420-426.
205. Travers, M.-A., et al., *Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, Haliotis tuberculata to Vibrio harveyi infection*. Fish & Shellfish Immunology, 2008. **25**(6): p. 800-808.

206. Travers, M.-A., et al., *Influence of temperature and spawning effort on Haliotis tuberculata mortalities caused by Vibrio harveyi: an example of emerging vibriosis linked to global warming*. Global Change Biology, 2009. **15**(6): p. 1365-1376.
207. Wendling, C.C. and K.M. Wegner, *Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and Vibrio infection to summer mortality phenomena in Pacific oysters*. Aquaculture, 2013. **412**: p. 88-96.
208. Degremont, L., et al., *Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in Crassostrea gigas affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles?* Aquaculture, 2013. **408**: p. 51-57.
209. Travers, M.A., et al., *Gene expression patterns of abalone, Haliotis tuberculata, during successive infections by the pathogen Vibrio harveyi*. Journal of Invertebrate Pathology, 2010. **105**(3): p. 289-297.
210. Degremont, L., et al., *Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Aquaculture, 2010. **299**(1-4): p. 44-50.
211. Pernet, F., et al., *Mass mortalities of Pacific oysters Crassostrea gigas reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France*. Aquaculture Environment Interactions, 2012. **2**(3).
212. Burreson, E.M., *Susceptibility of MSX-resistant strains of the eastern oyster, Crassostrea virginica, to Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research, 1991. **10**(1): p. 305-306.
213. Frank-Lawale, A., S.K. Allen, and L. Degremont, *Breeding and Domestication of Eastern Oyster (Crassostrea Virginica) Lines for Culture in the Mid-Atlantic, USA: Line Development and Mass Selection for Disease Resistance*. Journal of Shellfish Research, 2014. **33**(1): p. 153-165.
214. Grizel, H. and M. Héral, *Introduction into France of the Japanese oyster (Crassostrea gigas)*. Journal du Conseil: ICES Journal of Marine Science, 1991. **47**(3): p. 399-403.
215. Samain, J.F. and H. McCombie, *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. Défi Morest.2007: Quae. 332.
216. Degremont, L., P. Soletchnik, and P. Boudry, *Summer Mortality of Selected Juvenile Pacific Oyster Crassostrea Gigas under Laboratory Conditions and in Comparison with Field Performance*. Journal of Shellfish Research, 2010. **29**(4): p. 847-856.
217. Sauvage, C., et al., *QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (Crassostrea gigas)*. Animal Genetics, 2010. **41**(4): p. 390-399.
218. Sauvage, C.C.S., S. Lapegue, and P. Boudry, *Identification of SNPs and their mapping for the identification of QTLs of resistance to summer mortality in the Pacific oyster Crassostrea gigas*. Aquaculture, 2007. **272**: p. S309-S309.
219. Fleury, E., et al., *Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (Crassostrea gigas) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase*. BMC Genomics, 2009. **10**.
220. Sellos, D., et al., *Structure of amylase genes in populations of Pacific Cupped oyster (Crassostrea gigas): tissue expression and allelic polymorphism*. Mar Biotechnol (NY), 2003. **5**(4): p. 360-72.
221. Huvet, A., et al., *The identification of genes from the oyster Crassostrea gigas that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality*. Gene, 2004. **343**(1): p. 211-20.

222. Cochenne-Laureau, N., et al., *Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, Crassostrea gigas : acquis des recherches en 2010*, 2011.
223. Pernet, F., et al., *Mortalités massives de l'Huître creuse: causes et perspectives*, 2011.
224. Henle, J. and F. Marchand, *Von den Miasmen und Kontagien und von den miasmatisch-kontagiösen Krankheiten (1840)*1910, Leipzig: J. A. Barth.
225. Hill, A.B., *The Environment and Disease: Association or Causation?* Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1965. **58**(5): p. 295-300.
226. Health, E.P.o.A. and Welfare, *Oyster mortality*. EFSA Journal, 2015. **13**(6): p. 4122-n/a.
227. Travers, M.-A., et al., *Several strains, one disease: experimental investigation of Vibrio aestuarianus infection parameters in the Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Veterinary Research, 2017. **48**(1): p. 32.
228. Green, T.J., et al., *Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (Crassostrea gigas) to viral and bacterial infections*. Veterinary Research, 2016. **47**: p. 72.
229. Zhang, T., et al., *The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (Crassostrea gigas) against secondary challenge with Vibrio splendidus*. Developmental & Comparative Immunology, 2014. **45**(1): p. 141-150.
230. Pepin, J.-F., P. Soletchnik, and S. Robert, *Mortalités massives de l'Huître creuse. Synthèse - Rapport final des études menées sur les mortalités de naissains d'huîtres creuses C. gigas sur le littoral charentais pour la période de 2007 à 2012*, 2014.
231. Pernet, F., et al., *Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016. **371**(1689): p. 20150213.
232. Carrasco, N., et al., *A Production Calendar Based on Water Temperature, Spat Size, and Husbandry Practices Reduce OsHV-1 μ var Impact on Cultured Pacific Oyster Crassostrea gigas in the Ebro Delta (Catalonia), Mediterranean Coast of Spain*. Frontiers in Physiology, 2017. **8**: p. 125.

Title : Genetic parameters characterization of the resistance to certain infectious agents in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, in the context of mass mortalities.

Keywords: *Crassostrea gigas*, herpesvirus, vibrios, disease resistance, challenge, selection

Abstract:

In France, two main diseases are threatening oyster production. Since 2008 and each year, *Crassostrea gigas* spat regularly suffers massive losses involving the herpes virus OsHV-1 μ var and since 2012 significant mortalities in commercial size adults are related to *Vibrio aestuarianus* detection.

The genetic basis for the resistance to the vibriosis, and the nature of the genetic correlations for the resistance to *V. aestuarianus* and OsHV-1 were accessed using twenty half-sib families, each containing two full-sib families. For each disease, controlled infectious challenges were conducted at the spat, juvenile and adult stages. In addition, field trials were used to appreciate whether or not the laboratory trials reflected the mortality events encountered by the oyster industry. Our study revealed the genetic basis for resistance to *V. aestuarianus* in *C. gigas*, confirmed a strong genetic basis for resistance to OsHV-1 infection and revealed the absence of genetic correlations between resistance to OsHV-1 infection and resistance to *V. aestuarianus* infection.

Using the same families, we describe further observations on the influence of two husbandry practices on mortality caused by OsHV-1 in *C. gigas* spat indicating the importance of the size for mortality associated with OsHV-1 and a significant interaction between family and the size group. A second investigation compared the growing height using the same 40 families which was found to have a protective effect with a significant interaction between family and growing height.

A hypothesis to explain the sudden increase in mortality observed in France since 2012 is that selective pressure due to recurrent viral infections could have led to a higher susceptibility of adults to *Vibrio* infection. In our study, two OsHV-1-resistant lines and their respective controls were experimentally challenged in the laboratory to determine their level of susceptibility to *V. aestuarianus* infection. These results were confirmed by the analysis of the expression of 31 immune-related genes in unchallenged oysters. Differential gene expression discriminated oysters according to their susceptibility to infection at both the juvenile and adult stages, suggesting that resistance to *V. aestuarianus* infection resulted in complex interactions between the genotype, stage of development and immunity status.

Oysters selected for their higher resistance to OsHV-1 are now available for the industry. The impact of *V. aestuarianus* on such oysters remains uncertain, especially for triploids. We found different mortality patterns depending on the pathogen tested. The mortality pattern was similar for oysters exposed to OsHV-1 or to both pathogens in the Spat trial. The mortality pattern was similar for oysters exposed to *V. aestuarianus* or to both pathogens in the Adult trial. Mortality was much higher for the Juvenile trial given a dual exposure. Finally, oysters exposed to both pathogens could experience dramatic mortality rates, even in oysters selected. Our study demonstrated for the first time that triploid oysters were more susceptible to experimental challenges at the spat stage to *V. aestuarianus* than their diploid siblings

Titre : Caractérisation des paramètres génétiques de la résistance à certains agents infectieux chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités massives.

Mots-clés : *Crassostrea gigas*, herpesvirus, vibrions, résistance aux maladies, épreuves pathologiques, sélection

Résumé :

En France, deux maladies menacent la production ostréicole. Depuis 2008 et chaque année, le naissain de *Crassostrea gigas* subit régulièrement des pertes massives impliquant le virus de l'herpès OsHV-1μvar et depuis 2012, des mortalités significatives chez les adultes de taille commerciale sont liées à la détection de *Vibrio aestuarianus*.

Les bases génétiques de la résistance à la vibriose et les corrélations génétiques de la résistance à *V. aestuarianus* et à OsHV-1 ont été estimées en utilisant quarante familles selon un croisement biparental. Pour chaque maladie, des épreuves infectieuses en milieu contrôlé ont été menées aux stades de naissain, juvénile et adulte. Des essais sur le terrain ont été réalisés pour déterminer si les expériences en laboratoire reflétaient ou non les événements de mortalité rencontrés par l'industrie ostréicole. Notre étude a montré la base génétique de la résistance à *V. aestuarianus* chez *C. gigas*, a confirmé une forte base génétique pour la résistance à l'infection par OsHV-1 et a révélé l'absence de corrélations génétiques entre la résistance à ces deux infections. En utilisant les mêmes familles, avons observé l'influence de deux pratiques d'élevage sur la mortalité causée par OsHV-1, indiquant l'importance de la taille pour la mortalité associée à OsHV-1 et une interaction significative entre la taille et la famille. Une deuxième étude a comparé la hauteur sur estran ce qui s'est avéré avoir un effet protecteur avec une interaction significative entre la famille et la hauteur sur estran.

Une hypothèse pour expliquer l'augmentation soudaine de la mortalité observée en France depuis 2012 est que la pression sélective due aux infections virales récurrentes aurait pu conduire à une plus grande sensibilité des adultes à la vibriose. Dans notre étude, deux lignées résistantes à l'infection par OsHV-1 et leurs témoins respectifs ont été testés expérimentalement en laboratoire pour déterminer leur degré de sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus*. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de l'expression de 31 gènes de l'immunité chez des huîtres non challengées. L'expression différentielle des gènes a discriminé les huîtres en fonction de leur susceptibilité à l'infection aux stades juvénile et adulte, ce qui suggère des interactions complexes entre le génotype, le stade de développement et l'état immunitaire.

Des huîtres sélectionnées pour leur plus grande résistance à OsHV-1 sont maintenant disponibles pour l'industrie. L'impact de *V. aestuarianus* sur ces huîtres sélectionnées reste incertain, en particulier sur les huîtres triploïdes. Nous avons observé des profils de mortalité différents selon les agents pathogènes testés. Le profil de mortalité était semblable pour les huîtres exposées à OsHV-1 ou aux deux agents pathogènes dans l'essai sur naissain. Le profil de mortalité était similaire pour les huîtres exposées à *V. aestuarianus* ou aux deux agents pathogènes dans l'essai sur les adultes. La mortalité était beaucoup plus élevée pour l'essai sur juvénile lors d'une double exposition. Enfin, les huîtres exposées aux deux agents pathogènes pouvaient connaître des taux de mortalité spectaculaires, même chez les huîtres sélectionnées. Notre étude a démontré pour la première fois que les huîtres triploïdes étaient plus sensibles aux infections expérimentales par *V. aestuarianus* au stade naissain que leurs équivalents diploïdes.