



Bases génétiques de la réponse à l'infection par Flavobacterium psychrophilum chez la truite arc-en-ciel : approche expérimentale et perspectives en sélection

Clémence Fraslin

► To cite this version:

Clémence Fraslin. Bases génétiques de la réponse à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel : approche expérimentale et perspectives en sélection. Génétique animale. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA038 . tel-02185038

HAL Id: tel-02185038

<https://theses.hal.science/tel-02185038>

Submitted on 16 Jul 2019

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.

Bases génétiques de la réponse à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel : approche expérimentale et perspectives en sélection

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech
(Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement et Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Génétique Animale

Thèse présentée et soutenue à Paris le 20 Décembre 2018, par

Clémence Fraslin

Composition du Jury :

Xavier Rognon Professeur, AgroParisTech	Président du jury
Pierre Boudry Chercheur, Ifremer (LEMAR)	Rapporteur
Sylvie Quiniou Senior scientist, USDA – ARS	Rapporteur
François Allal Chercheur, Ifremer (Marbec)	Examineur
Pierrick Haffray Chercheur, SYSAF	Examineur
Thierry Morin Chef d'unité, ANSES (PVP)	Examineur
Rachel Rupp Directrice de Recherche, INRA (GenPhyse)	Examinatrice
Edwige Quillet Directrice de recherche, INRA (GABI)	Directrice de thèse

En essayant continuellement, on finit par réussir. Donc :

Plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.

Les devises Shadoks, Jacques Rouxel

Remerciements

Moi qui suis si bavarde, j'ai du mal avec les discours et les remerciements, cette page que vous lisez en premier a donc été la dernière pierre ajoutée à ce long manuscrit. Durant ces 3 années de thèse j'ai été particulièrement bien entourée, et je vous remercie tous et toutes pour ces moments passés ensemble.

En premier lieu, je tenais évidemment à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, **Edwige Quillet**. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagnée dans cet univers de la génétique que je ne connaissais pas bien et de m'avoir permis de m'y sentir à mon aise et d'avoir su me pousser quand il le fallait pour éviter que je ne me repose sur mes lauriers. Merci pour tes idées foisonnantes, tes conseils pertinents, pour nos longues discussions toujours passionnantes qui n'ont fait que renforcer mon envie de travailler en aquaculture.

Naturellement, cette thèse n'aurait pas été possible sans le **SYSAAF**. Merci de m'avoir permis d'effectuer cette thèse en toute liberté, ça aura été un réel plaisir d'être une « sysaafreuse » pendant ces trois années. Merci d'avoir été le point d'ancrage de cette thèse, que je souhaitais appliquée, pour ne pas renier mon âme d'ingénieure. Merci particulièrement à **Pierrick Haffray**, ta connaissance pointue des filières aquacoles française et ton enthousiasme débordant à en partager les rouages sont à la base de mon envie de faire cette thèse et de continuer chez les poissons (ou toutes autres formes de bêtes aquatiques). Merci d'avoir su m'intégrer dans l'équipe, auprès des sélectionneurs et merci pour tes nombreuses questions pertinentes qui nous ont poussées à aller toujours un peu plus loin.

Ces trois années n'auraient pas eu la même saveur sans la fabuleuse équipe **Génétique et Aquaculture**.

Merci d'abord à toi, **Francine**, pour la colocation plus qu'agréable. Même si je suis partie deux fois (contre ma volonté), c'était un vrai plaisir de revenir ! Merci pour nos nombreuses discussions, sur la flavobactériose, les cartes, les QTL et pas que. Merci tout spécialement à toi, **Florence**, ancienne Faidherbarde. Pour ton aide précieuse, ton temps, tes conseils avisés, tes encouragements dans les moments difficiles et ta patience. Merci mille fois pour ta relecture et ton enthousiasme ! J'espère que les 11 prochains mois seront à l'image des 11 derniers (le stress de la fin en moins !). **Delphine**, merci de m'avoir hébergée dans ton bureau et de m'avoir supportée pendant la pire période de cette thèse, merci pour ton sourire, ton soutien, ton enthousiasme et ta gentillesse. C'était bien, ces deux mois de coloc ! **Nicolas**, merci pour ton aide précieuse à mon arrivée et pour ta patience pour m'aider à me lancer dans le monde obscur de la bio-informatique. **Céline**, merci pour les gâteaux (c'est primordial), pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton soutien moral ! **Catherine**, l'autre nordiste, merci pour les fous rires et ton aide précieuse pour 57KT ! Merci aussi à **Marc**, parce qu'au final sans mon stage chez toi, je n'en serais pas là. Merci au reste de l'équipe ceux qui sont encore là, ceux qui sont partis et ceux qui n'ont fait que passer, **Margaux**, **René**, **Patricia**, **Laury**, **Christelle**. Merci enfin à la cheffe, **Mathilde**, pour tes encouragements, pour ton implication dans la vie de l'équipe et dans la cellule communication et médiation ! Merci surtout pour tes conseils avisés pour mes différents oraux, sans toi il y aurait eu beaucoup moins de succès et tellement plus de stress.

Je n'aurais pas fait cette thèse sans le SYSAAF, plus qu'un employeur vous étiez ma deuxième équipe !

Un grand merci à **Sophie**, pour ta disponibilité, ton soutien et nos nombreuses discussions pendant les deux premières années de ma thèse. Merci d'avoir fait le lien régulièrement avec le SYSAAF. Merci aussi pour le temps passé à la relecture d'une partie de ce manuscrit. **Romain**, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton enthousiasme débordant ! Mille mercis d'avoir pris le temps de relire une partie de ce (trop long) manuscrit. Un grand merci à l'ensemble du SYSAAF aqua, **Anastasia**, **Florian**, et aussi, **Daniel**, **Rosine** et **Marie-Christine**, les nouveaux, et mais aussi les anciennes, **Anne-Sophie** et **Amélie**. Merci à tous d'avoir su m'intégrer aux discussions avec les professionnels et de m'avoir donné le sentiment de faire quelque chose d'utile.

Au sein de GABI, je tenais à remercier particulièrement **Maria Bernard** et **Mathieu Charles**, pour leur aide plus que précieuse en bio-info et leur disponibilité. Un grand merci aux personnes de l'équipe IIP de la VIM sans qui les infections avec *Fp* n'auraient jamais eu lieu et particulièrement, un immense merci à **Jean-François Bernardet** et **Pierre Boudinot**. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre aide plus que précieuse sur *Fp* et l'immunologie pour la rédaction des articles et la relecture de ce manuscrit.

Many thanks to the team from the Roslin Institute, even if you probably won't read it, particularly to **Ross Houston** & **Christos Palaikostas** for the time you took to welcome me when I came to Scotland and for the good work we did together in the FISHBOOST project. Thank you also to **Diego**, **Alejandro** and **Carolina** for the warm welcome and the valuable time we spent together in Edinburg and elsewhere!

Je tiens à remercier aussi les membres de mon comité de thèse, **Frédérique Pitel** et **Christine Dilmann** pour les discussions intéressantes et votre enthousiasme lors des différents comités. Un merci particulier à **Pascale Le Roy**, pour ta disponibilité quand il a fallu répondre à mes nombreuses questions sur les secrets de QTLMap. Merci aussi à **Xavier Rognon**, professeur de génétique animale à AgroParisTech pour ta disponibilité et ton soutien logistique le jour de la soutenance. En SIFA je t'avais dit « ah non, franchement, jamais Jouy », je suis contente d'avoir finalement suivi ton conseil. Merci d'avoir accepté de suivre cette thèse, après avoir accepté de suivre mon stage de M2, la boucle est bouclée.

J'ai aussi eu la chance d'être inscrite dans une école doctorale qui fait attention à ses doctorants, qui est dynamique et qui nous permet de nous épanouir durant ces 3 années difficiles. Je tiens chaleureusement à remercier l'ensemble du personnel d'**ABIES** pour sa disponibilité, son enthousiasme, son suivi et pour le temps accordé à chacun de ses doctorants.

Et pour finir, merci à toutes ces personnes qui m'ont permis de garder la tête sur les épaules, de décompresser et de finir cette thèse dans la bonne humeur !

Les filles de la danse Africaine, **Luciane** et **Hawa** nos professeures. Pour la sueur, le défouloir et m'avoir fait aimer les lundis pendant deux ans (et ça continue !). Les membres de **Doc'J** les nouveaux, anciens et les plus anciens, **Clem**, **Marie**, **Tatiana**, **Elise**, **Abarna**, **Mathieu**, **Aline**, **Gabriel**, les membres honoraires de Doc'J, **Deborah**, **Baudoin**, **Roxanne**, pour les soirées jeux de sociétés, les afterwork déguisés, les barbecues, et les moments de détente. Merci aux autres doctorants GenAqua, **Jo** et **Bastien** pour le soutien, pour les tisanes boost et les petits messages d'encouragement, je vous souhaite le meilleur. Un merci tout particulier à **Lucas** et **Bertrand** pour les repas en petit comité qui nous permettent de ne pas perdre la raison, pour le café (le bon comme le mauvais) et pour le soutien moral ! Et enfin, un immense merci à **Thérèse**, sans toi ça aurait été mille fois plus dur. Ta gentillesse, ta bonne humeur, ta douceur, tes conseils et nos pauses thés auront été une aide plus que précieuse !

Mes parents, pour votre soutien pendant ces longues années d'études, malgré la distance. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussée à faire toujours plus, toujours mieux ! **Maman**, promis j'arrête de faire des études stressantes ! **Papa**, tu dis « ny adala no toa an-drainy », je pense plutôt que « ny hazo no tonga lakana ny tany naniriany no tsara ». Merci à **Aldéric** et **Saïna** d'avoir pris le temps de venir assister à ma soutenance (entre futurs docteurs ^^). Merci à **Agnès**, **Monique**, **Anne** et **Bruno** d'avoir été les représentants de la famille Frasin lors de cette après-midi si particulière. Merci aux **Petitprez**, pour les week-end ensoleillés dans le Nord, à la maison. Merci aux **Forrer**, pour la pêche à la truite à Pâques, les manalas et le chocolat chaud à la St Nicolas et les retrouvailles comme à Tana qui font toujours un bien fou !

Merci aux vieux amis, **Marion**, **Juliette**, **Julien**, **Alexandra**, **Jade**, **Isabelle**, aux copines de prépa **Diane** et **Sékolène** et aux copains de l'Agro, **Delphine**, **Nicolas**, **Hélène**, **Valentine**, **Charles**, **Margot**, **Titi** et **Lucas** (oui encore, tu le mérites !). Merci pour tous les petits moments de retrouvailles et grandes occasions qui m'ont permis de m'échapper de temps en temps et de penser à autre chose qu'aux truites.

Merci à toi aussi, le **chaat**, tes ronrons font de toi le meilleur assistant de bibliographie du monde !

Et enfin, **Florent**, merci pour tout, vraiment tout. Il n'y a que nous pour nous lancer simultanément dans cette folle aventure qu'est la thèse, il n'y a qu'avec toi que j'ai pu la mener à bout. Merci d'être là, de croire en moi, chaque jour. Merci d'avoir été ce soutien sans faille pendant ces 3 années ... j'ai tellement hâte de continuer à vivre de belles et folles aventures avec toi !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ANNEXES.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
1. INTRODUCTION GENERALE ET ETAT DE L'ART	15
1.1. LA TRUITE ARC-EN-CIEL, ONCORHYNCHUS MYKISS, UNE ESPECE MODELE EN GENETIQUE	17
1.1.1. Taxonomie de la truite arc-en-ciel	20
1.1.2. Biologie, reproduction et fécondation artificielle de la truite arc-en-ciel.....	21
1.1.2.1. Caractéristiques, habitat et nutrition de la truite arc-en-ciel	21
1.1.2.2. Déterminisme du sexe et reproduction	22
1.1.2.3. Principes des différentes techniques de manipulations chromosomiques chez les poissons et applications chez la truite arc-en-ciel	24
1.1.2.3.1. La polypléidisation : l'obtention d'individus triploïdes et tétraploïdes	24
1.1.2.3.2. La gynogenèse et l'androgenèse : l'obtention d'individus originaux d'origine uni-parentale	28
1.1.3. Les lignées isogéniques, un formidable outil pour les généticiens	29
1.1.3.1. Obtention.....	29
1.1.3.2. Intérêt et utilisation d'individus haploïdes doublés et de lignées isogéniques en analyse génétique des caractères	30
1.1.4. La génétique et la génomique de la truite arc-en-ciel.....	33
1.1.4.1. Les ressources génétiques et génomiques disponibles	35
1.1.4.1.1. Ressources génétiques	35
1.1.4.1.2. Ressources génomiques.....	36
1.1.4.1.2.1. Les bases de données de marqueurs moléculaires.....	36
1.1.4.1.2.2. Des premières cartes génétiques et physiques	38
1.1.4.1.3. ... à l'assemblage du génome	40
1.1.5. Les principales méthodes de génotypages utilisées en aquaculture	42
1.1.5.1. Le génotypage par séquençage : la technologie RADseq	42
1.1.5.2. Les puces à ADN, le génotypage par fluorescence	46
CONCLUSION PARTIE 1.1.....	48
1.2. LA TRUITE ARC-EN-CIEL, UNE ESPECE D'ELEVAGE	50
1.2.1. Les chiffres clés de la production aquacole dans le monde, la place de la France et des salmonidés.....	51
1.2.2. La filière de production de truite arc-en-ciel en France.....	53
1.2.2.1. Organisation de la filière truite en France.....	53
1.2.2.2. Particularité de la production de TAC : élevage en monosex femelles, triploïdes	55
1.2.2.3. La reproduction dans les élevages	55
1.2.3. L'amélioration génétique de la truite arc-en-ciel en France.....	57
1.2.3.1. Les différentes méthodes de sélection chez la TAC.....	59
1.2.3.1.1. La sélection sur le phénotype.....	59
1.2.3.1.1.1. La sélection individuelle : de la sélection massale à la méthode PROSPER.....	59
1.2.3.1.1.2. La sélection généalogique.....	60
1.2.3.1.2. La sélection sur le génotype	63

1.2.3.1.2.1.	La sélection assistée par marqueurs : prédire la valeur d'un individu à partir de quelques marqueurs moléculaires associés statistiquement à une performance.....	63
1.2.3.1.2.2.	Vers la sélection génomique : prédire la valeur d'un individu à partir de marqueurs denses couvrant l'ensemble du génome	65
1.2.3.2.	Les différents objectifs de sélection	66
1.2.3.2.1.	Caractères de production.....	67
1.2.3.2.2.	Caractères de santé et adaptation	68
CONCLUSION PARTIE 1.2.....		70
1.3.	LA GENETIQUE DE LA REPONSE AUX MALADIES, L'EXEMPLE DE LA FLAVOBACTERIOSE D'EAU FROIDE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	72
1.3.1.	<i>La flavobactériose d'eau froide.....</i>	73
1.3.1.1.	De la première observation à la caractérisation de la maladie	73
1.3.1.2.	Carte d'identité de <i>F. psychrophilum</i>	76
1.3.2.	<i>Les moyens de défense dans les élevages.....</i>	80
1.3.3.	<i>La réponse immunitaire à une infection chez la truite arc-en-ciel : exemple de la réponse à Flavobacterium psychrophilum</i>	83
1.3.3.1.	L'immunité innée et adaptatif des poissons.....	84
1.3.3.2.	L'immunité innée et adaptative et la réponse des truites arc-en-ciel à <i>F. psychrophilum</i>	87
1.3.4.	<i>Qu'est-ce que la réponse à l'infection ?.....</i>	89
1.3.4.1.	Mesurer et analyser la résistance	90
1.3.4.2.	Mesurer et analyser la tolérance et la résilience.....	93
1.3.4.3.	Déclencher l'infection : les infections expérimentales et les épisodes de mortalité naturels	94
1.3.4.3.1.	Les différentes méthodes d'infection expérimentales en condition contrôlées	95
1.3.4.3.2.	Utiliser les épisodes de mortalité naturelle.....	96
1.3.4.3.3.	Les infections expérimentales avec <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	97
1.3.4.4.	Approche QTL de l'architecture génétique d'un caractère	99
1.3.4.4.1.	La détection de QTL par analyse de liaison : la cartographie d'intervalle.....	99
1.3.4.4.2.	La détection de QTL par analyse d'association.....	103
1.3.5.	<i>L'approche LD-LA.....</i>	104
CONCLUSION PARTIE 1.3.....		106
2. LE TRAVAIL DE THESE.....		109
2.1.	CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THESE	111
2.1.1.	<i>Données de la littérature : la résistance, un caractère héritable, avec mise en évidence de quelques QTL après des infections expérimentales.....</i>	111
2.1.2.	<i>Dans les projets développés à l'INRA : mise au point d'une infection expérimentale par balnéation et utilisation des lignées isogéniques comme modèle d'analyse génétique</i>	112
2.2.	OBJECTIFS ET PLAN DU TRAVAIL DE THESE	116
3. RESULTATS		121
3.1.	ARCHITECTURE GENETIQUE DE LA REPONSE A <i>FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM</i> : APPROCHE DANS LES CROISEMENTS EXPERIMENTAUX.....	124
3.1.1.	<i>Les composantes de la réponse à l'infection : survie, endurance, résistance, résilience et portage.....</i>	124
3.1.1.1.	Manuscrit : « Une approche QTL de la réponse de la truite arc-en-ciel à l'infection par <i>Flavobacterium psychrophilum</i> »	125
3.1.1.2.	Résultats complémentaires : infection expérimentale par injection et balnéation de la famille HD-(A02 ^R /A36 ^S) (EXP2)	150
3.1.1.2.1.	Résumé des matériels et méthodes	150

3.1.1.2.2.	Détection de QTL associés à la réponse à l'infection	152
3.1.1.3.	Discussion : les différentes composantes de la réponse à l'infection par <i>F. psychrophilum</i>	158
3.1.1.4.	Conclusion.....	160
3.1.2.	<i>Analyser plus finement la résistance : l'épistasie</i>	162
3.1.2.1.	Publication scientifique : "Quantitative trait loci for resistance to <i>Flavobacterium psychrophilum</i> in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions"	163
3.1.2.2.	L'existence d'interactions entre QTL confirmées avec la famille HD-(A02 ^R /A36 ^S) (EXP2).....	182
3.1.2.3.	Discussion et conclusion : la résistance un caractère complexe (EXP3a et EXP2)	184
3.1.3.	<i>L'effet de la souche de F. psychrophilum utilisée (EXP3a et EXP3b)</i>	187
3.1.3.1.	L'EXP3b : résumé du matériel et méthode	187
3.1.3.2.	L'EXP3b : principaux résultats	188
3.1.3.3.	Comparaison des résultats avec l'EXP3a : l'effet de la souche de <i>F. psychrophilum</i> sur la résistance	188
3.1.3.4.	Discussion et conclusion : effet des souches bactériennes	190
3.1.4.	<i>La réponse précoce à l'infection dans la rate : charge bactérienne précoce et expression de gènes codant pour la protéine C3 du système du complément</i>	192
3.1.4.1.	Méthodologie.....	193
3.1.4.2.	Rapport spléno-somatique et charge bactérienne précoce dans la rate.....	193
3.1.4.3.	Expression des gènes <i>c3</i> et <i>c3-3</i> dans la rate 76h après l'infection	197
3.1.4.4.	Discussion et conclusion	200
3.2.	LA RESISTANCE A LA FLAVOBACTERIOSE EN CONDITION D'ELEVAGE	202
3.2.1.	Publication scientifique : "La résistance des truites arc-en-ciel à la flavobactériose d'eau froide : identification de deux nouveaux QTL après un épisode de mortalité naturel dans une pisciculture française "	203
3.2.2.	Résultats complémentaires : GWAS sur le caractère STATUT (mort/vivant).....	211
3.2.3.	Bilan de l'approche sur une lignée standard	212
4.	DISCUSSION GENERALE	218
4.1.	INTERETS ET LIMITES DE L'ETUDE	221
4.1.1.	Les ressources génétiques utilisées	221
4.1.2.	Les outils de génotypage	223
4.1.3.	Phénotyper la réponse à <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	224
4.2.	DIVERSITE DES DETERMINISMES GENETIQUES CHEZ LES TRUITES ARC-EN-CIEL POUR REpondre A L'INFECTION PAR <i>F. PSYCHROPHILUM</i> ..	228
4.2.1.	Différentes composantes de la réponse à l'infection, en partie contrôlées par des déterminismes génétiques spécifiques	228
4.2.2.	La résistance à <i>F. psychrophilum</i> , un caractère polygénique dont le déterminisme est complexe	230
4.2.3.	L'effet du protocole infectieux sur les déterminismes génétiques de la résistance	233
4.2.4.	Un noyau de QTL associés à la résistance, quel que soit le caractère et le protocole infectieux	236
4.3.	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES : L'AMELIORATION GENETIQUE DE LA RESISTANCE A <i>FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM</i> ...	239
4.3.1.	Quels caractères faut-il améliorer ?	239
4.3.2.	Avec quelle méthode d'infection ?	241
4.3.3.	Avec quelle méthode de sélection?	242
	REFERENCES	245
	VALORISATIONS DES RESULTATS	270
	ANNEXES	271

Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de références obtenues pour un mot clef associés aux principales espèces de poissons dans le monde. Recherche effectuée dans Web of Science (All Databases, depuis 1933)

Figure 2. Ensemble des domaines de recherche des 2 773 publications de Web of Science (All Databases) pour l'année 2017 réalisé avec la recherche « TOPIC : rainbow trout or *Oncorhynchus mykiss* or *Salmo gairdneri* »

Figure 3. Aire probable de distribution naturelle de la truite arc-en-ciel (Fishbase)

Figure 4. Arbre phylogénétique de la truite arc-en-ciel (Inspiré de Froschauer et al., 2006)

Figure 5. Principe de la polyploïdie, de la gynogenèse et de l'androgenèse

Figure 6. Taille des génomes de différents organismes

Figure 7. Organisation du génome de la truite arc-en-ciel

Figure 8. Principes des différentes technologies RADseq

Figure 9. Principe du génotypage avec les puces à ADN issues de la technologie Affymetrix

Figure 10. Evolution de la production mondiale de produits issus de la pêche et l'aquaculture (tonne)

Figure 11. Organisation de la filière salomonicole en France

Figure 12. Répartition régionale de la production salomonicole en France

Figure 13. Caractères sélectionnés en Europe en 2009 dans le cadre des programmes de sélection AquaBreeding.

Figure 14. Lésions caractéristiques de flavobactériose observées chez la truite arc-en-ciel après infection expérimentale par balnéation (a) et injection (b)

Figure 15. Origine géographique de différents isolats de *F. psychrophilum* français provenant de fermes d'élevage de salmonidés dans deux principales régions la Bretagne (a) et l'Aquitaine (b) et regroupement des ST en complexe-clonal (c). Issu de (Siekoula-Nguedia et al., 2012)

Figure 16. Les trois voies métaboliques du système du complément (issue de Zhang et Cui, 2014)

Figure 17. Décomposition de la résistance globale d'un individu à une maladie, un agent pathogène

Figure 18. Définition des concepts de tolérance et résilience comme utilisés dans cette thèse

Figure 19. Principe de détection des QTL par analyse de liaison dans un dispositif simplifié composé d'individus haploïdes doublés (HD)

Figure 20. Principe de la cartographie par intervalle pour détecter des QTL

Figure 21. Courbes de survie pour une partie des lignées isogéniques de la collection de l'INRA après une infection expérimentale par balnéation (gauche) et par injection (droite)

Figure 22. Classement de différentes lignées isogéniques selon leur résistance à une infection par injection (haut de la figure) ou par balnéation (bas de la figure)

Figure 23. Classement des six lignées isogéniques de truite arc-en-ciel ayant été utilisées comme F0 pour les différents croisements permettant de produire les familles QTL selon leur valeur de risque ratio après une infection expérimentale avec *F. psychrophilum* par balnéation (A) et par injection (B)

Figure 24. EXP2 : Courbes de mortalité des individus HD-(A02^R/A36^S) après une infection expérimentale par balnéation (courbe bleue) et par injection (courbe orange)

Figure 25. Position des différents QTL associés au STATUT, à l'ENDURANCE, à la RESISTANCE et à la RESILIENCE sur les chromosomes Omy3 et Omy17

Figure 26. EXP2 : QTL associés à différents caractères de la réponse à l'infection expérimentale par balnéation ou injection de TAC par *F. psychrophilum*

Figure 27. Positions des deux QTL commun, détectés dans les EXP1 et EXP2 sur les chromosomes 12 et 25a

Figure 28. EXP2 : Taux de survie des individus selon l'origine des allèles portés par les deux QTL en interaction

Figure 29. EXP3b : Evolution du rapport spléno-somatique dans la famille HD-(AP2^R/B57^S) après une infection par injection avec la souche JIP02/86

Figure 30. EXP3b : Distribution des valeurs individuelles de charge bactérienne dans la rate de poissons issu de la famille HD-(AP2^R/B57^S) 76h après une injection avec la souche JIP02/86

Figure 31. EXP3b : Répartition des individus en fonction de l'origine (AP2^R ou B57^S) de l'allèle à Omy3 et Omy13 dans les trois catégories de charge bactérienne dans la rate mesurée 76h après infection par injection avec la souche JIP02/86 de *F. psychrophilum*

Figure 32. EXP3b : Evolution de l'expression (Δ CT) des deux gènes *c3-3* (Omy17) et *C3* (Omy2) dans la rate après une infection expérimentale par injection avec *F. psychrophilum*

Figure 33. EXP3b : Niveau d'expression des gènes *c3-3*(haut de la figure) et *c3* (bas de la figure) dans la rate d'individus abattus 76h après une infection par injection avec *F. psychrophilum*, en fonction de leur allèle aux différents eQTL

Figure 34. EXP4 : Manhattan plot représentant l'association entre les SNP et la résistance à *F. psychrophilum* mesurée par la caractère STATUT détecté à l'aide du logiciel GCTA

Figure 35. Résumé des différents QTL associés à la DDM et/ou au STATUT détectés dans l'EXP4 et déjà identifiés dans les croisements expérimentaux

Figure 36. Puissance d'un t-test dans une famille d'individus haploïdes doublés en fonction de l'effet de substitution allélique du QTL

Figure 37. Rappel des approches théoriques et pratiques de la résistance, la tolérance et la résilience

Figure 38. Résumé de l'ensemble des 39 QTL associés aux composantes de la résistance et détectés dans cette étude

Figure 39. Distribution des QTL en fonction de leur effet sur les caractères de résistance (STATUT, ENDURANCE, DDM et RESISTANCE)

Figure 40. Diagrammes de Venn présentant les résultats de détection de QTL associés aux caractères de résistances après une infection par injection, balnéation ou une infection naturelle avec *F. psychrophilum*

Figure 41. Les QTL sur les chromosomes Omy2, 3, 17 et 25a sont très conservés dans plusieurs de nos croisements expérimentaux ainsi que dans la lignée commerciale

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau comparatif des différentes techniques de génotypage par séquençage (adapté de Andrews et al., 2016 ; Robledo et al., 2017)

Tableau 2. Récapitulatif des différentes expériences à l'origine des résultats présentés dans cette thèse

Tableau 3. EXP2 : Statistiques descriptives du poids, de la croissance et du taux de survie des individus HD-(A02^R/A36^S) infectés par balnéation et injection

Tableau 4. EXP2 : QTL associés aux différents caractères de réponse à une infection expérimentale par **balnéation** et par **injection** dans la famille HD-(A02^R/A36^S)

Tableau 5. EXP2 : Interactions entre les Omy17.1 et les nouveaux QTL associés au STATUT détectés après une infection expérimentale par balnéation

Tableau 6. EXP3b : QTL associés à la résistance à *F. psychrophilum* détectés dans la famille HD-(AP2^R/B57^S) après une infection expérimentale par injection avec la souche JIP02/86

Tableau 7. QTL associés aux différents caractères de résistance dans après une infection par **injection** et/ou **balnéation** l'EXP3a et après infection par **injection** l'EXP3b

Tableau 8. EXP3b : Valeur moyenne de l'index spléno-somatique en fonction de la charge bactérienne dans la rate 76h après l'injection avec la souche JIP02/86

Tableau 9. EXP3b : QTL associés à la charge bactérienne dans la rate de poissons HD-(AP2^R/B57^S) 76h après une infection par injection intramusculaire à l'aide de la souche JIP02/86

Tableau 10. EXP3b : QTL associé à l'expression dans la rate 76h après une infection expérimentale par injection avec la souche JIP02/86 de *F. psychrophilum* de deux gènes *c3-3* et *c3codant* pour les protéines C3-3 et C3 du système complément

Tableau 11. EXP4 : Résumé de la détection de QTL associés au STATUT

Tableau 12. EXP1, EXP2, EXP3a et EXP3b : Tableau récapitulatif du nombre de QTL associé à une, deux ou trois composantes de la réponse à l'infection

Liste des annexes

ANNEXE 1. Quelques-uns des différents plans de croisements en aquaculture/ trutticulture en France

ANNEXE 2. Matériel et méthode de l'EXP 2

ANNEXE 3. Ensemble des QTL détectés dans cette étude

ANNEXE 4. ADDITIONAL FILES de l'article présenté au §3.1.2.1

Liste des abréviations

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BCWD : Bacterial Cold Water Disease

BAC : Chromosomes artificiels de bactéries

BLUP : *Best Linear Unbiased Prediction* = meilleur prédicteur linéaire non biaisé

CC : Complexe clonaux

CFU : Colony forming unit

cM : centiMorgan

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNV : Copies Number Variations

EST : Expressed sequence tag

DDM : Date de mort

DGC : Daily growth coefficient

DL : Déséquilibre de liaison

ddRADseq : double digest Restriction-Site Associated DNA sequencing

EBV : Estimated Breeding Values **ER** : Enzyme de restriction

GBLUP : Genomic BLUP

GBS : Genotyping By Sequencing

GWAS : Genome wide association study

HD : Haploïde doublé

IC : Intervalle de confiance

Ig : Immunoglobulines

IM : Intramusculaire

IP : Intra-péritonéale

LA : Analyse de liaison

LDA : Analyse d'association

LD-LA : Analyse d'association et analyse de liaison

LRT : Likelihood Ratio Test

MALT : Mucosa-associated lymphoid tissue

NCCCWA : National Center for Cool and Cold Water Aquaculture

NPI : Nécrose pancréatite infectieuse

QTL : Quantitative Trait Loci

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PSV : Paralogous Sequence Variant

RADseq : Restriction-Site Associated DNA sequencing

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisms

RSS : Rapport spléno-somatique

RTFS : Rainbow trout fry syndrom

SAM : Sélection assistée par marqueurs

SG : Sélection génomique

sIgD : Secreted Immunoglobulin D

ST : Sequence type

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ssGBLUP : single step GBLUP

Ss4R : Quatrième épisode de duplication du génome entier

SY : Lignée synthétique de l'INRA

TAC : Truite arc-en-ciel

Ts3R : Troisième épisode de duplication du génome

VS : Variants structuraux

1. INTRODUCTION

GENERALE ET ETAT

DE L'ART

1.1. La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, une espèce modèle en génétique

C'est Hippocrate qui, le premier, décrit l'utilisation d'un modèle animal pour la médecine humaine (Daremborg, 1843). Depuis, les modèles animaux sont apparus comme essentiels à la recherche en biologie et ont contribué à 79 prix Nobel de physiologie et médecine. C'est le cas du mouton pour l'un des premiers Nobel de médecine attribué en 1905 à Robert Koch pour ses recherches sur la tuberculose, de la drosophile pour de nombreux prix Nobel, dont ceux décernés à Thomas Hunt Morgan, en 1933 pour ses découvertes sur le rôle joué par les chromosomes dans l'hérédité et à Jules Hoffman en 2011 pour l'étude des mécanismes de l'immunité innée. Les poissons ont été utilisés par deux lauréats, comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*) utilisée parmi d'autres animaux par Alphonse Laveran, prix Nobel en 1907 pour la découverte du rôle pathogène de certains protozoaires (Nobel Lecture, 2018) et Frederick Banting et John MacLeod, prix Nobel en 1923 pour la découverte de l'insuline (Wright, 2002). D'autres avancées importantes en biologie, en pharmacologie (Bolis et al., 2001), en médecine humaine, notamment en carcinogénèse (Bailey et al., 1996 ; Regneri et al., 2016) et en génétique ont pu être réalisées grâce à des poissons modèles comme le poisson zèbre (*Danio rerio*), le médaka (*Oryzias latipes*) ou encore la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). En France, les poissons représentaient en 2016 le deuxième groupe d'animaux modèles le plus utilisé par la recherche après la souris (MESRI, 2016).

La truite arc-en-ciel (TAC), est l'une des espèces de poisson les plus étudiées par la recherche, d'une part grâce à la grande taille de ses œufs et alevins qui en font un poisson particulièrement intéressant pour l'études des phases précoces du développement mais aussi sa grande taille qui facilite les prélèvements de quantités importantes de tissus et de cellules et certaines manipulations chirurgicales (Thorgaard et al., 2002). D'autre part, sa facilité d'élevage en fait un excellent poisson modèle pour l'ensemble des salmonidés, dont le poids économique est non négligeable en aquaculture (§1.2). En interrogeant la base de données Web of Science sur le nombre de références correspondant à certains mots-clefs (nom

vernaculaire et nom latin) pour les principales espèces piscicoles d'intérêt (Figure 1), on peut voir que jusqu'en 1971, l'espèce de référence de la majorité des publications scientifiques était la carpe commune. A partir de cette date, Le nombre de publications sur la TAC a fortement augmenté pour dépasser celles de la carpe en 1981. Jusqu'en 2007, la TAC était le poisson de référence pour le plus grand nombre de publications. Depuis, c'est le poisson zèbre plus petit, plus facile à élever et surtout avec un cycle de reproduction plus court, qui est devenu le poisson modèle le plus utilisé dans les publications scientifiques. Cependant la TAC reste un poisson particulièrement apprécié pour un grand nombre de publications dans un nombre très varié de domaines comme le montre la figure 2 qui recense les domaines de publications pour l'ensemble des 2 773 articles publiés en 2017 et contenant au moins un des trois mots clefs suivant : « rainbow trout » ou « *Oncorhynchus mykiss* » ou « *Salmo gairdneri* ».

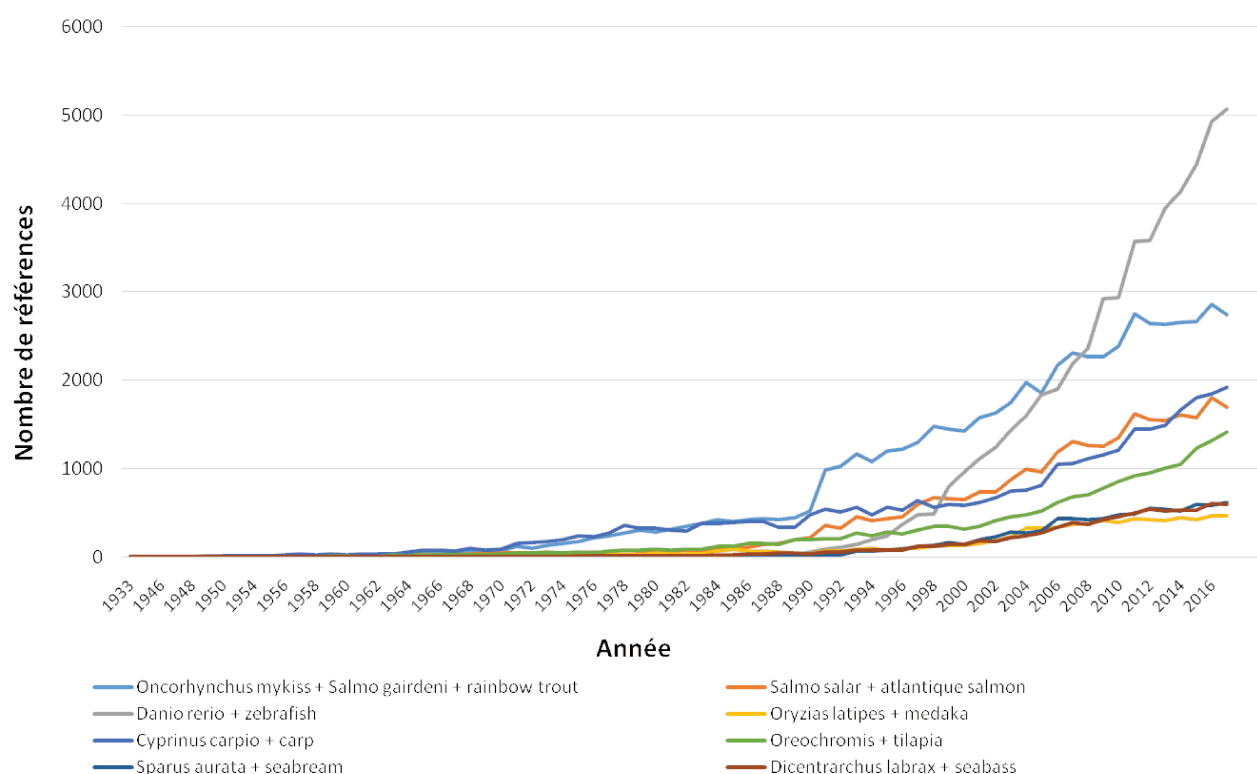


Figure 1. Evolution du nombre de références obtenues pour un mot clef associés aux principales espèces de poissons dans le monde. Recherche¹ effectuée dans Web of Science (All Databases, depuis 1933)

¹Recherche effectuée le 27/07/2018 à partir d'un poste INRA

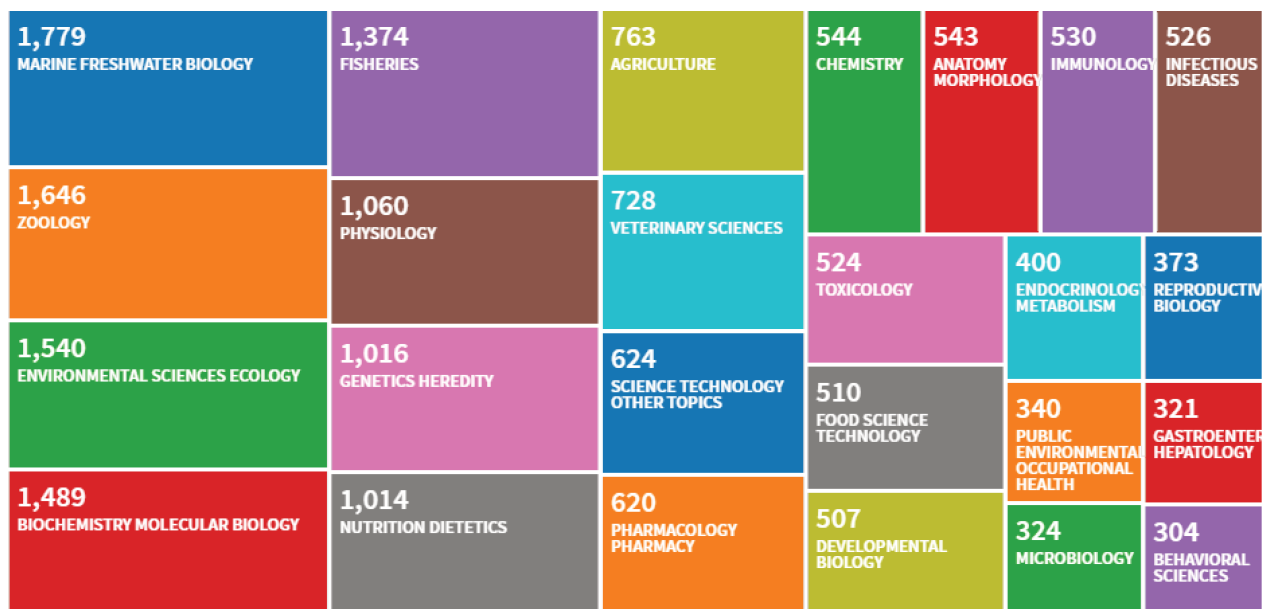


Figure 2. Ensemble des domaines de recherche des 2 773 publications de Web of Science (All Databases) pour l'année 2017 réalisé avec la recherche « TOPIC : rainbow trout or *Oncorhynchus mykiss* or *Salmo gairdneri* »

Dans cette première partie de l'introduction, on s'attachera à décrire, brièvement, la biologie de la truite arc-en-ciel en insistant sur certaines particularités (reproduction et organisation du génome) qui en font un animal modèle pour la recherche, notamment en génétique. On insistera sur les possibilités de manipulations chromosomiques et de la reproduction chez les poissons qui permettent de produire des individus aux génomes particuliers (polyploïdes, haploïdes doublés, lignées isogéniques) en s'attardant sur l'intérêt de ces individus. On terminera par la description des différentes ressources génétiques et génomiques de la truite arc-en-ciel, qui ont révolutionné la recherche en génétique chez les salmonidés. Enfin, une dernière sous partie aura pour objectif de donner un aperçu des deux principales méthodes de génotypages utilisées en aquaculture.

1.1.1. Taxonomie et origine de la truite arc-en-ciel

La truite arc-en-ciel appartient à l'ordre des Salmoniformes, à la famille des salmonidés (*Salmonidae*) et à la sous-famille des *Salmoninae*. On trouve trois principaux genres dans cette sous-famille : *Salvelinus* qui regroupe quelques truites et les ombles (ex. *Salvelinus fontinalis*, l'omble de fontaine ou *Salvelinus alpinus*, l'omble chevalier), *Salmo* qui regroupe les saumons et les truites de l'Atlantique (ex. *Salmo salar*, le saumon atlantique ou *Salmo trutta*, la truite fario) et *Oncorhynchus* qui réunit les truites et saumons du Pacifique (ex. *Oncorhynchus keta*, le saumon Pacifique).

Le rattachement de la TAC au genre *Oncorhynchus* est récent. Avant 1989 on distinguait deux espèces *Salmo gairdneri* pour les populations de truites d'Amérique du Nord et *Oncorhynchus mykiss* pour les populations de truite de la péninsule du Kamtchatka (Russie). Finalement, des données moléculaires (Okazaki, 1984 ; Smith et Stearley, 1989) ont montré d'une part que ces deux sous-ensembles appartenaient en réalité à la même espèce et d'autre part que la TAC était plus proche du saumon pacifique (*Oncorhynchus keta*) que du saumon atlantique (*Salmo salar*). *Oncorhynchus mykiss*, nom donné par Walbaum aux truites de la péninsule du Kamtchatka, est donc resté le nom scientifique de la truite arc-en-ciel (Guyomard et Vandeputte, 2010) (Figure 3).

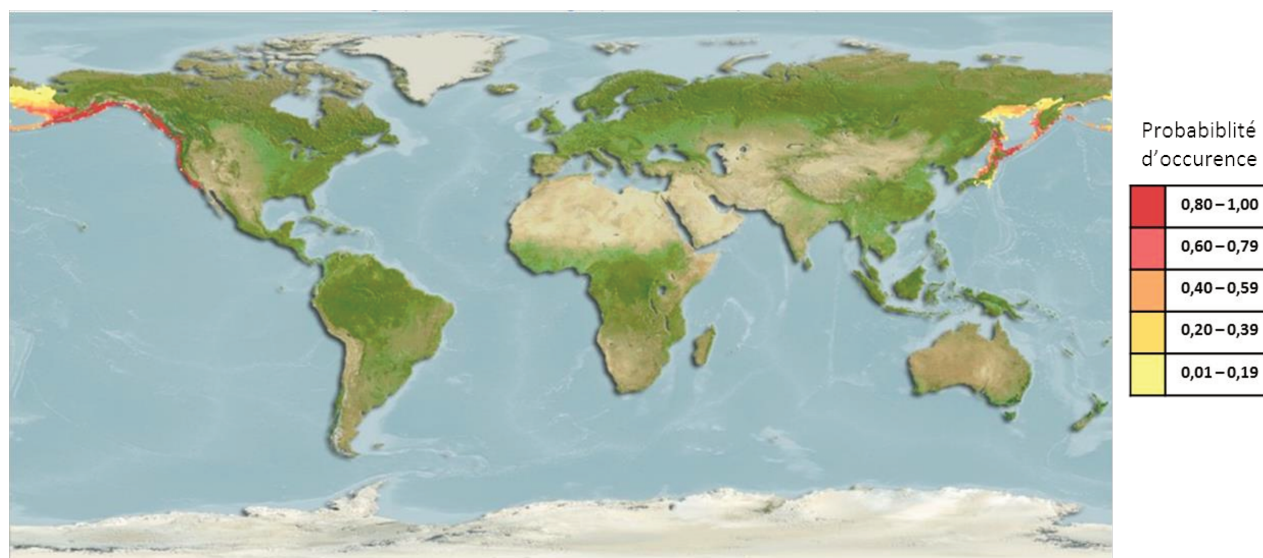


Figure 3. Aire probable de distribution naturelle de la truite arc-en-ciel

Issue de fishbase, <http://www.fishbase.org/summary/oncorhynchus-mykiss.html>, visité le 13/09/18

La TAC est une espèce principalement d'eau douce mais elle peut aussi migrer en mer. De ce fait, son aire de répartition naturelle est très dispersée et comporte deux zones distinctes (Figure 3). La première correspond aux rivières de la côte ouest de l'Amérique du Nord, depuis la rivière Kuskokwim en Alaska jusqu'à la rivière Acaponeto au Mexique (Guyomard et Vandeputte, 2010). La seconde zone est restreinte à la péninsule du Kamtchatka dans l'est du Pacifique. Cependant, des variétés migratrices de TAC ont pu être enregistrées de façon sporadique dans la mer d'Okhotsk et jusque l'embouchure du fleuve Amour (Chine) (FishBase). Dès la fin du XIXe siècle, des transferts de TAC hors de son aire naturelle de répartition ont été réalisés à partir du bassin de la rivière McCloud dans le nord de la Californie et l'on retrouve aujourd'hui la TAC sur presque tous les continents (excepté l'Antarctique). On suppose que c'est à partir de ce même bassin que les premières TAC ont été introduites en France en 1879. Cette introduction aurait été suivie de nombreuses autres d'origines légèrement différentes (Guyomard et Vandeputte, 2010).

1.1.2. Biologie, reproduction et fécondation artificielle de la truite arc-en-ciel

1.1.2.1. Caractéristiques, habitat et nutrition

La TAC tient son nom de la bande longitudinale colorée (rose à violet) qui s'étend sur son flanc, le long de la ligne latérale jusqu'à la queue, surtout en période de reproduction. Si on trouve principalement la TAC dans les eaux douces des lacs et des rivières, la variété anadrome, désignée sous le nom de steelhead en anglais, migre en mer. Cette migration est associée à des transformations physiologiques (smoltification) qui ont été beaucoup étudiées. Ces études concernent notamment le système sensoriel et visuel (Thorgaard et al., 2002), pour l'effet de l'élevage en eau salée sur la croissance (Johnston et Cheverie, 1985) ou encore le déterminisme génétique de l'osmorégulation (Le Bras et al., 2011). Le Bras et al. (2011) ont ainsi détecté certaines portions de génome (QTL pour *Quantitative Trait Loci*) associées à la capacité de TAC issues de populations non migratrices à s'adapter à un environnement marin, à condition d'être transférées après avoir atteint une certaine taille (150 g) et pourvu que le gradient de salinité et la température soit favorable (Labbé et Prunet, 2010). En tant que poisson sensible à la teneur en oxygène de son milieu, la TAC a été un bon modèle d'étude de l'hypoxie. Elle a notamment permis de mettre en lumière le rôle de certaines hormones permettant d'assurer l'apport d'oxygènes aux tissus (Perry et Tufts,

1998). De plus, chez les poissons, les globules rouges sont nucléés, ce qui permet de suivre l'effet d'un stress hypoxique sur l'expression et la régulation des gènes (Thorgaard et al., 2002).

Les TAC sont des poissons de haut niveau trophique. Dans leur milieu naturel, elles se nourrissent principalement de petit crustacés, insectes, mollusques, d'œufs de poissons ou encore d'autres poissons de petite taille. Après l'éclosion, au moment de la résorption de la vésicule vitelline, les branchies et la bouche se développent (Bobe et al., 2010). Les alevins commencent alors une période de nourriture mixte, endogène et exogène qui dure entre 42 et 63 degrés-jours chez la TAC (Escaffre et Bergot, 1984). Le tractus intestinal parfaitement développé pendant cette période de transition nutritionnelle, a grandement facilité les études sur la nutrition (Halver et Hardy, 2002), mais sur aussi le microbiote intestinal et son importance dans l'immunité (Waché et al., 2006 ; Vadstein et al., 2013).

1.1.2.2. Déterminisme du sexe et reproduction

Les salmonidés sont des poissons gonochoriques, soit mâles soit femelles et qui gardent le même sexe tout au long de leur vie. Chez la TAC, le déterminisme du sexe a été, dans un premier temps, démontré par des techniques d'inversion sexuelles à l'aide d'hormones (Jalabert et al., 1975) et d'autofécondation d'individu hermaphrodites permettant d'obtenir 76,6% de mâles (Chevassus et al., 1988) dont les descendants sont tous mâles. Ces premières expériences ont permis de mettre en évidence un déterminisme de type femelle homogamétique XX et mâle hétérogamétique XY. Dès 2002, grâce à l'observation d'individus mâles au sein d'une famille gynogénétique (normalement, tous femelles, voir § 1.1.2.3.2), Quillet et al. (2002) émettent l'hypothèse d'un gène majeur du déterminisme du sexe chez la TAC. Cette hypothèse a par la suite été confirmée avec la mise en évidence, en 2012, du gène *sdY* pour « *sexually dimorphic on the Y chromosome* » (Yano et al., 2012a). *sdY*, qui s'exprime principalement dans les testicules, est responsable de la différenciation masculine et est très conservé entre les principales espèces de salmonidés (Yano et al., 2012b). Il est cependant possible d'obtenir des mâles phénotypiques, appelés néo-mâles, avec des testicules fonctionnels à partir d'individus génétiquement femelles (XX) à l'aide d'un traitement hormonal masculinisant (méthyl-testostérone) appliqué dès le premier repas.

Dans leur milieu naturel, les truites femelles pondent une fois par an. La date de ponte ainsi que la durée du cycle de reproduction (1 an en moyenne en Europe) sont en partie contrôlés par un déterminisme génétique (Siitonen et Gall, 1989 ; Quinton et al., 2002 ; Leder et al., 2006), mais peuvent aussi être modulés par la photopériode avec un cycle qui peut être avancé de 2 mois, grâce à un éclairage continu

ou repoussé jusqu'à 5 mois avec un faible éclairage (Duston et Bromage, 1986). La température de l'eau a aussi un impact important, non seulement sur la date de ponte, mais aussi sur la fécondité ainsi que sur la qualité et la quantité d'œufs (Bobe et al., 2010 ; Davies et Bromage, 2002) avec une température optimale de l'eau entre 10 °C et 12°C et un maximum de 15°C pour la maturation des gamètes et l'incubation.

Dans des conditions similaires d'élevage, les femelles sont matures en moyenne entre deux et trois ans et les mâles en moyenne un an auparavant. Comme chez la plupart de poissons, la fécondation de la TAC est externe, une femelle peut pondre jusqu'à 2 000 œufs/kg de poids vif. Les œufs ont un diamètre important (3 - 7 mm) et l'alevin fera environ 15 mm à l'éclosion au terme d'un développement embryonnaire de 2 mois à 10°C (Bobe et al., 2010). La durée relativement longue de ce développement embryonnaire chez la TAC a grandement favorisé la description en détail, dès 1973, des 23 étapes qui le composent, depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion (Ballard, 1973).

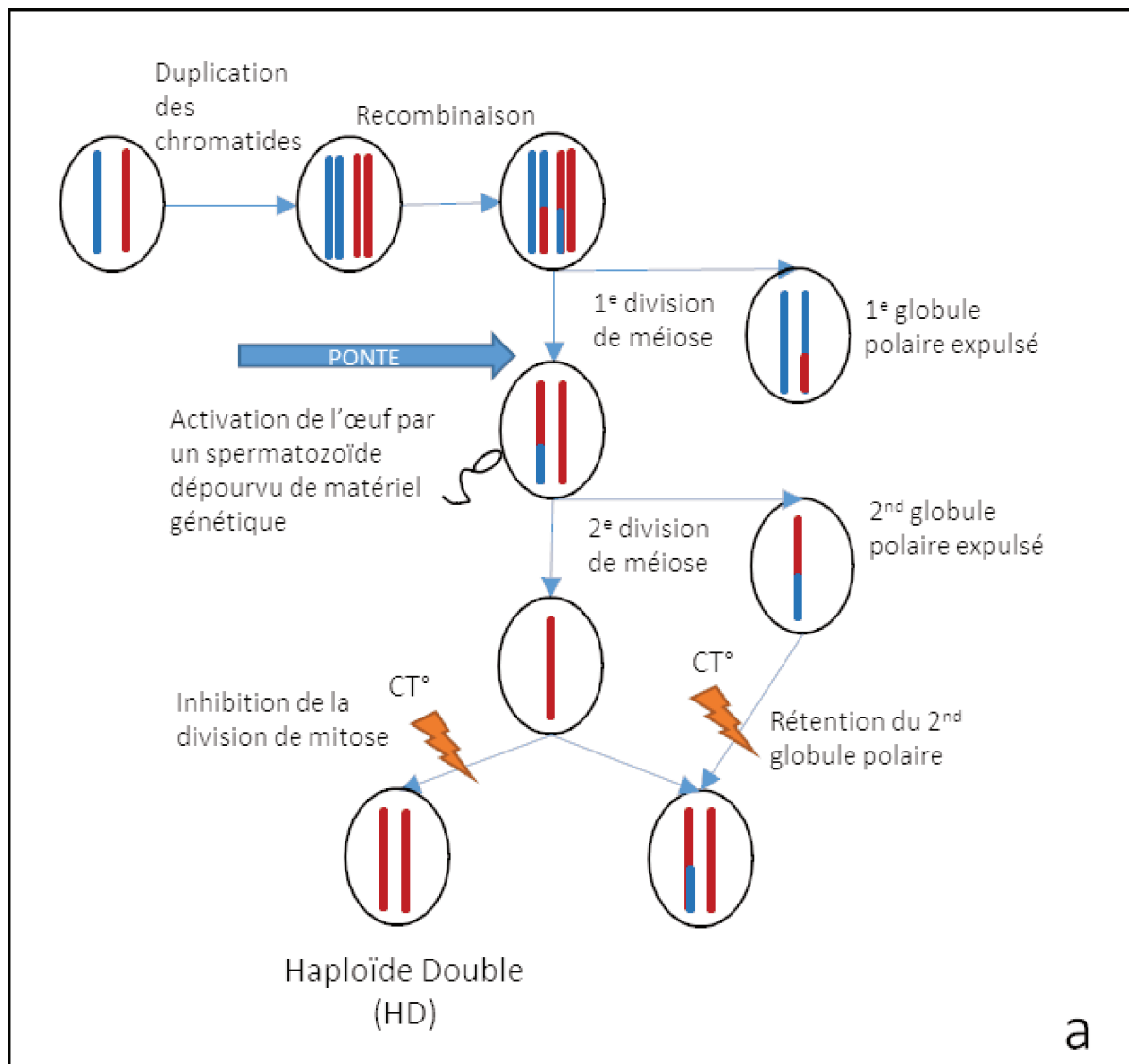
Chez les poissons téléostéens, l'organisation des organes reproducteurs mâles et femelles, logés dans la cavité abdominale, est bien conservée. Chez le mâle, les spermatozoïdes sont produits dans des testicules de forme allongée et excrétés dans les canaux déférents où ils subissent une maturation finale avant d'être libérés dans le milieu extérieur (Billard, 1983). Chez les salmonidés, les spermatozoïdes sont immobilisés par un liquide séminal très concentré en potassium et c'est la dilution de ce liquide avec de l'eau au moment de l'éjaculation qui déclenche leur motilité (Billard, 1975 ; Cosson, 2004). Chez la femelle, les ovaires sont deux organes allongés de part et d'autre de la vessie natatoire. Au moment de l'ovulation, l'ensemble des follicules matures (les ovules) sont expulsés dans la cavité ovarienne où ils peuvent séjourner pendant plusieurs jours sans altération (Bobe et al., 2008 ; Jalabert, 2005). Chez les poissons, comme chez de nombreux vertébrés, quand les ovules sont émis, ils sont bloqués en métaphase de 2e division, dans un état diploïde (2n). C'est la fécondation par un spermatozoïde haploïde (n) qui déclenche la reprise de la méiose et l'expulsion du second globule polaire contenant un des deux jeux de chromosomes. La fusion des deux noyaux haploïdes (caryogamie) permet la formation d'un œuf diploïde. Le comportement de fraie (expulsion des gamètes matures) naturel n'est pas observé en France. Il faut alors réaliser un massage abdominal (stripping) afin d'obtenir l'expulsion des ovules et des spermatozoïdes. Cette fécondation externe a grandement facilité la maîtrise de la fécondation artificielle, chez le saumon, dès 1763 par un cultivateur allemand, Etienne-Louis Jacobi (Vivier, 1956).

1.1.2.3. Principes des différentes techniques de manipulations chromosomiques chez les poissons et applications chez la truite arc-en-ciel

Chez les poissons, du fait de la reproduction externe artificielle et de l'état diploïde de l'ovule au moment de la fécondation on peut envisager plusieurs types d'interventions permettant de produire des individus totalement originaux : la suppression du matériel génétique d'une des deux gamètes avant la fécondation, l'inhibition de la méiose de l'ovule par la rétention du second globule polaire ou encore l'inhibition de la première division de mitose de l'embryon (Purdom, 1983). Ces manipulations, seules ou combinées, permettent d'obtenir des individus d'origine uni-parentale, c'est-à-dire ne possédant qu'un jeu de chromosomes d'origine maternelle (gynogénétique) ou paternelle (androgénétique), ou encore des animaux polyploïdes.

1.1.2.3.1. La polyplœidisation : l'obtention d'individus triploïdes et tétraploïdes

La polyplœidie, c'est-à-dire, le fait de posséder un caryotype avec plus de 2 jeux de chromosomes, est un phénomène naturel retrouvé chez des espèces végétales, les amphibiens ou encore les poissons dont la TAC (Swarup, 1956 ; Thorgaard et Gall, 1979). Chez les poissons, on peut obtenir relativement facilement des individus avec 3 ou 4 jeux de chromosomes appelés triploïdes ($3n$) et tétraploïdes ($4n$). Le principe de base de la production d'individus triploïdes est la fécondation d'un œuf diploïde par un spermatozoïde haploïde (Figure 4.b). Un choc de pression ou température est ensuite appliqué pour bloquer l'émission du second globule polaire (Figure 4). Les premières épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) triploïde sont été produites à l'aide de traitement de température (choc chaud ou froid) permettant la rétention du second globule polaire (Swarup, 1956, 1959). Ces techniques ont par la suite été modifiées au sein du laboratoire de physiologie des poissons (actuellement équipe GenAqua de l'UMR GABI) à l'INRA de Jouy-en-Josas au début des années 1980 pour être appliquées à la truite fario et la TAC avec des résultats permettant d'obtenir jusqu'à 100% d'individu triploïdes (Chourrout, 1980). Chez la TAC, la rétention du globule polaire peut être induite par un choc chaud de température (26-30°C pendant 10min) 25 min après la fertilisation (Chourrout, 1980 ; Chourrout et Quillet, 1982), ou encore par un choc de pression hyperbare de 4 min appliqué 40 min après la fertilisation (Chourrout, 1984).



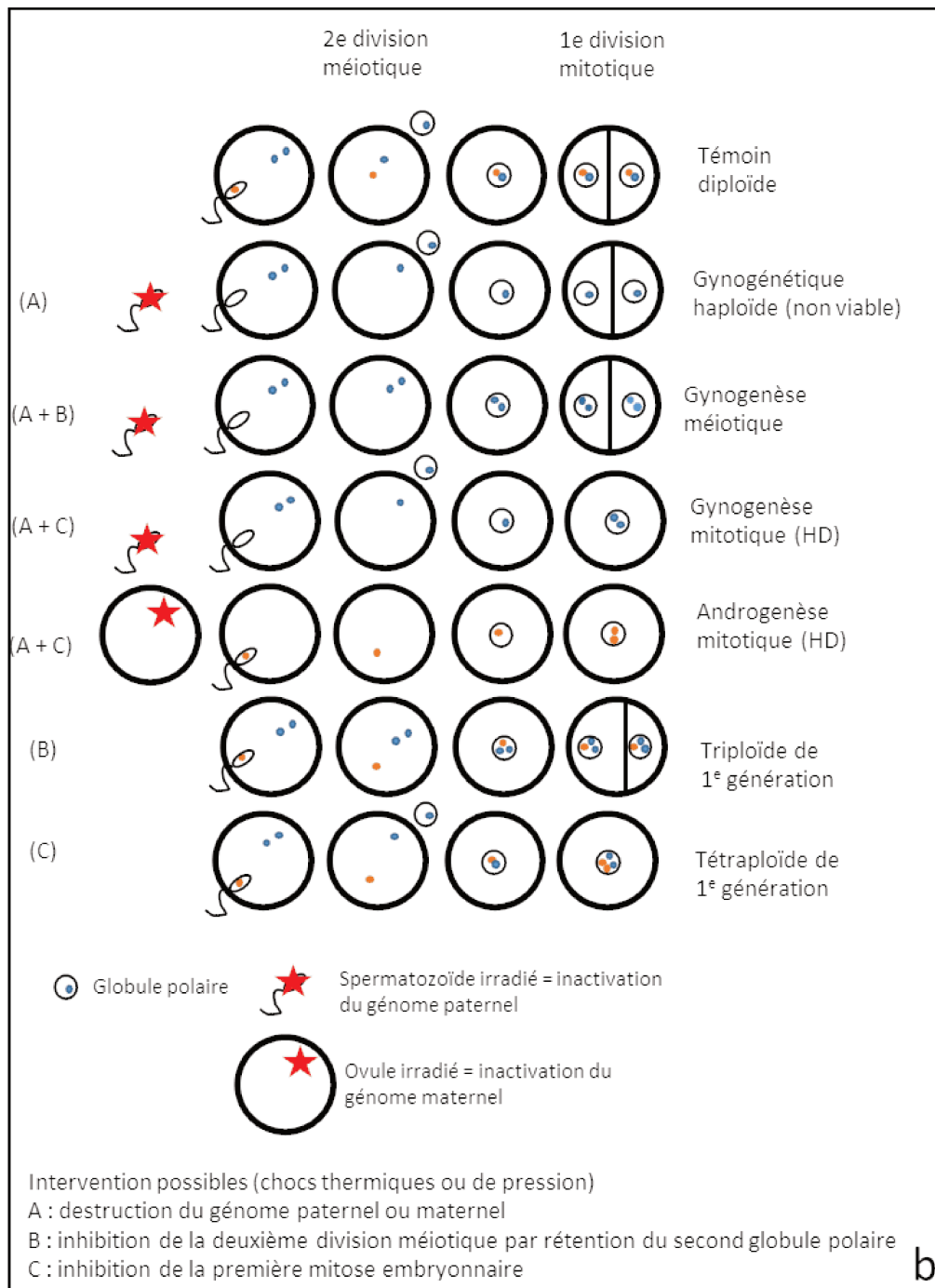


Figure 4. Principe de la polyplôidie, de la gynogénèse et de l'androgenèse

a. Le spermatozoïde irradié (UV) ne possède plus de matériel génétique mais reste fécondant. Lors de la **gynogénèse méiotique**, le 2nd globule polaire est retenu par un choc thermique (CT°) au moment de la 2^e division de méiose. On obtient un individu diploïde avec une hétérozygotie partielle due à la recombinaison pendant la 1^e division de méiose. Lors de la **gynogénèse mitotique** c'est la 1^e division de mitose qui est inhibée, le zygote obtenu est haploïde doublé (entièrement homozygote)

b. Différentes combinaisons d'interventions permettent d'obtenir des :

- Groupes uni-parentaux : **gynogénétiques** (A + B ou A + C) ou **androgénétiques** (A + C)
- Individus polyplôïdes : **triploïdes** (B) ou **tétraploïdes** (C)

Chez certaines espèces de poissons comme la loche (*Misgurnus anguillicaudatus*) il est possible de produire des individus possédant jusqu'à 6 jeux de chromosomes ($6n$, hexaploïdes) (Arai, 2001). Cependant, chez la TAC, les polyploïdes possédant plus de $4n$ ne sont pas viables et les individus tétraploïdes ne sont produits et utilisés que par et pour la recherche. Ils peuvent être obtenus par différentes techniques : un choc de pression hyperbare de 4min appliqué 5h50 après la fécondation (Chourrout, 1984) ou de température $27-33^{\circ}\text{C}$ pendant quelques minutes, entre 2h et 4h30 après fécondation (Diter et al., 1993 ; Thorgaard et al., 1981) ce qui permet de bloquer la première division de mitose de l'embryon (Figure 4.b). Enfin, des tétraploïdes de 2e génération peuvent être obtenus en assurant la rétention du second globule polaire après la fécondation d'une femelle diploïde avec un mâle tétraploïde (Chourrout et al., 1986). Un individu tétraploïde peut aussi être croisé avec un individu diploïde ce qui permet de produire des triploïdes sans utiliser de choc de pression ou de température, cependant le rendement est plus faible (maximum 95% de triploïdes) (Breton et al., 1996).

La survie dans les stades précoces des individus triploïdes est plus faible que celles des diploïdes (Chourrout et Quillet, 1982). De même, la croissance des triploïdes est plus faible que celle des diploïdes pendant les trois premiers mois (-10 à -20%). Par la suite, la survie et la croissance sont équivalentes et elles deviennent meilleures au moment de la maturation sexuelle (Quillet et al., 1988). Ces performances de croissance supérieure des triploïdes sur les diploïdes au moment de la maturation sexuelle s'expliquent par le fait que les individus triploïdes sont stériles (Thorgaard, 1986). Cette stérilité est complète et définitive chez les femelles tandis que les mâles présentent un développement testiculaire significatif (jusque 50% du développement normal, Quillet, 1986), mais le nombre de mâles spermiant est très faible et les spermatozoïdes, ont un très faible pouvoir fécondant ce qui ne permet pas le développement d'embryons normaux (Benfey et al., 1986). Pour les individus tétraploïdes, la croissance et la survie de TAC tétraploïdes de 1ère génération sont encore plus faibles que celles d'individus triploïdes (jusque -50% de croissance chez les $4n/2n$) cependant elles s'améliorent grandement pour les tétraploïdes de 2e génération (Chourrout et al., 1986). La stérilité des femelles est totale tandis que chez les mâles on observe une stérilité chez environ 50% des individus avec taux de fécondation plus faibles qu'avec du sperme diploïde pour les mâles matures (Chourrout et al., 1986).

Nous verrons dans la seconde partie de l'introduction (§ 1.2.) que la stérilité des triploïdes présente un grand intérêt en élevage, de ce fait les techniques de triploïdisation mises au points dans les laboratoires ont été rapidement et largement diffusées au sein des élevages (Breton et al., 1996 ; Haffray et al., 2004).

1.1.2.3.2. La gynogenèse et l'androgenèse : l'obtention d'individus originaux d'origine uni-parentale

Grâce aux techniques de rétention du globule polaire ou de blocage de la première division de mitose, il est possible de produire des individus diploïdes dont le matériel génétique provient uniquement de la mère (gynogenèse) ou du père (androgenèse). Ces deux modes de reproduction font intervenir une étape qui permet de supprimer le matériel génétique de l'ovule ou du spermatozoïde (Figure 4.a).

Les premiers travaux sur la gynogenèses ont eu lieu chez des amphibiens de la famille des Dicroglossidae (*Rana fusca*) dès 1911 avec l'irradiation des spermatozoïdes afin de détruire leur matériel génétique (Hertwig, 1911, cité dans Chourrout et al., 1980). Un spermatozoïde irradié conserve son pouvoir fécondant ce qui permet d'activer l'ovule, déclenchant la reprise de la deuxième division de méiose et l'expulsion du deuxième globule polaire. L'embryon haploïde obtenu n'est pas viable et avorte en général avant l'éclosion (Chourrout, 1980 ; Chourrout et Quillet, 1982). La destruction du matériel génétique paternel contenu dans le spermatozoïde est, le plus souvent, réalisé par rayonnement UV et on utilise du sperme issu de mâles dits « golden », homozygotes pour un allèle dominant codant pour une couleur particulière. L'absence de phénotype golden dans les descendants est un indicateur du bon fonctionnement de la destruction de matériel génétique paternel.

Il existe deux types de gynogenèse selon la méthode utilisée pour restaurer un état diploïde viable chez l'œuf. Une première méthode utilise les mêmes traitements que pour produire des individus triploïdes en bloquant l'émission du deuxième globule polaire en appliquant un choc de température ou de pression. Comme on inhibe la fin de la 2e division de méiose, on parle de **gynogenèse méiotique**, les embryons obtenus sont **diploïdes** et **tous femelles** (Chourrout et Quillet, 1982), ils contiennent uniquement le matériel génétique de la mère avec une **hétérozygotie partielle** suite aux recombinaisons chromosomiques survenues avant la première division de méiose (Figure 4).

La **gynogenèse mitotique** consiste à laisser l'ovule expulser le second globule polaire mais à inhiber la première division de mitose de l'embryon haploïde par un choc de pression (Chourrout, 1984) ou de température (Quillet et al., 1991 ; Diter et al., 1993), comme dans le cas de la production d'individus tétraploïdes. La cellule œuf diploïde ainsi obtenue sera **entièrement homozygote**, les deux stocks chromosomiques étant une réplique du stock haploïde original (Figure 4), on parle d'individus **haploïde doublés** (HD).

L'androgonèse mitotique permet l'obtention d'individus HD sans contribution génétique maternelle à partir de la fécondation par un spermatozoïde intact d'un ovule préalablement dépourvu de son noyau et l'inhibition de la première division de mitose (Thorgaard et al., 1990).

La survie à l'éclosion des individus gynogénétiques et androgénétiques mitotiques est plus faible que celle des gynogénétiques méiotiques. En effet, la survie à l'âge adulte (2 ans) des TAC obtenues par gynogenèse mitotique est de l'ordre de quelques pourcents (moins de 5%, Quillet, 1994). Leur croissance est aussi fortement réduite par rapport à des individus diploïdes contrôles avec une variabilité importante entre individus gynogénétiques mitotiques produits à partir d'une même femelle (Quillet, 1994). Ces faibles performances s'expliquent, en partie, par l'homozygotie des individus produits par gynogenèse mitotique (Chourrout, 1984 ; Thorgaard et al., 1990), en partie par les techniques utilisées qui réduisent les taux de fécondation, et en partie par l'origine génétique de la lignée fondatrice qui a fourni les œufs (Quillet, 1994). En plus de cet effet de l'homozygotie, Quillet et al. (1991) mettent en évidence un effet maternel sur la survie. En effet, ils observent une forte variabilité de la survie des individus obtenus par gynogenèse, en fonction des femelles ayant fourni les œufs, la survie variant de 17 à 72.5% pour les gynogénétiques méiotiques et de 0 à 53% pour les gynogénétiques mitotiques.

1.1.3. Les lignées isogéniques, un formidable outil pour les généticiens

1.1.3.1. Obtention

Chez les souris, les lignées consanguines sont obtenues après au moins 20 générations de croisements frères/sœurs. Avec un intervalle de génération de 3 ans en moyenne plusieurs décennies seraient nécessaires à l'établissement de telles lignées chez la truite comme chez la plupart des espèces animales d'intérêt économique.

La faisabilité de l'utilisation de la gynogenèse pour produire des lignées isogéniques en 2 générations chez les poissons a été démontrée dans les années 1980 chez le poisson zèbre (Streisinger et al., 1981), le médaka (Naruse et al., 1985) en réalisant dans un premier temps une gynogenèse mitotique pour produire des femelles homozygotes HD puis une gynogenèse méiotique à partir des œufs de ces femelles. L'ensemble des descendants issus d'une femelle unique partagent exactement le même patrimoine génétique, on parle d'individus isogéniques. Chez la TAC, les travaux ont commencé de façon

concomitante en France et aux Etats-Unis. En France, les lignées isogénique de TAC ont été produites à l'INRA par gynogenèse tandis que l'équipe américaine (USDA) a préféré utiliser l'androgonèse. Passée la phase d'optimisation des techniques d'induction, la production des lignées isogéniques de TAC, à l'INRA, pour une utilisation en analyse génétique des caractères, a démarré à partir de 1998.

La population fondatrice est la souche synthétique INRA (SY) créée par croisement panmictique de différentes souches domestiques de TAC et maintenue depuis les années 1980 sans sélection volontaire, garantissant ainsi un bon niveau de diversité génétique initiale. A cause du faible taux de survie des individus gynogénétiques mitotiques, sur une centaine de femelles SY reproduites, seule une vingtaine a atteint la maturité sexuelle et ont pu être reproduites par gynogenèse méiotique. Au final, 19 lignées isogéniques de TAC ont pu être établies à l'INRA. La conservation de ces lignées est depuis assurée par reproduction sexuée entre une femelle et un néo-mâle issue de la même lignée.

De nombreux laboratoires se sont essayés à la production de lignées isogéniques, le plus souvent par gynogenèse chez des poissons modèles ou des espèces d'intérêt économique. Néanmoins, comme ces lignées sont difficiles à produire et entretenir sur le long terme, seul un petit nombre de laboratoire ont voulu ou réussi à maintenir des lignées. La TAC reste l'espèce la mieux dotée en lignées isogéniques et la collection de l'INRA est la plus importante en nombre, suivie par les lignées américaines. On compte aussi quelques lignées isogéniques de TAC au Japon (Quillet, communication personnelle), et récemment une équipe polonaise a produit deux lignées gynogénétiques avec des HD (Jagiello et al., 2018).

1.1.3.2. Intérêt et utilisation d'individus haploïdes doublés et de lignées isogéniques en analyse génétique des caractères

Du fait de l'organisation simplifiée de leur génome (pas d'hétérozygotie), les individus HD sont de formidables outils génétiques.

Les HD de première génération

- L'absence d'hétérozygotie permet de mieux détecter les allèles récessifs rares et facilite la distinction entre variants alléliques d'un même locus et variants correspondant à des locus dupliqués (voir § 1.1.4), un avantage particulièrement utile dans le cas d'une espèce comme la TAC, dont le génome garde des traces importantes de la duplication ancestrale.

- Dans une population HD, la variabilité génétique additive est doublée (Falconer et Mackay, 1996), ce qui, en théorie au moins, permet d'utiliser des dispositifs avec moins de poissons pour estimer l'héritabilité de caractères (Bijma et al., 1997) ou encore détecter des QTL (Martinez et al., 2002). En pratique, cette option est peu ou pas utilisée, compte tenu de la réduction des performances des HD de première génération pour de nombreux caractères.
- Le fait d'avoir des individus identiques permet de travailler à différentes échelles du vivant (poisson entier, organe entier, cellules) et dans le temps sur un même fond génétique (Verrier et al., 2013), et de capitaliser les informations accumulées.

Les lignées isogéniques homozygotes

- Une même lignée isogénique peut être reproduite à l'identique par des croisements intra-lignée ce qui permet d'accumuler sur plusieurs années, et dans différentes conditions environnementales des mesures phénotypiques sur un même fond génétique² (Quillet et al., 2007c a; Sadoul et al., 2017).
- Du fait de leur isogénicité, les individus d'une même lignée sont histocompatibles (Quillet et al., 2007c a), ce qui représente un atout capital pour les études sur l'immunité (Castro et al., 2013 ; Yamaguchi et al., 2018).
- La performance moyenne d'une lignée isogénique représente celle du génotype de la lignée. Cette caractéristique peut être utilisée pour mesurer la valeur "individuelle" de caractères difficilement accessibles au niveau individuel (prise alimentaire, efficacité alimentaire d'animaux élevés en groupe) (Dupont-Nivet et al., 2009) ou pour réaliser des tests comportementaux multiples sur un même "individu" génétique en évitant les interférences dues à l'apprentissage (Milot et al., 2014).
- La variabilité génétique intra-lignée étant nulle³, la variabilité phénotypique intra-lignée permet d'estimer directement la variabilité d'origine environnementale (Dupont-Nivet et al., 2012). Cependant, la variance phénotypique résiduelle de certains caractères dans un environnement donné reste élevée et un effet lignée sur cette variabilité et son évolution en fonction de l'histoire de vie des individus a été démontré (Dupont-Nivet et al., 2012 ; Lallias et al., 2017). Les lignées sont un support de choix pour étudier l'origine de ces variations (interactions sociales, marques épigénétiques par exemple ...).
- Comme indiqué ci-dessus, la variabilité génétique additive entre lignées produites à partir d'une population standard est théoriquement le double de celle de la population de départ. Cependant, en pratique, un nombre réduit de lignées est disponible, ce qui réduit la gamme de variation accessible.

²A la mutation près, ponctuelle ou réarrangement chromosomique

Néanmoins, une variabilité importante a été observée entre les lignées isogéniques de la collection INRA pour la plupart des caractères analysés : résistance à des pathogènes (Quillet et al., 2007c a; Verrier et al., 2018), capacité à utiliser un aliment d'origine végétale (Dupont-Nivet et al., 2009 ; Geurden et al., 2013 ; Callet et al., 2018) ou encore à résister au stress de confinement (Sadoul et al., 2015).

Le croisement entre lignées isogéniques : les lignées isogéniques hétérozygotes

- Dans un contexte de détection de QTL, on tire pleinement profit de la variabilité interlignée en croisant deux lignées isogéniques aux performances contrastées (ex. sensible ou résistante à une maladie donnée), on obtient alors des individus F1 chez lesquels les allèles associés au caractère d'intérêt seront en ségrégation. A partir d'un de ces individus F1 on peut au choix réaliser un backcross, une génération F2 ou de nouveaux HD par gynogenèse mitotique. Ces différents croisements sont particulièrement intéressants pour les analyses génétiques (création de cartes génétiques, détection de QTL, ...). Ce croisement peut être obtenu directement à partir d'individus HD de première génération. Cependant, le fait de posséder des lignées isogéniques bien caractérisées pour le caractère d'intérêt permet de réaliser les croisements les plus adéquats entre les phénotypes/génotypes extrêmes.
- Dans certaines études, il peut être intéressant d'utiliser des « croisements hétérozygotes », issus du croisement entre des femelles issues d'une lignée unique avec des néo-mâles issus de plusieurs lignées HD différentes de celle des femelles. Ce dispositif réduit *de facto* la variabilité génétique entre les groupes expérimentaux, mais permet d'estimer les effets génétiques d'origine paternelle uniquement en s'affranchissant des sources de variation comme la date de ponte ou la taille des œufs. Pour certaines études sur la croissance ou l'efficacité alimentaire, il peut aussi être intéressant de travailler avec des individus hétérozygotes, plus proches des individus standard (Callet et al., 2018 ; Lallias et al., 2017).

Chez la TAC, la production d'individus HD et les lignées isogéniques a été un tournant majeur pour les travaux en génétique et génomique. Ainsi, les principales avancées en génomique structurale (organisation, polymorphisme et évolution des génomes) ont été obtenues à partir d'individus HD, et de nombreuses approches sur l'architecture génétique et fonctionnelle des caractères ont exploité ce matériel.

1.1.4. La génétique et la génomique de la truite arc-en-ciel

Au cours de l'évolution des vertébrés on retrouve les traces de deux duplications de génome entier survenues successivement il y a entre 500 et 800 millions d'années avant la divergence des Agnathes et avant la divergence des poissons cartilagineux (Figure 5). Il y a 450 millions d'années, les Actinoptérygiens se sont séparés des Sarcoptérygiens, avant un troisième épisode de duplication du génome (Ts3R) survenus chez les poissons Téléostéens après leur divergence d'avec les non Téléostéens (225 à 333 millions d'années). Un quatrième et dernier épisode de duplication du génome entier (Ss4R) est survenu il y a 80-100 millions d'années (Berthelot et al., 2014 ; Lien et al., 2016) chez un ancêtre commun des salmonidés (Figure 5). Le processus de rediploïdisation qui a suivi la tétraploïdisation ancestrale chez les salmonidés n'est que partiel (Guyomard et al., 2006 ; Berthelot et al., 2014) et leur confère une originalité d'organisation du génome avec une richesse importante en régions paralogues entre 25% et 50% du génome (Guyomard et al., 2012 ; Palti et al., 2014). En tant que salmonidé, la TAC est donc particulièrement intéressante pour l'étude des conséquences de la duplication des gènes (pseudogènes, ...) et les processus de rediploïdisation chez les vertébrés (Berthelot et al., 2014 ; Lien et al., 2016).

La taille du génome de la truite arc-en-ciel a été estimée entre 2,4 et 3,0 10^9 paires de bases (Gao, 2016), ce qui est dans la moyenne des taille des génomes des vertébrés (*Homo sapiens* : 3,0 10^9 pb, *Bos taurus* : 2,7 10^9 pb, *mus musculus* : 2,7 10^9 pb [NCBI, median total length]). Pour un poisson Téléostéen, c'est un génome de taille relativement importante (Figure 6). La TAC possède 104 bras chromosomiques soumis à un polymorphisme robertsonnien (fusion ou cassure de chromosomes au niveau du centromère). Ainsi, le nombre de paires de chromosomes varie entre 29 et 32 selon les populations et les individus (Phillips et al., 2006). Par exemple, le chromosome Omy_25 métacentrique dans certaines populations américaines est scindé en deux chromosomes acrocentriques (25a et 25b) dans les lignées françaises, qu'elles soient commerciales ou expérimentales (lignée SY et isogéniques de l'INRA) (D'Ambrosio et al., in prep).

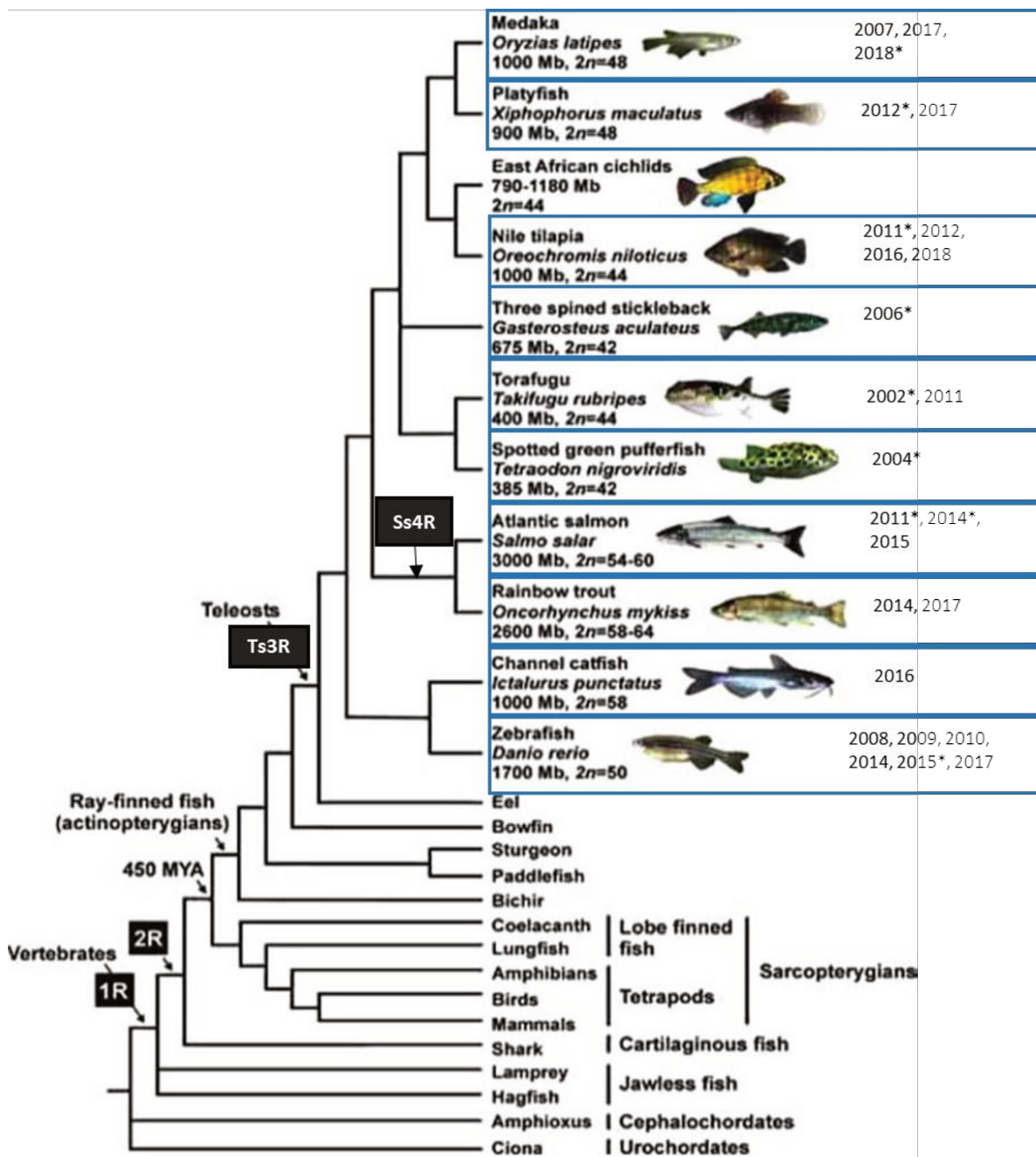


Figure 5. Arbre phylogénétique de la truite arc-en-ciel (Issue de Froschauer et al., 2006)

Le premier poisson dont le génome a été séquencé est *Takifugu rubripes*, en 2002.

La publication d'un génome de référence pour les espèces aquacoles est indiquée par un carré bleu avec les dates de publications successives des différentes versions. Les publications avec une * correspondent à des publications sous forme de contigs ou scaffolds et non pas de génome assemblé³.

Les différents épisodes de duplication du génome sont indiqués par des carrés noirs. Le dernier épisode (Ss4R) a eu lieu chez un ancêtre commun des salmonidés.

³NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/organism/32443/all/> visité le 03/09/2018

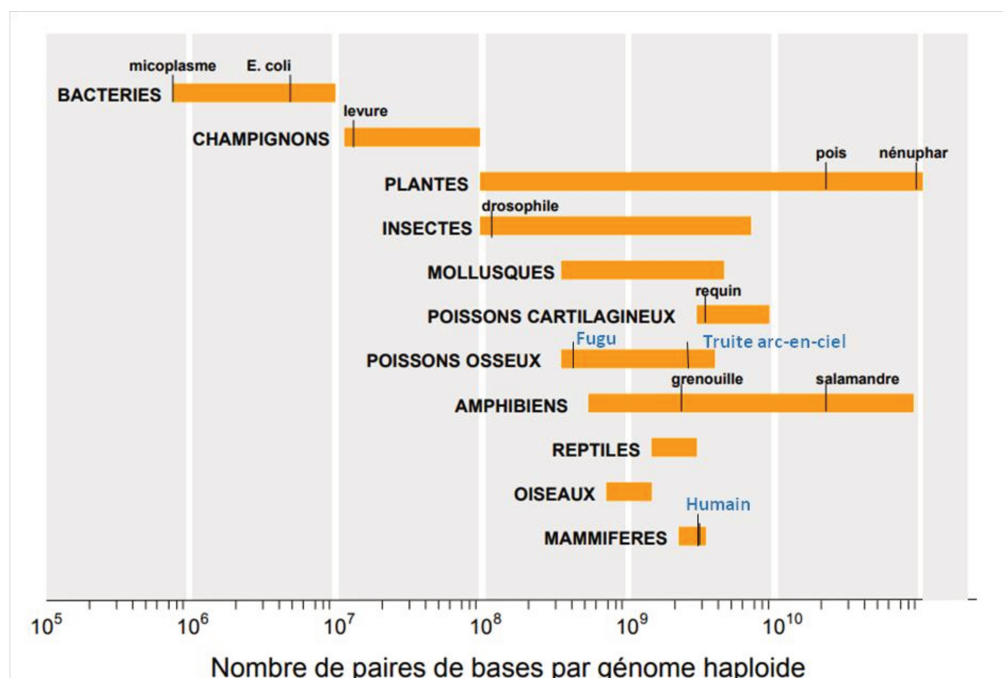


Figure 6. Taille des génomes de différents organismes

(adapté de Gautheret, V.2012.1 cours u-psud)

Taille du génome du fugu (*Takifugu rubripes*) 3.3×10^8 (PRJNA1434, 2002)

Taille du génome de la truite arc-en-ciel $2.4 \times 10^9 - 3.0 \times 10^9$ (Omyk_1.0, 2017)

Taille du génome humain (*Homo sapiens*) 3.1×10^9 (NCBI33, 2003)

Issus de NCBI Assembly browser, visité le 05/09/2018

1.1.4.1. Les ressources génétiques et génomiques disponibles

1.1.4.1.1. Ressources génétiques

La diversité génétique entre différentes populations de TAC dans le monde est théoriquement relativement importante, principalement du fait des environnements d'élevage différents. Cependant la TAC ayant été importée du Nord des États-Unis dans le reste du monde à partir de populations non caractérisées, la diversité génétique réelle des différentes populations n'est en réalité pas bien appréhendée. Plusieurs études réalisées sur des populations différentes en Amérique du Nord et au Chili mettent en avant une diversité modérée entre les populations sauvages et/ou les lignées commerciales et expérimentales (Carcamo et al., 2015 ; Heath et al., 2002 ; Rexroad et Vallejo, 2009). Au sein du laboratoire une étude a été réalisée (D'Ambrosio et al., in prep) sur la diversité génétique de 4 lignées commerciales françaises en sélection ainsi que de deux lignées expérimentales produites et conservées à l'INRA : la lignée

SY et une lignée sélectionnée pour sa capacité à grandir avec un aliment végétal (Callet et al., 2017). Cette étude a été menée à l'aide d'indicateurs moléculaires (l'index de fixation, le déséquilibre de liaison, la taille de population effective et le coefficient de consanguinité) et elle montre que la lignée SY présente la plus grande variabilité intra-population et qu'entre les différentes lignées, la diversité génétique est modérée avec des ordres de grandeur similaire à ceux estimés entre différentes races de vaches laitières. Cependant au sein des lignées commerciales, la diversité génétique est plutôt faible avec un coefficient de consanguinité plus élevé que ce que l'on peut observer pour les espèces terrestres (D'Ambrosio et al., in prep.).

1.1.4.1.2. Ressources génomiques

Bien que faisant partie des espèces de poissons les plus étudiées dans le monde, les ressources génomiques disponibles pour la TAC étaient, jusqu'à il a peu, limitées. Cependant le développement de nouvelles techniques de séquençage et génotypage, allant de pair avec une baisse importante du coût par échantillon, est à l'origine d'une accélération massive du développement et de l'accessibilité des ressources génomiques en aquaculture sur ces dix dernières années.

1.1.4.1.2.1. Les bases de données de marqueurs moléculaires

En génétique, un marqueur moléculaire est un fragment d'ADN correspondant à un ou plusieurs locus polymorphes. Il existe deux grands types de marqueurs moléculaires liés au type de polymorphisme : les motifs répétés, pour les marqueurs dont le polymorphisme repose sur une variation du nombre de répétition d'une même séquence courte de l'ADN, et les mutations ponctuelles. En fonction de l'évolution des technologies de séquençage, différents marqueurs moléculaires ont pu être obtenus grâce à diverses technologies dont une partie sera détaillée au paragraphe 1.1.5. De nombreuses bases de données de marqueurs moléculaires ont été construites chez la TAC ces 20 dernières années.

Les différents marqueurs moléculaires d'ADN

Le principe de détection de marqueurs moléculaires repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction (ER), capable de reconnaître un certain motif palindromique de l'ADN (le site de restriction) et d'y couper la molécule d'ADN en fragments. Il existe plusieurs ER qui reconnaissent des motifs différents, plus ou moins rares sur le génome. Elles permettent d'obtenir des fragments de tailles différentes.

Les premiers marqueurs moléculaires à avoir été utilisés sont fondés sur un **polymorphisme de longueur des fragments de restriction** : lorsque le site de restriction d'une ER est altéré par une mutation et qu'il

n'est plus reconnu, les fragments obtenus après digestion sont de tailles différentes entre les individus selon qu'ils présentent ou non la mutation. Le polymorphisme à ces marqueurs, appelés **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ou **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) lorsqu'on utilise une étape d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est biallélique (présence ou absence du site de restriction), ils ne permettent pas de facilement différencier les individus homozygotes des hétérozygotes. De plus, l'ADN doit être de très bonne qualité et les résultats ne sont pas très répétables, ils ont été remplacés par les **microsatellites**, un autre type de marqueurs moléculaires basés eux aussi sur le polymorphisme de longueur. Les microsatellites sont des motifs très courts (2 à 4 pb), hautement répétés et dont le nombre de répétition à un site donné varie d'un individu à l'autre (jusqu'à une dizaine de répétition chez les salmonidés, Morris et al., 1996). La variation du nombre de répétition est mise en évidence à l'aide d'amorces conçues pour s'hybrider de part et d'autre du microsatellite et qui permettent son amplification par PCR après digestion de l'ADN. Les microsatellites ont l'avantage d'être très polymorphes et bien répartis sur le génome. De plus, la méthode est facilement automatisable. Cependant, la fréquence de microsatellites est limitée, tous les 25 à 100 kb chez les mammifères, tous les 100 à 300 kb chez les oiseaux (Schibler et al., 2000) et tous les 20 à 80 kb chez les salmonidés (Estoup et al., 1993).

Ces types de marqueurs ont peu à peu laissé la place à des marqueurs basés sur le **polymorphisme d'une base unique**, les **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism). Les SNP sont très nombreux et bien répartis sur le génome. Chez la TAC, une étude récente fait état d'un SNP tous les 64 pb en moyenne (Gao et al., 2018), ce qui en fait le nouveau marqueur moléculaire de prédilection pour de nombreuses analyses. En revanche, chez les salmonidés, l'importance relative des séquences dupliquées dans le génome complique l'interprétation du polymorphisme. En effet, lorsqu'un SNP est détecté sur le génome, il peut s'agir d'un vrai variant informatif avec un polymorphisme sur une séquence unique ou bien d'un polymorphisme entre deux locus dupliqués sur deux portions homologues du génome appelé alors PSV pour *Paralogous Sequence Variant*. Comme environ 50% du génome de la truite est encore dupliqué, la moitié des SNP ne sont potentiellement pas informatifs. Les individus HD, par construction homozygotes en tout point de leur génome, sont un bon outil pour différencier un SNP d'un PSV (Palti et al., 2014).

Obtention des premières banques de marqueurs moléculaires

Les premières banques de **chromosomes artificiels de bactéries** (BAC) ont été développées chez la TAC au début des années 2000 (Genet et al., 2011; Katagiri et al., 2001; Palti et al., 2004, 2009). Ces grands fragments d'ADN génomique sont l'un des outils de base de la cartographie physique pour des génomes

complexes (Rogel-Gaillard, 2000). Ils constituent aussi un réservoir de marqueurs moléculaires (microsatellites et SNP). Le séquençage de BAC-end par Genet et al. (2011) a permis la construction de la première base de donnée d'éléments répétés sur le génome, la mise en évidence de l'importance des éléments dupliqués au sein du génome de la TAC ainsi que la mise en évidence d'un peu moins de 7 000 microsatellites utilisable pour de futures études et permettant d'augmenter la densité des marqueurs pour les cartes génétiques (voir chapitre 1.1.4.1.2.2).

La première base de données de SNP chez la TAC a été construite au début des années 2010 à partir de **EST** (*Expressed sequence tag*), une courte portion d'ADN complémentaire permettant d'identifier *in silico* de nouveaux SNP (Boussaha et al., 2012) et d'augmenter encore la densité des cartes génétiques. Le développement des nouvelles technologies de séquençage est à l'origine d'une nouvelle base de SNP chez la TAC, produite à partir d'individus HD (Palti et al., 2014). Ces deux bases de données contenaient un peu plus de 30 000 (Boussaha et al., 2012) et 70 000 SNP potentiels (Palti et al., 2014). La dernière base de SNP obtenue par des techniques de génotypage de génome entier (Gao et al., 2018) contient un peu plus de 30 000 000 SNP potentiels.

Aujourd'hui, les techniques de re-séquençage permettent aussi de détecter d'autres polymorphismes comme les insertions, délétions et CNV (*Copies Number Variations*), regroupés sous le nom de variants structuraux (VS). Ces VS affectent des longs fragments d'ADN (supérieurs à 50 nucléotides) et sont très mal documentés chez les poissons (Lallias et al., 2018). Un projet au sein du laboratoire est en cours avec pour objectif de re-séquencer plus profondément les lignées isogéniques (10 – 32 X de couverture). Cela permettra d'améliorer les connaissances structurelles et fonctionnelles sur le génome de la TAC, et de produire une nouvelle base de données de SNP et de VS (Lallias et al., 2018).

Le nombre de marqueurs moléculaires et la qualité des différentes cartes génétiques et physiques pour la TAC ont donc beaucoup évolué ces dernières années. Les différentes banques de marqueurs ont permis, dans un premier temps, de réaliser des cartes génétiques peu denses issues de RFLP et microsatellites, puis les SNP ont été utilisés pour densifier les cartes. Enfin, une puce à ADN (Axiom™ Trout Genotyping Array) a été développée avec la technologie Affymetrix (Palti et al., 2015a). Les banques de BAC et BAC-end ainsi que les techniques de génotypage de génome entier ont révolutionné les ressources génomiques chez la TAC avec la publication d'un premier génome entier dès 2012 (Berthelot et al., 2014) puis d'une nouvelle version, Omyk_1.0, plus complète en 2017 (Gao, 2016).

1.1.4.1.2.2. Des premières cartes génétiques et physiques ...

Le principe de construction des **cartes génétiques** réside sur l'ordonnement statistique des marqueurs selon les recombinaisons méiotiques. Deux marqueurs physiquement proches sur le génome ont une plus forte probabilité d'être transmis ensemble à la descendance (Loi de Mendel, Morgan, 1911), le taux de recombinaison r_{AB} entre deux marqueurs A et B correspond à la proportion d'événement de recombinaisons entre les deux marqueurs dans la descendance. Différentes fonctions permettent alors de calculer la distance génétique entre deux marqueurs (d_{AB}) à partir du taux de recombinaison (Haldane, 1919 ; Kosambi, 1943). Cette distance est exprimée en centiMorgan (cM), 1 cM correspondant à une recombinaison pour cent méioses. L'estimation du taux de recombinaison repose sur l'analyse de la co-ségrégation des allèles dans la descendance. Dans ce cas, on analyse la transmission allélique au sein de familles informatives (dont les parents sont hétérozygotes pour un grand nombre de marqueurs) contenant un très grand nombre de descendants pleins frères/sœurs. La connaissance du génotype des grands-parents permet de connaître de façon certaine la phase, c'est-à-dire, de connaître les associations haplotypiques de départ. Le taux de recombinaison est ensuite estimé à partir des génotypes des descendants aux marqueurs.

Chez la TAC, la première carte génétique a été construite en 1998 à partir d'individus HD androgénétiques (Young et al., 1998). Cette carte était composée de 476 marqueurs AFLP répartis sur 31 groupes de liaisons principaux. Avec le développement de nouvelles technologies le type de marqueurs moléculaires utilisés ainsi que leur nombre ont évolué. On a alors vu l'apparition de cartes construites à partir de plusieurs types de marqueurs comme celle de Sakamoto et al. (2000) qui comportait 191 microsatellites ainsi que d'autres types de marqueurs, puis les cartes se sont densifiées (Nichols et al., 2003 ; Rexroad et al., 2005). En 2006, la première carte française produite à partir d'individus HD et de plus de 900 marqueurs microsatellites isolés couvre l'ensemble des 31 chromosomes (Guyomard et al., 2006). Enfin, une carte **génétique** synthétique, regroupant les informations de trois cartes indépendantes et construite avec plus de 2 000 marqueurs microsatellites et 200 SNP est construite en 2012 (Guyomard et al., 2012). Cette carte couvre une distance totale de 3 600 cM sur 29 chromosomes et met bien en évidence les traces de la duplication du génome de la truite avec 7 zones homologues dupliquées sur des couples de chromosomes. Avec le développement des technologies permettant de détecter un grand nombre de SNP, les cartes génétiques tendent à se densifier, comportant jusque plusieurs dizaines de milliers de SNP (Gonzalez-Pena et al., 2016).

La cartographie physique a pour objectif de localiser des marqueurs sur le génome à l'aide de mesures physiques absolues exprimées en nombre de bases. L'obtention d'une **carte physique** se fait par

l'ordonnement de fragments d'ADN clonés (comme les BAC) chevauchants qui permettent de reconstituer l'ADN de départ. Chez la TAC, la première carte physique a été construite à partir de 192 096 BAC en 2009 (Palti et al., 2009). Cette carte, composée 4 173 contigs et 9 379 singletons, couvrait environ 2,0 Gb. Elle a permis la construction de la première carte **génétique et physique intégrée** chez la TAC en 2011 (Palti et al., 2011) à l'aide d'un peu plus de 200 nouveaux microsatellites qui couvrait alors jusqu'à 10% du génome.

1.1.4.1.3. ... à l'assemblage du génome

En 2014, un consortium français réalise le premier assemblage du génome de la truite arc-en-ciel (AUL_PRJEB4421_v1, Berthelot et al., 2014) à partir du séquençage de l'ADN génomique d'un individu mâle double haploïde (YY) de la lignée isogénique Swanson (Alaska) avec une approche *Whole-genome shotgun* et à l'aide des différentes bases de BAC et BAC-end déjà existantes. Pour les raisons évoquées plus haut, l'utilisation d'un individu HD a été décisive pour se lancer dans le séquençage puis l'assemblage d'un génome aussi complexe.

L'assemblage obtenu couvrait 1,9 Gb sur une longueur totale estimée entre 2,4 à 3 Gb par Young et al. (1998) avec moins de la moitié (48%) des paires de bases séquencées ancrées sur les chromosomes. En outre, sur chaque chromosome, seule une partie des contigs avait pu être précisément positionnée et orientée, soit au total 87 Mb réparties sur 28 paires de chromosome. Les auteurs identifient 38 paires de régions dupliquées réparties sur l'ensemble des chromosomes dont une partie suite à la dernière duplication du génome (Ss4R) et à des réarrangements inter-chromosomique liés à la rediploïdisation (Figure 7). Sur un total d'environ 46 500 gènes codant pour des protéines annotées, les auteurs estiment qu'environ 31 400 étaient présents dans le génome avant duplication et que seulement 48% de ces gènes sont sous forme de pseudo-gène (leur seconde copie est inactivée) dans le génome post duplication. Si ce premier assemblage a permis d'obtenir des informations intéressantes pour l'étude de l'évolution des gènes dupliqués et des phénomènes de rediploïdisation, il ne permet pas une cartographie fine des marqueurs ni des gènes du fait du nombre important de scaffolds et contigs non ancrés à des chromosomes et/ou non orientés.

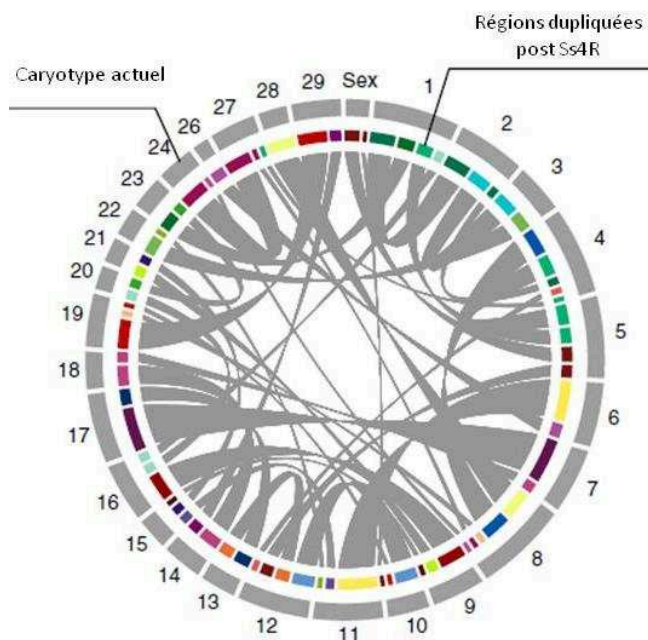


Figure 7. Organisation du génome de la truite arc-en-ciel

Organisation actuelle du caryotype de la truite arc-en-ciel après le 4^e épisode de duplication du génome entier (Ss4R). Issue de Berthelot et a., 2014.

Les régions dupliquées sur deux chromosomes différents sont indiquées par un trait gris.

Certains chromosomes sont entièrement dupliqués sur un bras de chromosome homologue, comme le 28 et le 8. D'autres chromosomes sont dupliqués sur plusieurs chromosomes différents. Ainsi, une portion importante du chromosome 17 est dupliquée sur le chromosome 7 et une plus petite portion est dupliquée sur le chromosome 13.

NB 1. L'ordre des portions de chromosomes dupliquées peut changer d'un individu à l'autre en fonction de réarrangements intra-chromosomiques.

NB 2. Il y a eu plusieurs changements de nomenclature au cours du temps. Aujourd'hui, le chromosome 29 correspond en réalité au chromosome 25 (25a et 25b chez les TAC françaises), le chromosome sexuel correspond au chromosome 29.

Cette première version de l'assemblage du génome de la truite a été fortement améliorée récemment suite au re-séquençage d'un même individu androgénétique (Swanson) réalisée avec la technologie du *Whole-genome paired-end sequencing* (Gao, 2016). Cette nouvelle version de l'assemblage du génome a été publiée en juin 2017 (Omyk_1.0, Gao, 2016). Elle contient un total de 2,2 Gb réparti sur 29 chromosomes (seule 229 Mb ne sont pas ancrées sur les chromosomes) et s'accompagne d'une annotation réalisée avec le NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline⁴ qui compare les gènes prédits avec des bases de données existantes pour de nombreuses autres espèces. Un total de 55 600 gènes ou pseudo-gènes, dont environ 42 800 gènes codant pour des protéines ont été prédits. Cette nouvelle version de l'assemblage du génome améliore grandement les connaissances sur l'ensemble du génome (gènes, miRNA, positions des marqueurs).

Ces 10 dernières années, nous avons assisté à une révolution technologique permettant de générer facilement et à moindre coût des centaines de milliers de SNP et de longues séquences d'ADN rendant accessible de nouvelles ressources génomiques.

⁴ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/process/

1.1.5. Les principales méthodes de génotypages utilisées en aquaculture

Le génotypage permet d'accéder à tout ou partie des variations génétiques d'un individu ou d'un groupe d'individus. Plusieurs techniques de génotypage permettent de détecter différents types de marqueurs moléculaires. Cette partie propose une présentation succincte des techniques de génotypage les plus communément utilisées en aquaculture. Elle n'a pas pour objectif d'être exhaustive sur les différentes techniques existantes.

1.1.5.1. Le génotypage par séquençage : la technologie RADseq

Les techniques du génotypage par séquençage (GBS pour *Genotyping By Sequencing*) ne nécessitant pas de connaissances *a priori* du génome ont été une révolution majeure pour les espèces aquacoles dont la TAC. Les techniques de GBS les plus utilisées chez les salmonidés sont les technologies RADseq pour *Restriction-Site Associated DNA sequencing* qui permettent de mettre en évidence plusieurs centaines de milliers de polymorphisme à un prix raisonnable (Andrews et al., 2016) à l'aide d'ER. Il existe plusieurs types de technologies RADseq en fonction des ERs utilisées. En aquaculture, le RADseq, le ddRADseq (double-digest RADseq) et le 2bRADseq sont les principales GBS utilisées (Robledo et al., 2017).

Principe du RAD sequencing.

Les différentes techniques de RADseq varient en fonction du choix des ERs (de leur site de restriction plus ou moins rare) et des étapes de tris sur la longueur, cependant les principales étapes (Figure 8) sont identiques (Andrews et al., 2016 ; Baird et al., 2008 ; Miller et al., 2007).

1. On utilise une ou plusieurs ER qui vont digérer l'ADN génomique d'un individu et le fragmenter en de très nombreux morceaux. Le choix de l'ER va permettre de moduler le nombre de séquences obtenues et donc le nombre de SNP potentiel (Andrews et al., 2016). Une ER reconnaissant un motif rare de l'ADN va produire moins de fragments qu'une ER reconnaissant un motif commun.

2. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés à un adaptateur P1 qui contient un code barre unique permettant l'identification des échantillons qui seront regroupés pour être séquencés ensemble (« multiplexées ») ainsi qu'une séquence permettant à une amorce d'amplification de se lier au fragment. Dans certains cas, un second adaptateur P2 est positionné à l'autre extrémité. Il permettra de réaliser un séquençage paired-end (les fragments sont séquencés dans le sens direct et dans le sens indirect). Les

étapes qui permettent de lier les deux adaptateurs peuvent être réalisées simultanément (Palaikostas et al., 2015) ou à des moments différents en fonction de la technique utilisée (Andrews et al., 2016).

3. Un premier tri sur la longueur des fragments a lieu (en général 300-600 pb) afin de conserver des fragments de taille optimale pour le séquençage. Puis on réalise plusieurs cycles de PCR (entre 12 et 15 en moyenne) pour multiplier les fragments.

4. Les fragments sont séquencés dans un séquenceur, soit uniquement à partir de l'adaptateur P1 (single end) soit à partir des deux extrémités (paired-end), sur un nombre de paires de bases donné (en moyenne 100 pb, de 50 à 300 pb) avant d'être réassignées à un individu unique à l'aide du code-barres (« démultiplexé »).

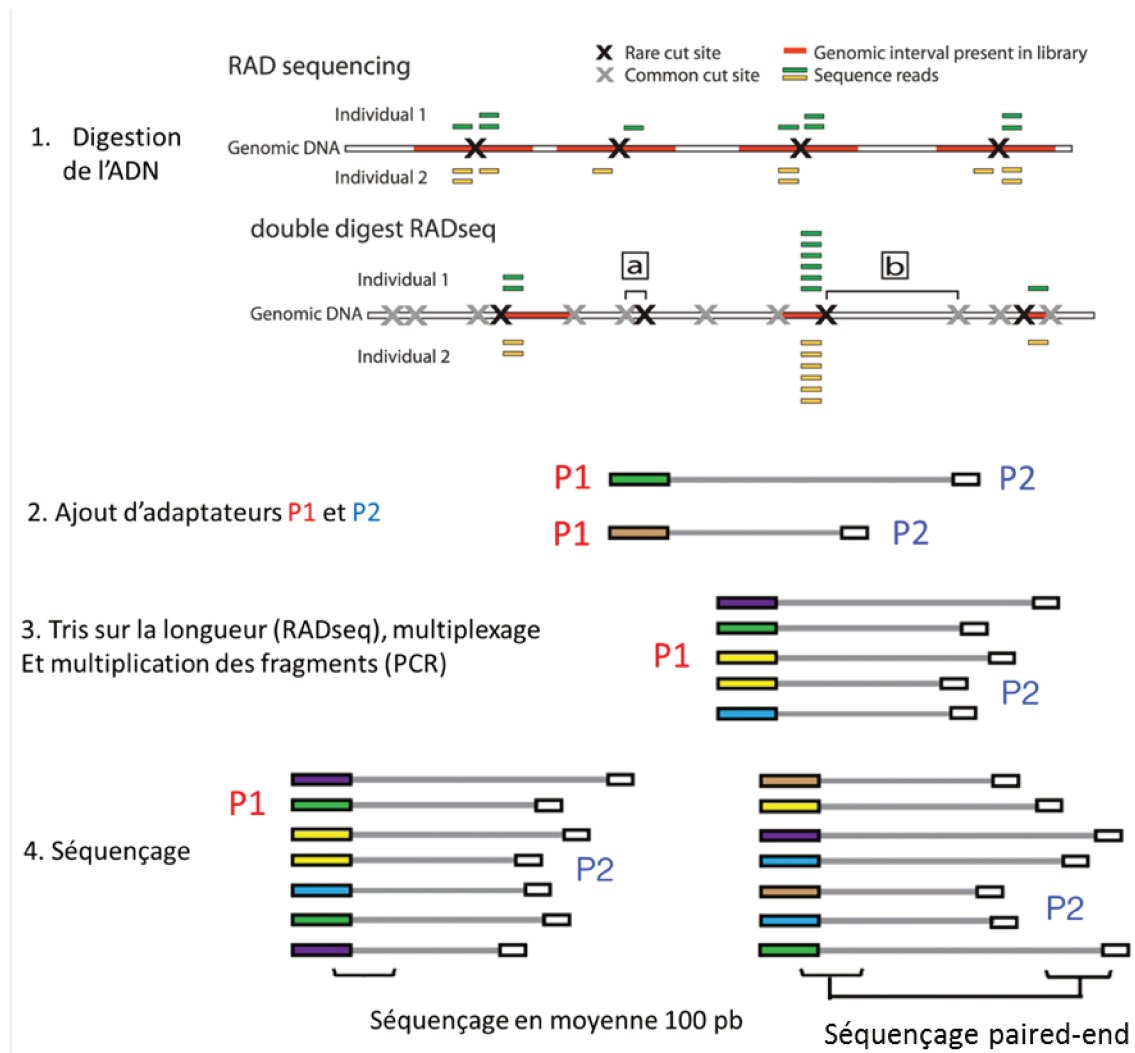


Figure 8. Principes des différentes technologies RADseq

Adapté de Baird et al. (2008), Peterson et al. (2012) et Andrews et al. (2016)

Avec le RADseq, les séquences obtenues ont une très bonne couverture (en moyenne 15 lectures par séquences) et sont bien réparties sur le génome. Le ddRADseq (Peterson et al., 2012) est une technique qui utilise deux ERs reconnaissant des motifs différents : un motif rare et un plus commun. Seuls les fragments encadrés par deux sites de restriction seront séquencés (Figure 8). Une étape précise de tri sur la taille des fragments est nécessaire pour exclure les fragments trop petits (a) et trop grands (b) (Figure 1.8). Le nombre total de séquence sera plus faible qu'en RADseq classique mais la couverture plus profonde (>20 lectures par séquences). La technique du 2bRADseq (S. Wang et al., 2012 a), utilise des ER de type IIB qui coupent l'ADN à distance fixe des deux côtés du site de restriction. Les fragments d'ADN ainsi produits sont petit et de taille unique (33-36 bp) et ne nécessitent pas de réaliser un tri sur la longueur avant séquençage (Andrews et al., 2016 ; Robledo et al., 2017).

Sources d'erreurs

Plusieurs étapes peuvent être sources d'erreurs. S'il y a une mutation dans le site de restriction qui ne permet pas à l'enzyme de le reconnaître, on parle d'*allele dropout*. Dans ce cas l'enzyme pourra produire un fragment trop long, qui ne sera pas séquencé, et dont l'information d'allèle sera perdue pour cet individu. Si on cherche à identifier le polymorphisme des individus, on peut passer à côté d'un SNP qui se trouverait sur ce fragment. Parfois, l'*allele dropout* peut générer des erreurs de génotypage dans le cas où un locus hétérozygote présentant une mutation sur un des brins sera génotypé comme locus homozygote (Andrews et al., 2016). La fréquence de ce premier type de biais est d'autant plus élevée que l'enzyme de restriction reconnaît un motif long (Andrews et al., 2016).

L'étape de PCR nécessaire à la multiplication des fragments peut être à l'origine d'erreurs de génotypage à cause des duplicats de PCR (fragments clonaux générés à partir de l'ADN génomique). Lors du processus, à un locus donné un des deux allèles peut être amplifié plus de fois que l'autre ce qui peut faire apparaître le locus comme homozygote alors qu'il est en réalité hétérozygote. Il a été mis en évidence que les duplicats de PCR peuvent se produire avec une fréquence très élevée (20 à 60% des séquences) (Andrews et al., 2016). En théorie la PCR ne devrait pas systématiquement favoriser la réplication d'un allèle plutôt qu'un autre à un locus donné et pour un grand nombre de loci le biais est négligeable. Les duplicats de PCR peuvent être identifiés et supprimés bio-informatiquement avant l'étape de génotypage, très facilement si on a utilisé le RADseq avec un séquençage paired-end ou avec des barre-codes dégénérés pour le ddRADseq (Andrews et al., 2016).

Enfin, pour différentes raisons, certains loci peuvent être préférentiellement séquencés. Dans ce cas, la différence de couverture entre les loci pourrait générer des erreurs de génotypage. Certains fragments sont amplifiés de façon préférentielle selon leur richesse en bases GC ou selon leur taille (fragments courts préférentiellement amplifiés). Le ddRADseq, qui ne séquence que les fragments flanqués des deux sites de restrictions, est particulièrement affecté par ces problèmes de couvertures différentes. En revanche, ni le 2bRADseq ni le RADseq standard ne seront impactés par l'amplification préférentielle des petits fragments puisque la première méthode produit des fragments de taille identique et la seconde plusieurs fragments de tailles différentes seront générés pour un locus donné (Andrews et al., 2016).

Le tableau 1 présente un récapitulatif des avantages et inconvénients des trois techniques de GBS utilisées en aquaculture, RADseq, ddRADseq et 2bRADseq.

Tableau 1. Tableau comparatif des différentes techniques de génotypage par séquençage (adapté de Andrews et al., 2016 ; Robledo et al., 2017)

	Avantages	Inconvénients
RADseq	• Possibilité de séquençage paired-end • Possibilité de supprimer les duplicats de PCR simplement avec du séquençage paired-end • Grand nombre de marqueurs (30 – 500 loci /1Mb)	• Préparation des librairies complexes avec plusieurs étapes de tris
ddRADseq	• Préparation des librairies simplifiées • Coûts réduits par la possibilité de regrouper un très grand nombre d'individus • Couverture des SNP plus importante	• La répétabilité dépend fortement de l'étape de sélection sur la taille • Peu de marqueurs (0.3 – 200 loci / 1Mb) • La détection de duplicats de PCR nécessite la préparation d'amorces contenant des codes-barres dégénérés
2bRADseq	• Pas d'étape de sélection sur la taille des fragments • Fortement reproductible • Préparation des librairies simplifiée • Très grand nombre de marqueurs (50 – 1 000 loci /1Mb)	• Des fragments de petite taille (33 – 36 pb) • Ne permet pas de bien appréhender les génomes complexes et dupliqués (du fait de la petite taille des fragments)

Les technologies RADseq ont permis de faire un bond en avant considérable vers la détection simplifiée d'un grand nombre de SNP à bas coût. Les variantes au RADseq original présentent chacune différents avantages et inconvénients et le choix de l'une ou l'autre des méthodes doit être réfléchi en fonction de la complexité du génome et du type d'analyses à réaliser. Pour la TAC du fait de la complexité du génome et du grand nombre de locus dupliqués, on évitera par exemple de réaliser du 2bRADseq et on lui préférera le RADseq original. Le génotypage nécessite un traitement bio-informatique des données obtenues par séquençage dont le principe sera présenté dans les parties 4.1.1.1 et 4.1.2.1 de ce manuscrit.

1.1.5.2. Les puces à ADN, le génotypage par fluorescence

La mise au point de technologies de génotypage permettant de constituer et tirer profit de panels de SNP stabilisés et caractérisés au sein d'une ou plusieurs populations a été une seconde révolution. Deux technologies de puces à ADN existent et tirent partis de l'association préférentielle entre les nucléotides (A-T, G-C) et d'amorces spécifiquement construites autour d'un SNP : la technologie Illumina et la technologie Affymetrix. La première puce à ADN a été développée par Affymetrix il y a 20 ans (HuSNP) et ne comportait que 1 494 SNP (LaFramboise, 2009; Wang et al., 1998), la dernière version contient près de 1 millions de SNP. En aquaculture, la technologie Illumina étant très faiblement représentée, ce chapitre se concentrera sur le principe de la technologie Affymetrix (Figure 9).

En aquaculture, la première puce de génotypage a été mise au point chez le saumon atlantique dès 2011 avec un petit panel de SNP, contenant seulement 6 000 SNP, puis une nouvelle puce plus dense (environ 130 000 SNP, Axiom™ Salmon Genotyping Array) a été produite et commercialisée en 2014 (Houston et al., 2014; Lien et al., 2011). Chez la TAC, la première puce commerciale a été produite en 2015 avec 57 000 marqueurs (Axiom™ Trout Genotyping Array, (Palti et al., 2015a a). Cette puce contient 115 002 amorces (30 pb) correspondant à 57 501 SNP.

Chaque amorce est construite de façon à s'hybrider préférentiellement avec un fragment d'ADN complémentaire peu importe l'allèle au SNP. La détection du polymorphisme se fait par fluorescence dont l'intensité et la couleur permettent de différencier un individu ayant l'allèle de référence au SNP (jaune) ou l'allèle alternatif (jaune plus clair), l'intensité permet aussi de détecter l'hétérozygotie ou l'homozygotie au locus (LaFramboise, 2009).

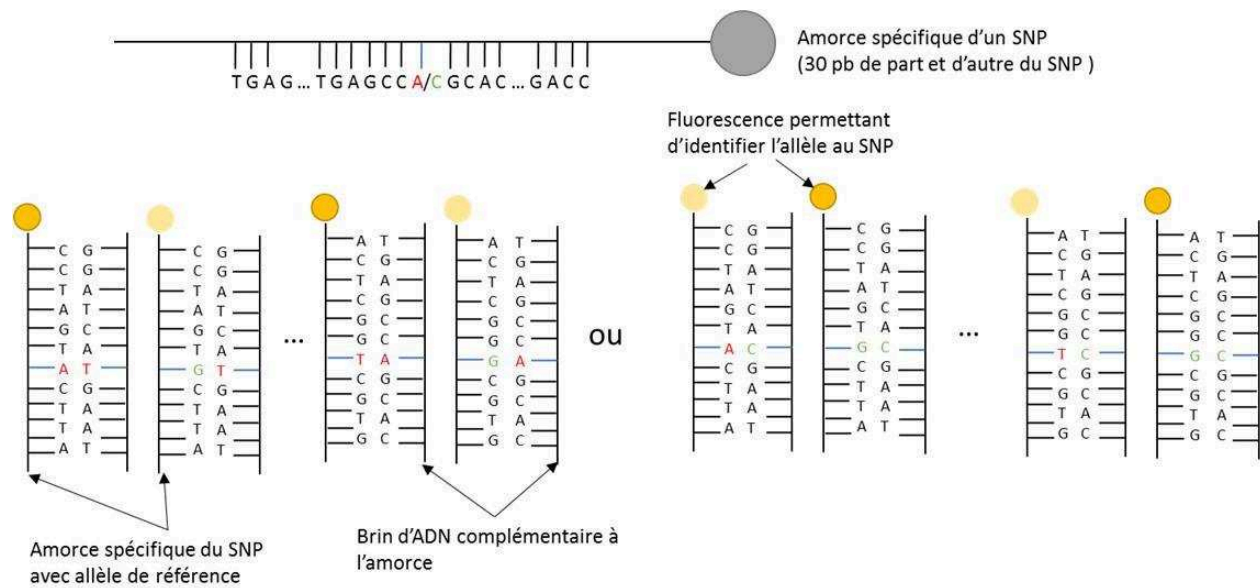


Figure 9. Principe du génotypage avec les puces à ADN issues de la technologie Affymetrix

Adapté de LaFramboise, (2009)

L'intérêt majeur de cet outil est la répétabilité puisque les panels de SNP disponibles pour chaque puce sont uniques. On a ainsi accès à une information facilement comparable d'une population à l'autre et le processus de génotypage est très rapide une fois la puce commercialisée. Cependant, du fait de panels uniques, l'utilisateur de la puce n'a pas de flexibilité sur le choix des marqueurs qui, d'une population à l'autre n'apportent pas les mêmes informations. De plus, la création de puce est un processus long qui nécessite plusieurs étapes de choix et de validations des marqueurs et donc d'avoir des connaissances *a priori* sur le génome.

Conclusion partie 1.1

Ce premier chapitre a eu pour objectif de présenter la truite arc-en-ciel sous l'angle du poisson modèle pour les généticiens, mais qui est aussi très utilisé en recherche dans un nombre varié de domaines. Les principaux avantages de la TAC comme poisson modèle sont la grande taille de ses œufs et de ses alevins, le développement précoce de son tractus intestinal, sa facilité d'élevage, sa fécondation externe et l'originalité d'organisation de son génome. D'un point de vue de la génétique, la TAC est un animal modèle particulièrement intéressant de par son génome dupliqué et la grande plasticité de sa fécondation qui permet de produire des animaux aux génomes particuliers : avec plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdes), un génome homozygote en tout point (haploïdes doublés). Les individus haploïdes doublés ont été utilisés afin de produire un assemblage de génome de qualité (Omyk_1.0) ainsi que plusieurs bases de données de SNP à l'aide des nouvelles technologies de séquençage. Récemment, la première puce à ADN pour la TAC a été commercialisée, ce qui permet d'envisager de nombreuses applications dans les élevages.

« TAKE HOME MESSAGE 1 »

- La truite arc-en-ciel est un poisson modèle utilisé dans un très grand nombre de publications scientifiques pour des domaines variés.
- La maîtrise précoce de la fécondation artificielle est à l'origine du développement et de la maîtrise de techniques de manipulation chromosomique qui présentent un intérêt majeur pour la recherche en génétique.
- Les individus haploïdes doublés de première génération ou conservé au sein de lignée isogénique offrent une multitude de possibilités pour l'étude des caractères complexes dans le temps.
- L'existence de lignées isogéniques de truites arc-en-ciel à l'INRA, très bien caractérisées pour différents phénotypes, constitue un matériel de choix pour la génétique quantitative.
- La taille importante du génome de la truite ainsi que l'événement de duplication du génome entier survenu récemment a compliqué fortement la détection de polymorphisme, la construction de cartes génétiques et physiques et l'assemblage du génome. Cependant, la truite arc-en-ciel a été l'un des premiers poissons d'intérêt aquacole majeur à bénéficier d'un assemblage de son génome, principalement grâce aux haploïdes doublés.
- Le développement récent de nombreuses techniques de séquençage et génotypage ont été à l'origine de plusieurs révolutions dans le monde de la recherche génétique en aquaculture, toutes espèces confondues.
- La création de nombreuses ressources génétiques telles que des bases de données de marqueurs, des cartes génétiques et physiques et deux versions de l'assemblage du génome de la truite et une annotation complète sont autant d'outils pour l'étude approfondie de l'architecture génétique des caractères d'intérêts.

1.2. La truite arc-en-ciel, une espèce d'élevage

Comparée à l'élevage d'animaux terrestres dont les premiers vestiges datent d'environ 8 500 ans avant JC au Proche-Orient⁵, l'aquaculture semble bien récente. Les premières traces de pisciculture de carpes datent de 2 000 ans avant JC en Chine (Rabanal, 1988) et le premier véritable traité sur la pisciculture est écrit en 473 ans avant JC par Fan Li qui y décrit la structure des étangs, la dissémination et la croissance des alevins de carpe commune. Au 1^{er} siècle de notre ère, Pline l'Ancien décrit les prémices de l'aquaculture en Europe avec les premiers parcs ostréicoles et viviers qui permettent de conserver vivants les poissons capturés dans le milieu naturel jusqu'à consommation. Ceux-ci se développent dans la Rome antique vers 500 avant JC (Plinius Secundus, 1469). En France, c'est la création des étangs de la Dombes qui marque les débuts de la pisciculture d'eau douce au Moyen-Age. Les premières « piscifactories marines » sont créées en 1878 aux États-Unis et en 1883 en Norvège⁶, et c'est au XX^e siècle que la pisciculture marine prendra véritablement son essor en France.

L'aquaculture est une production extrêmement variée, que ce soit en termes de nombre d'espèces élevées ou d'environnements d'élevage. En 2016, la FAO considère que 554 espèces aquatiques sont élevées, principalement des poissons et des mollusques. Parmi l'ensemble des espèces aquacoles en production, 17 sont considérées comme majeures ; à titre de comparaison, pour le bétail la FAO ne recense que 37 espèces d'élevage (Mair et al., 2018). Les salmonidés occupent la troisième marche du podium de la quantité de poissons produits dans le monde après les cyprinidés et les cichlides.

Ce chapitre s'attachera dans un premier temps à donner quelques éléments de contexte économique de la production piscicole dans le monde avec un focus sur les salmonidés et la truite arc-en-ciel en Europe et en France. Puis il décrira brièvement l'organisation de la filière truiticole française et les systèmes de production de la truite en s'attardant sur les particularités de son cycle de vie. Dans une seconde partie, les particularités de la sélection en aquaculture et en truiticulture seront abordées avec les descriptions des différentes méthodes de sélection utilisées en France, des différents objectifs de sélection définis des années 1990 à ce jour ainsi que les perspectives d'évolution avec l'arrivée de nouveaux outils de génotypage et phénotypage.

⁵<http://www.inra.fr/Grand-public/Genetique/Tous-les-dossiers/Selection-animale-Comment.-Pourquoi.-Par-qui/Histoire-de-l-elevage> le 31/07/2018

⁶<https://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-pisciculture/Introduction>, le 14/06/2018

1.2.1. Les chiffres clés de la production aquacole dans le monde, la place de la France et des salmonidés

Pour répondre à une demande croissante de poissons dans le monde, conséquence de l'augmentation de la population et de la consommation individuelle qui n'a cessé de croître depuis les années 1970 (FAO, 2016), la pêche et l'aquaculture se sont développées de façon importante ces dernières années. Les ressources naturelles disponibles pour la pêche étant limitées, les captures de pêches à destination de la consommation humaine se sont stabilisées dans les années 1990 (FAO, 2016). En parallèle, depuis les années 1970, la production aquacole se développe rapidement (Figure 10), grâce à l'amélioration des connaissances scientifiques en reproduction, nutrition et croissance accumulées sur des espèces modèle comme la truite (Thorgaard et al., 2002). La production annuelle de poissons issu de l'aquaculture a augmenté de 5,8% entre 2005 et 2014 jusqu'à dépasser le nombre de captures par pêche pour la consommation humaine (FAO, 2016). La consommation mondiale de poissons a elle aussi augmenté passant de 9,9kg / habitant et par an en 1960 à plus de 20 kg en moyenne en 2014 (FAO, 2016).

Source FAO 2018

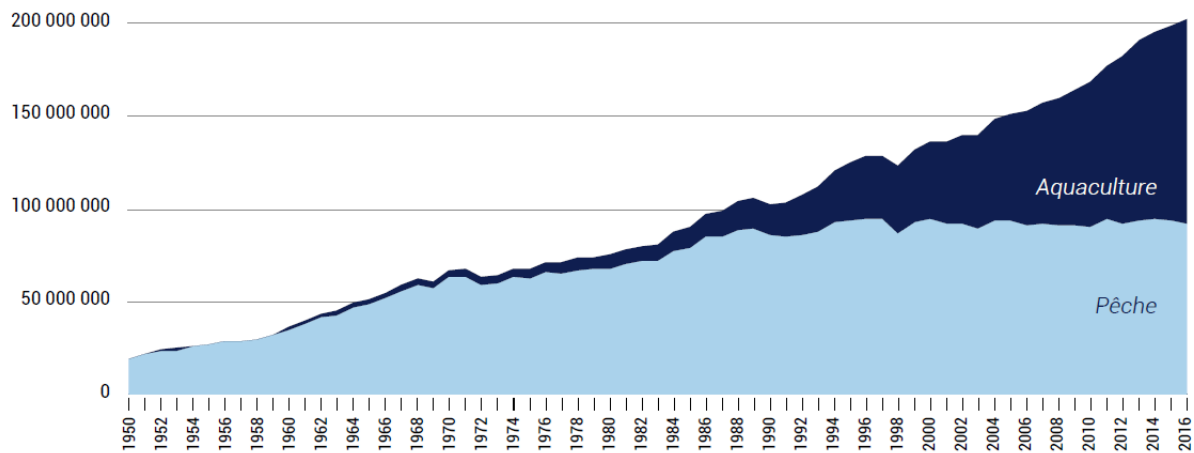


Figure 10. Evolution de la production mondiale de produits issus de la pêche et l'aquaculture (tonne)

Les poissons représentent 68% de la production aquatique animale destinée à la consommation dans le monde en 2014 (FAO, 2016) devant les mollusques (22%), les crustacés (9%) et les autres animaux (1%). L'aquaculture était dominée par 25 pays représentant 97,1% de la production mondiale, la France occupant la 25^e position avec 204,3 milliers de tonnes produites en 2014 (FAO, 2016).

Parmi les centaines d'espèces piscicoles produites dans le monde, les salmonidés se positionnent dans le haut du classement en termes de valeurs d'échanges et de productions. En Europe, le saumon atlantique et la truite arc-en-ciel représentent, en tonnage, 48,3% et 12,9% de la production, respectivement, suivis par les carpes (7,5%) puis le bar et la daurade (4,4% et 4,1%, respectivement) (FAO, 2015). La truite arc-en-ciel (TAC) est produite sur presque tous les continents et les cinq plus gros pays producteurs sont la République Islamique d'Iran (140 600 T), la Turquie (100 400 T), le Chili (94 500 T), la Norvège (72 900 T), et le Pérou (40 900 T). La France est le troisième producteur européen de TAC avec environ 23 400 T produites en 2015 (FishStatJ, FAO, 2015).

En 2015 les saumons et truites représentaient 70,2% des produits de la pisciculture française devant les carpes et autres poissons d'eau douce (16,6%), le bar, la daurade et autres poissons marins (11,2%) (FranceAgriMer, 2018). La TAC est la première espèce piscicole d'élevage en France, eau douce et environnement marin cumulés (FishStatJ) et la quatrième espèce la plus consommée après le saumon, le lieu noir et le cabillaud (FranceAgriMer, 2016). La TAC française fumée est de plus en plus plébiscitée par les consommateurs en remplacement du saumon fumé, pour des raisons économiques (la truite est moins chère) mais aussi car il s'agit d'un produit français : en effet, 85% des truites consommées en France en 2015 étaient françaises⁷.

Si la truite progresse face au saumon, c'est aussi parce que la filière française a su diversifier ses produits, à destination de la consommation, pour s'adapter.

⁷ <https://agriculture.gouv.fr/la-truite-francaise-un-produit-de-fetes-de-fin-dannee> visitée le 31/07/2018

1.2.2. La filière de production de truite arc-en-ciel en France

1.2.2.1. Organisation de la filière truite en France

En France, la salmoniculture (saumon et truites) est constituée de deux types d'entreprises : les écloseries qui maîtrisent la reproduction et la sélection, qui diffusent le progrès génétique aux entreprises de grossissement qui élèvent les poissons jusqu'à la taille commerciale. Cependant, la majorité des entreprises cumule l'écloserie et le grossissement dans 1 ou plusieurs sites (Figure 11). La filière salmonicole française regroupait, en 2007, environ 456 entreprises commerciales (produisant au moins 2T de salmonidés par an ou au moins 20 000 œufs embryonnés pour les écloseries (Agreste, 2007). Les activités de la filière sont variées, la grande majorité de la production salmonicole (72%) est destinée à la consommation humaine, le reste se partage entre la pêche récréative (11%), le repeuplement (6%) et les 11% restant sont des multiplicateurs (étape intermédiaire entre les écloseries et d'autres entreprises d'élevage) (Agreste, 2007).

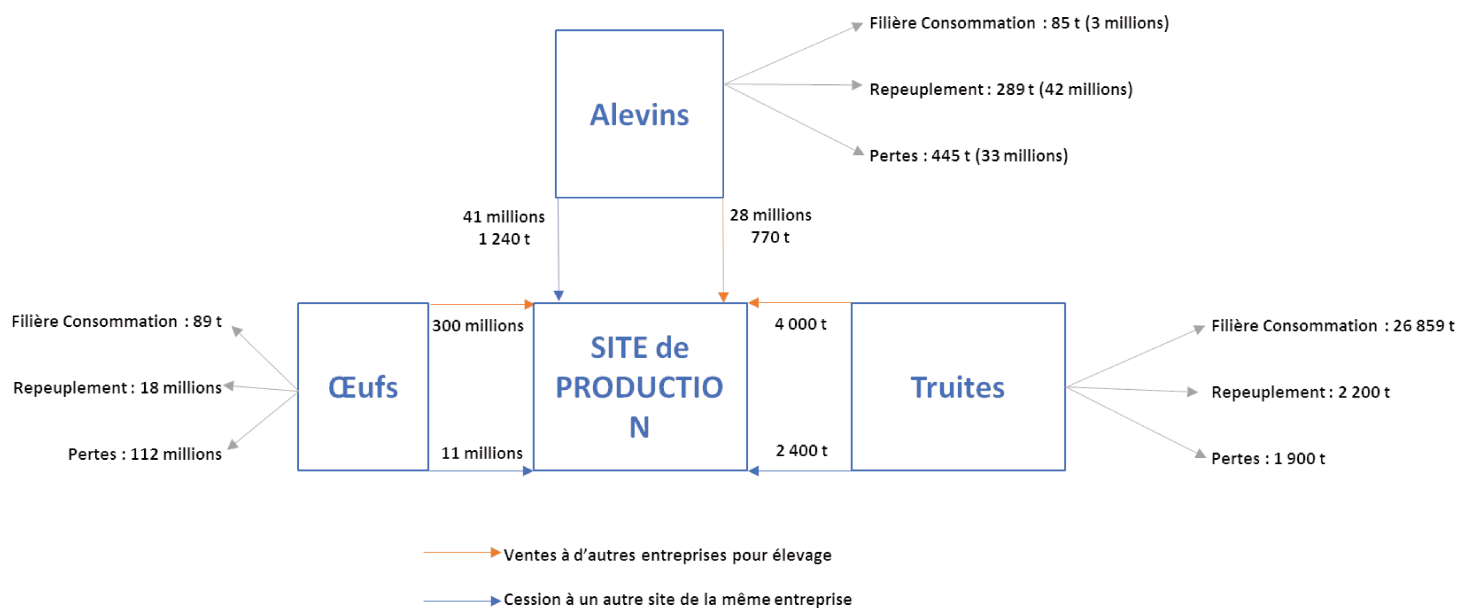


Figure 11. Organisation de la filière salmonicole en France

Adaptée (Agreste, 2007)

La production des œufs jusqu'à leur vente se fait dans les écloseries qui maîtrisent la fécondation artificielle, et les premiers aliments d'élevage. Puis les jeunes alevins sont transférés dans les piscicultures où ils seront élevés jusqu'à leur taille commerciale. Entre les écloseries et la pisciculture finale, il peut y avoir une étape intermédiaire avec les multiplicateurs. Les truites sont alors soit vendues directement (truite portion) soit transformées (découpe, salage, fumage) avant d'être vendues. Historiquement, la production salmonicole s'est développée dans les régions montagneuses grâce à la qualité de leurs eaux. Puis, la production augmentant, la filière a su tirer profit des ateliers de découpe et filetage existants dans les régions où la pêche était bien développée. L'Aquitaine et la Bretagne concentraient à elles deux 45% de la production de TAC en 2007 (Figure 12).

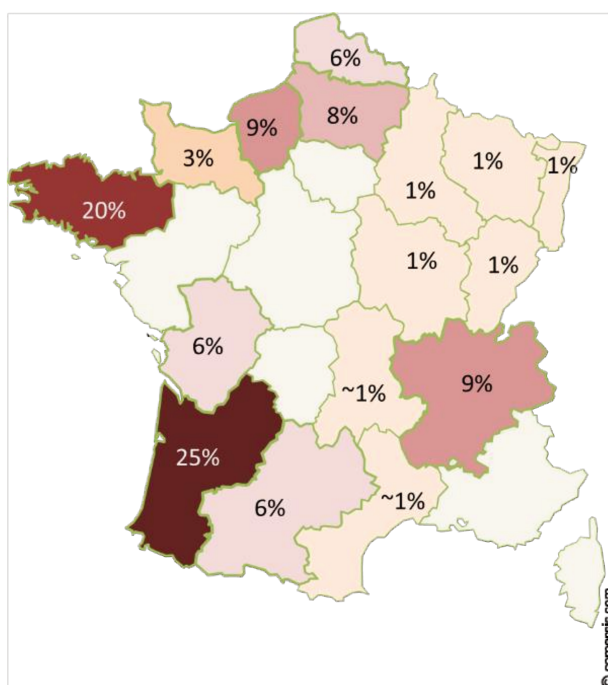


Figure 12. Répartition régionale de la production salmonicole en France

Données issues de (Agreste, 2007)

Le marché de la truite regroupe plusieurs produits correspondant à des tailles d'animaux différents, de la truite portion (250 g) à la grande truite (> 2 kg) pour le fumage (CIPA). Cette dernière s'est développée à partir des années 1980 dans l'objectif de concurrencer le saumon fumé importé. Son essor important est lié au développement de techniques d'élevages particulières telles que l'élevage en monosex femelle et la triploïdisation.

1.2.2.2. Particularité de la production de TAC : élevage en monosex femelles, triploïdes

Pour des raisons liées à la facilité de gestion des élevages et des reproductions ainsi qu'à la qualité du produit, 90% de la production de truites arc-en-ciel en France est en monosex femelle (SYSAF, communication personnelle). La différence d'âge à la maturité entre les deux sexes (avec les femelles devenant mûre en moyenne un an après les mâles) a poussé les éleveurs à se tourner vers une production monosex pour faciliter les pratiques d'élevage et obtenir des produits de meilleure qualité (fermeté et couleur de la chair). Bien que les jeunes TAC mâles aient une meilleure croissance que les TAC femelles (Crandell et Gall, 1993), la maturation sexuelle plus tardive des femelles est à l'origine de l'organisation en monosex femelle. En effet, au moment de la maturation sexuelle, les réserves énergétiques des truites sont réorientées vers la production de gamètes (gonades et spermatozoïdes) ainsi que vers la peau pour augmenter la pigmentation chez les mâles. La croissance s'arrête donc et la chair perd alors de sa qualité organoleptique, elle devient plus molle et moins colorée (Rasmussen, 2008).

Pour les productions de grandes truites destinées au fumage, la maturation sexuelle restait un problème dont les producteurs se sont affranchis avec le développement des méthodes de triploïdisation par traitement hyperbare (Haffray et al., 2004) et de contrôle de la triploïdie par cytométrie de flux (Lecommandeur et al., 1994), les femelles triploïdes étant stériles. Cependant cette manipulation chromosomique nécessite une plus grande technicité dans les pratiques d'élevage, en effet dans les phases précoces du développement des truites, les triploïdes sont plus fragiles que les truites diploïdes, leur mortalité est plus importante et leur croissance plus lente (Happe et al., 1988), les truites triploïdes grossissent en moyenne 10% moins vite que les truites femelles diploïdes et 20% moins vite que les truites mâles diploïdes (Haffray et al., 2004). En 2009, les TAC triploïdes femelles représentaient environ 20% des truites commercialisées (Vandeputte et al., 2009a a).

1.2.2.3. La reproduction dans les élevages

La longueur d'un cycle de production dépend du produit final commercialisé. Une truite portion atteint sa taille commerciale (environ 250 – 300 g) au bout de 8 à 14 mois, tandis que pour obtenir une grande truite (de 2 à 4 kg) il faut 20 à 36 mois.

Au sein des élevages, la reproduction se fait exclusivement par fécondation artificielle. Afin de synchroniser les pontes des femelles d'une même cohorte, on peut avoir recours à une induction

hormonale de la ponte (Bobe et al., 2010). Les femelles prêtes à pondre et les mâles matures sont anesthésiés et manipulés hors de l'eau, une légère pression sur l'abdomen du poisson (stripping) permet de récolter les ovocytes des femelles ainsi que la laitance des mâles. Les truites femelles matures peuvent pondre jusqu'à 2 000 œufs/kg de poids vif soit autour de 10 000 œufs/truite. En pratique dans le cas de reproductions permettant de produire les animaux à destination du grossissement, la laitance de plusieurs mâles est mélangée avec les ovocytes de plusieurs femelles, l'ajout d'eau entraîne l'activation du sperme, le grossissement des ovocytes et la fécondation.

La reproduction est gérée différemment par les pisciculteurs qui sont aussi sélectionneurs. En entretien de souche, les futurs géniteurs sont conservés jusqu'à leur maturité sexuelle et reproduits par couple. Dans ce cas, les œufs issus de la ponte d'une seule femelle sont séparés en autant de lots que le nombre de mâles utilisés. Afin de s'affranchir de « l'effet loterie » dans le succès de la reproduction, chaque lot d'œuf sera fécondé par la laitance d'un seul mâle. Plusieurs études réalisées chez différentes espèces de poissons mettent en évidence une compétition du sperme qui, si la laitance de divers reproducteurs mâles est mélangée, aura tendance à favoriser un mâle (Kaspar et al., 2008; Parker, 1998). Après fécondation, les œufs de plusieurs femelles sont alors triés et regroupés selon leur taille puis mélangés avant d'être incubés dans des incubateurs séparés.

Le très grand nombre d'œufs par femelle ainsi que la fécondation artificielle permettent de reproduire les individus selon différents plans de croisements, en fonction du nombre d'individus, de l'hérabilité du caractère et de la pression de sélection. En l'absence de généalogie connue, ces plans de croisement sont un bon moyen pour minimiser l'appareillage dans les accouplements et donc maximiser la diversité au sein de la population (Dupont-Nivet et al., 2006). En France, on utilise en pratique des plans de croisement en factoriels incomplets (Annexe 1) qui permettent de produire beaucoup de familles et de séparer les effets additifs, maternels, d'environnement commun ou de dominance (Becker, 1967). Ces croisements raisonnés permettent l'amélioration génétique des cheptels de TAC.

1.2.3. L'amélioration génétique de la truite arc-en-ciel en France

L'amélioration génétique consiste à sélectionner les individus qui ont le meilleur potentiel génétique en fonction des objectifs de sélection. Pour pouvoir améliorer un caractère au travers de la sélection, il est nécessaire d'avoir un caractère non seulement héréditaire (génétiquement déterminé) mais aussi héritable, autrement dit, que la variance phénotypique observée dans la population en sélection soit en partie expliquée par une proportion non nulle de variance génétique additive (Falconer et Mackay, 1996). Si on réalise correctement la sélection sur un caractère héritable, on observera en moyenne chez les descendants de meilleures performances que dans la génération de leurs parents. L'amélioration du niveau génétique de la population nécessite de choisir les caractères d'intérêts à améliorer, de pouvoir mesurer individuellement ces caractères et de classer les candidats à la sélection selon leur valeur afin de ne retenir que les meilleurs pour la reproduction. Dans cette partie, on s'attachera à décrire les différentes méthodes de sélection propres à l'aquaculture, en prenant la sélection française de TAC comme référence.

En aquaculture, la sélection a vu le jour dans les années 1920 - 1930 chez la carpe (De Brouin De Bouville, 1930) et le saumon de fontaine (Embry et Hayford, 1925). Les premiers travaux sur l'évaluation des bases génétiques de la croissance (1er caractère d'intérêt) ont été développés dans les années 1970, simultanément sur la truite fario et le saumon atlantique en Europe et aux USA (Gjedrem, 1975 ; Chevassus et al., 1976 ; Kincaid et al., 1977). On estime que seule 10% de la production aquacole mondiale repose sur l'amélioration génétique des populations (Gjedrem et al., 2012). Cette faible utilisation de la sélection s'explique par certaines spécificités de la production. D'une part, le milieu aquatique est contraignant pour les manipulations car les animaux doivent être anesthésiés à chaque sortie de l'eau. D'autre part, la très petite taille des animaux à l'éclosion (2-3 mm pour le turbot à 15 mm pour la truite) rend le marquage avec un transpondeur magnétique passif (PIT-tag) impossible avant un certain poids (500 mg au plus tôt, habituellement 10 - 20 g) (Acolas et al., 2007 ; Ferrari et al., 2014). Le pedigree est donc difficile à obtenir, ce qui se répercute sur la mise en œuvre de la sélection et sur la conservation de la variabilité génétique au sein d'une population en sélection.

En France, différentes méthodes de sélection définies par les instituts de recherche (INRA et Ifremer) et mises en œuvre par le SYSAAF (Encart 2.1) ont permis à l'aquaculture française de se développer rapidement et de rester compétitive. L'amélioration génétique des TAC a évolué avec le développement de différents plans de croisement (Annexe 1), de nouvelles techniques de prise en compte de la généalogie des individus ainsi qu'avec les nouvelles technologies de phénotypage et génotypage.

Encart 2.1 le rôle du syndicat des sélectionneurs avicole et aquacole français (SYSAAF) dans le développement et l'organisation de la filière truite en France

Le SYSAAF est un syndicat professionnel qui regroupe des entreprises de sélection développant des programmes de gestion et/ou d'amélioration génétique des espèces avicoles et aquacoles. La section aquacole du SYSAAF a été créée en 1991 à la demande de la profession, de l'INRA et des pouvoirs publics dans l'objectif de mettre en place l'amélioration génétique des salmonidés. En 1993, puis en 2001, le SYSAAF a diversifié son expertise en s'ouvrant à la pisciculture marine et à l'ostréiculture en collaboration étroite avec Ifremer. Aujourd'hui, le SYSAAF regroupe 12 adhérents piscicoles dont 5 en salmoniculture (TAC presque exclusivement), 4 conchylicoles et 2 crevetticoles.

En tant qu'intermédiaire entre l'INRA et les sélectionneurs, le SYSAAF a participé à la mise au point des programmes de sélection, notamment chez la truite dès les années 1990. Cette étroite collaboration entre les instituts de recherche (INRA et Ifremer), le SYSAAF, l'ITAVI et les sélectionneurs aquacoles a permis à l'aquaculture française de rester à la pointe des technologies.

Aujourd'hui, la section aquacole du SYSAAF propose différents services à ses adhérents. La moitié de leur activité est dédiée à l'amélioration des procédures de sélection et le SYSAAF accompagne les sélectionneurs dans le choix de leurs plans de croisements en proposant des accouplements optimisés. Le SYSAAF a aussi un savoir-faire unique de gestion et conservation des gamètes et propose un contrôle de la ploïdie par cytofluorométrie.

Le SYSAAF est très impliqué dans un grand nombre de projets de recherche français et européens dont Re-sist (FUI), Fishboost (Union Européenne) et 57K-Truite (FranceAgriMer) lesquels ont contribué à produire les données analysées pendant cette thèse.

1.2.3.1. Les différentes méthodes de sélection chez la TAC

Les programmes d'amélioration génétique, dont l'objectif principal est l'augmentation de la productivité et des profits des élevages, utilisent la sélection artificielle pour améliorer leurs cheptels. Les premières approches de sélection ont été réalisées en utilisant l'information phénotypique du candidat lui-même et/ou de ses collatéraux (germains ou demi-germains) si la généalogie est connue. Plus récemment en pisciculture, on a commencé à implémenter les techniques de sélection génomique, développées dans les années 2000 et largement utilisées chez les espèces d'élevage terrestres (bovin, ovin, porc, volailles...) depuis quelques années.

1.2.3.1.1. La sélection sur le phénotype

1.2.3.1.1.1. La sélection individuelle : de la sélection massale à la méthode PROSPER

La **sélection massale individuelle** est la plus simple à mettre en œuvre : on ne conserve que les individus ayant la meilleure performance qui seront les géniteurs de la génération suivante, sans tenir compte de leur pedigree. Cette méthode est d'autant plus efficace que l'héritabilité du caractère d'intérêt est élevée (Vandeputte, 2010). Elle permet de sélectionner les candidats sur plusieurs caractères par des tris successifs (un caractère à la fois). Mais la généalogie des individus n'étant pas connue, la consanguinité, impossible à contrôler, risque de causer une perte de diversité génétique au sein de la population et donc de réduire fortement le gain génétique possible (Hulata et al., 1986). Chez la truite, le premier caractère à avoir été sélectionné est la croissance, facilement mesurable, et principal caractère d'intérêt pour l'éleveur qui cherche à obtenir un meilleur rendement. Cependant la sélection massale individuelle ne permet pas de séparer les différents effets influençant la croissance, comme la taille des œufs (effet maternel, Chevassus et al., 1976 ; Vandeputte et al., 2002) ou encore les interactions sociales complexes (Ruzzante, 1994) qui pourraient avoir conduit à sélectionner non pas les animaux avec une meilleure valeur génétique pour la croissance mais plutôt des animaux agressifs ou dominants ayant un accès plus facile à la nourriture.

Afin d'essayer de s'affranchir des limites de la sélection individuelle, la **méthode Procédure Optimisée de Sélection par Epreuves Répétées (PROSPER)** a été mise au point à l'INRA en 1980 sur la truite fario (Chevassus et al., 2004) et a depuis été largement utilisée dans les élevages par l'intermédiaire du SYSAAF (Haffray et al., 2004). Le principe de base de cette méthode réside sur le maintien de la variabilité génétique à chaque génération ainsi que sur la diminution de l'effet maternel par la mise en place de plans de croisement en factoriels incomplets (Annexe 1). Pour limiter la consanguinité, le nombre N de reproducteurs utilisés à chaque nouvelle reproduction doit être suffisamment élevé ($N > 100$). Pour diminuer l'effet maternel de la taille des œufs, on regroupe des femelles ayant une taille d'œufs similaires

que l'on va croiser avec un certain nombre de mâles. Les individus issus de chacun des "groupes" sont élevés ensemble afin de limiter les effets de l'environnement et des étapes successives de tris sont alors réalisées sur des animaux de même poids. Les meilleurs individus de chaque groupe sont conservés pour former de nouveaux groupes, et finalement seuls les meilleurs poissons seront reproduits pour obtenir la génération suivante. Le nombre de poissons conservés à chaque épreuve dépend des critères d'intensité de sélection de chaque sélectionneur. L'application de cette méthode avec une intensité de sélection de 5% a permis de doubler le poids à l'âge adulte après 4 générations de sélection chez la truite fario (Chevassus et al., 2004). Cette méthode de sélection a été appliquée à la TAC pour la première fois en 1993 chez cinq producteurs français avec l'aide du SYSAAF.

Si ces méthodes de sélection sont efficaces pour obtenir un gain génétique sur les caractères mesurés directement sur les candidats, elles présentent des limites pour l'étude de la variabilité génétique, l'estimation précise de l'héritabilité des caractères (Vandeputte et Haffray, 2014) et ne sont pas applicables pour les caractères létaux dont les mesures invasives ne sont pas réalisables directement sur le candidat (rendement de découpe, résistance aux maladies, qualité de la chair ...).

1.2.3.1.1.2. La sélection généalogique

La connaissance de la généalogie des individus permet de gérer au mieux les accouplements pour limiter l'augmentation de la consanguinité. Elle apporte aussi de nouvelles informations sur la diversité génétique de la population (parenté, consanguinité) et permet de sélectionner sur des caractères létaux en prenant en compte les phénotypes des collatéraux. Cependant, l'enregistrement des généalogies chez les poissons est rendu compliqué par la petite taille des larves qui ne permettent pas un marquage à l'éclosion (Acolas et al., 2007 ; Ferrari et al., 2014).

L'une des premières solutions trouvées pour permettre le suivi de la généalogie en pisciculture est l'élevage en familles séparées (une famille par bassin) jusqu'à ce que les animaux atteignent un poids suffisant pour être marqués et regroupés. Cette méthode, efficace pour l'enregistrement des généalogies, a été mise en place dès les années 1970 en Norvège pour le saumon (Gjedrem, 2010) ainsi que pour de nombreuses autres espèces depuis (Gjedrem et al., 2012 ; Krishna et al., 2011 ; Zak et al., 2014). Elle présente néanmoins quelques inconvénients (Vandeputte et Haffray, 2014) : le nombre de familles produites à un instant donné est limité par les infrastructures et le nombre de bassins disponibles, de ce fait un élevage en familles séparées nécessite un investissement important pour maximiser le nombre de bassins et donc de familles. Enfin les individus étant élevés dans des bassins séparés jusqu'au marquage, l'effet d'environnement de chacune des familles peut représenter un biais important dans les estimations de variabilité génétique et d'héritabilité (jusque 10% de la variance totale pour la croissance selon Refstie et Steine, 1978).

Le développement des marqueurs moléculaires est à l'origine d'une première révolution dans les élevages avec l'apparition de l'assignation de parenté. Mise en place pour le bétail dès le milieu des années 1960 (Jamieson, 1965), les premiers essais en pisciculture ont eu lieu chez la carpe dans les années 1970 en Israël mais le nombre de familles potentiellement identifiables était faible (Brody et al., 1981). Les vrais débuts de l'assignation de parenté chez les poissons ont eu lieu 20 ans plus tard, grâce à la disponibilité de marqueurs microsatellites (Vandeputte et Haffray, 2014). Les poissons peuvent être élevés dans des bassins communs dès l'éclosion et un simple prélèvement de tissu permettra de reconstruire les pedigrees *a posteriori* (Vandeputte et al., 2004). L'un des intérêts majeurs de l'assignation de parenté est l'augmentation de la pression de sélection (<3%) qui permet de maximiser le progrès génétique tout en minimisant la consanguinité par des plans de croisements adaptés (Vandeputte et Haffray, 2014).

Chez la truite, les méthodes de sélection utilisant l'information du pedigree ont été introduites à partir de 1997 grâce à l'assignation de parenté par microsatellites. Dans un premier temps l'information généalogique a été intégrée aux procédures de sélection massale et PROSPER uniquement pour reconstituer les pedigrees et proposer des croisements permettant de limiter la consanguinité. Puis elle a permis de mettre en place plusieurs nouvelles techniques de sélection dites généalogiques.

En **sélection familiale** on sélectionne des familles et non des individus. Cette méthode est adaptée pour la sélection de caractères létaux, qui sont mesurés sur les apparentés des candidats à la sélection. Tous les candidats d'une même famille, qu'ils aient été mesurés pour un caractère ou non, partagent la même valeur génétique (encart 2.2), ce qui ne permet pas de sélectionner les meilleurs individus au sein de la famille. Dans le cas de la **sélection intra-familiale**, on sélectionne uniquement les meilleurs individus de chaque famille sans comparer les familles entre elles. Cette sélection n'est possible que pour des caractères mesurables directement sur les candidats. Enfin, pour utiliser et valoriser l'ensemble des informations disponibles (individuelle et familiale), on peut utiliser la **sélection combinée**, qui permet d'estimer la valeur génétique d'un candidat en prenant en compte sa performance propre ainsi que celle de ses apparentés. La méthode de calcul statistique la plus utilisée pour estimer les valeurs génétiques des individus est la méthode **BLUP** (*Best Linear Unbiased Prediction* : meilleur prédicteur linéaire non biaisé) (Henderson, 1963, 1973) qui se base sur le modèle génétique décrit dans l'encart 2.2. Cependant pour les caractères létaux mesurés sur les collatéraux des candidats, la valeur génétique sera identique au sein d'une même famille, le BLUP ne permet donc pas de sélection intra-famille pour les caractères létaux dont la variabilité ne peut être mesurée qu'entre les familles. La sélection combinée à l'aide du BLUP a été introduite à partir de 2004, et aujourd'hui la majorité des élevages de truite en France utilisent une combinaison entre la méthode PROSPER en sélection massale et la sélection sur indexation généalogique (BLUP) pour déterminer les meilleurs croisements à réaliser (SYSAF, communication personnelle).

Encart 2.2. Principes de base de la génétique quantitative, le modèle génétique

La valeur phénotypique (P) d'un caractère quantitatif d'un individu est sous le contrôle de son environnement d'élevage (E), de sa valeur génétique (G) ainsi que d'une composante d'interaction entre l'environnement et la génétique (GxE), avec μ la moyenne selon l'équation suivante : $P = \mu + G + E + G \times E$

La valeur génétique peut se décomposer en une composante additive (A), qui est la somme des effets moyens des allèles maternels et paternels transmis à l'individu, une composante de dominance (D) qui prend en compte l'effet d'interaction entre deux allèles à un locus donné et une composante d'épistasie (I) entre loci. On a donc : $G = A + D + I$

Pour un individu, A vaut en espérance la moyenne des valeurs A de ses parents. En pratique, on néglige souvent l'interaction génotype-environnement pour l'amélioration génétique des animaux, ainsi qu'on néglige D (qui n'est pas transmissible à la descendance) et I car son étude est particulièrement complexe. On a donc le modèle simplifié suivant : $P = A + E$

Pour un caractère quantitatif on a donc deux sources considérées de variation de la performance, A et E. En amélioration génétique on s'intéresse particulièrement à la composante A, qui détermine la transmissibilité d'un caractère.

L'héritabilité (h^2) permet d'estimer la part de variance phénotypique qui est d'origine génétique additive.

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

L'héritabilité varie entre 0 et 1 : plus la composante génétique additive d'un caractère est importante, plus son héritabilité sera élevée et plus la sélection sera efficace. On parle de caractère peu héritable quand $h^2 < 0,2$, d'héritabilité modérée quand $0,2 < h^2 < 0,4$ et d'héritabilité forte quand $h^2 > 0,4$.

L'héritabilité permet d'estimer le progrès génétique (ΔG) attendu après sélection phénotypique en calculant la précision de la sélection ($R = \sqrt{h^2}$ pour un caractère donné) en prenant en compte l'intensité de sélection (i) et l'écart type phénotypique du caractère (σ_P) :

$$\Delta G = i * R * \sigma_P$$

Avec i la différence entre la valeur moyenne d'un caractère chez les animaux retenus et celles des candidats, en unité d'écart-type.

D'un point de vue économique, il est intéressant de rapporter le progrès génétique au temps nécessaire pour qu'il soit transmis d'une génération à l'autre. On exprime alors ΔGa , le progrès génétique annuel, en unité de temps en le divisant par l'intervalle de génération (ΔT) :

$$\Delta Ga = \frac{i * R * \sigma_P}{\Delta T}$$

En amélioration génétique on cherche à prédire la valeur génétique additive des candidats à la sélection, pour cela on utilise un index qui permet de combiner l'ensemble des données dont on dispose sur le candidat (performances propres et/ou performances des apparentés).

Très schématiquement on a : $\text{Index} = \sum_i (b_i * (P_i - \mu))$

Avec b_i un terme permettant de prendre en compte le lien entre le candidat et ses apparentés ainsi que l'héritabilité du caractère et P_i toutes les informations de performances disponibles pour le candidat et les apparentés et μ la moyenne des performances.

Dans le cas de la sélection sur performance individuelle pour un caractère unique mesuré sur le candidat on a : $\text{Index} = h^2 (P_i - \mu)$

L'index permet d'obtenir les valeurs génétiques aussi appelées EBV (*Estimated Breeding Values*) des candidats à la sélection.

1.2.3.1.2. La sélection sur le génotype

Le développement des techniques de génotypage permettant l'accès direct à de nouvelles informations sur le génome ont été le point de départ d'une seconde révolution dans le monde de la sélection. L'association statistique entre un ou plusieurs marqueurs et un caractère d'intérêt ainsi que la découverte de gènes candidats et mutation causales ont permis de développer de nouvelles approches, non plus basées uniquement sur le phénotype mais cette fois directement sur le génotype.

1.2.3.1.2.1. La sélection assistée par marqueurs : prédire la valeur d'un individu à partir de quelques marqueurs moléculaires associés statistiquement à une performance

Le développement des premières cartes génétiques, physiques ainsi que des premières bases de données de marqueurs permet d'obtenir de nouvelles informations sur le génome comme la position d'un marqueur, la fréquence de ses allèles dans la population et l'association statistique entre deux marqueurs plus ou moins proche sur le génome. A l'aide de modèles statistiques permettant de faire le lien entre les allèles aux marqueurs moléculaires et des performances phénotypiques, on peut identifier des zones du génome ayant un effet notable sur la variabilité d'un caractère. Ces zones sont appelées QTL pour *Quantitative Trait Loci*. Différentes méthodes de détection des QTL seront abordées au chapitre 3. Lorsque l'on détecte un QTL, on le localise sur le génome grâce à des marqueurs moléculaires qui lui sont associés et on connaît alors les allèles à ces marqueurs qui sont associés à une variation favorable de la performance. On génotype les individus de la population candidate pour l'ensemble de ces marqueurs moléculaires, ce qui permet d'estimer la valeur génétique du candidat selon qu'il est porteur ou non de l'allèle favorable. C'est le principe de la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) dont l'objectif est de sélectionner les candidats sur leur génotype, sans avoir besoin d'enregistrer leur performance. En procédant ainsi, la SAM va augmenter la fréquence des allèles favorables à un ou plusieurs QTL dans la population en sélection et donc augmenter sa valeur génétique.

Avec la SAM, on peut obtenir la valeur du candidat dès que le génotypage est possible, on peut donc sélectionner de façon très précoce les meilleurs individus et ne conserver qu'un nombre réduit de candidats, ce qui limite les coûts d'élevage. La SAM permet aussi d'estimer la valeur génétique d'un individu pour des caractères impossibles à mesurer chez le candidat car létaux (rendement de filet, résistance à la maladie...) ou mesurable chez un seul sexe (production et qualité des œufs...). On tire alors pleinement profit de la variabilité intrafamiliale d'un caractère, ce qui, en sélection sur le phénotype, n'était possible que pour des caractères directement mesurables sur le candidat.

L'efficacité de la SAM est conditionnée à la localisation précise des QTL par les marqueurs ainsi qu'à la bonne estimation de l'intensité de leurs effets. On estime que l'efficacité de la SAM est environ proportionnelle à la proportion de variance génétique expliquée par le QTL (Goddard et Hayes, 2002). Pour la majorité des caractères d'intérêt, la distribution des effets des QTL suit une courbe en « L », c'est-à-dire qu'un très petit nombre de QTL induit de fortes variations, et l'essentiel des QTL détectés n'expliquent qu'une petite part de la variance génétique (Lande et Thompson, 1990). Dans ce cas, la SAM n'engendrera qu'un gain génétique limité. La SAM présente aussi certaines limites pratiques. D'une part il faut tester un grand nombre de marqueurs pour s'assurer d'en avoir suffisamment en déséquilibre de liaison avec le QTL, et ce pour chacun des caractères d'intérêt (Lande et Thompson, 1990). De plus, le déséquilibre de liaison est souvent spécifique de la population dans laquelle il a été testé, il est donc nécessaire de passer par une étape de validation des marqueurs pour chaque nouvelle population. D'autre part, l'efficacité de la SAM diminue au fil des générations, car les recombinaisons affaiblissent le déséquilibre de liaison (Lande et Thompson, 1990 ; Villanueva et al., 2002), ce qui nécessite de réévaluer l'association entre un QTL et un caractère après quelques générations de sélection. Enfin, le principe même de la SAM, qui est d'augmenter la fréquence des allèles favorables dans la population, peut engendrer une fixation de ces allèles et donc une diminution du progrès génétique à long terme pour ce caractère (Larzul et al., 1997). De ce fait, pour continuer à sélectionner sur ce caractère il faudra détecter et valider de nouveaux QTL.

Chez les bovins, dès 2001 le premier programme de sélection assisté par marqueurs était mis en œuvre dans les trois principales races laitières en France (Fritz et al., 2003). En pisciculture en 2009, la SAM n'était implémentée que dans deux programmes de sélection de saumon atlantique en Europe (AquaBreeding⁸). Chez la truite en France, le développement et la mise en place de la SAM, qui a commencé avec l'identification de QTL pour différents caractères (croissance, résistance maladies, qualité ...), a été très vite rattrapée par le développement de nouveaux outils génomiques qui permettent aujourd'hui d'envisager la sélection génomique.

⁸AquaBreeding, Survey on the breeding practices in the European aquaculture industry. Accès en ligne : <https://www.sysaaf.fr/content/download/3547/36472/version/1/file/AquaBreeding%20Survey.pdf> le 20/08/2018

1.2.3.1.2.2. Vers la sélection génomique : prédire la valeur d'un individu à partir de marqueurs denses couvrant l'ensemble du génome

Haley et Visscher (1998) vont développer l'idée de Lande et Thompson (1990) et proposer l'hypothèse qu'en utilisant plusieurs milliers de marqueurs bien répartis sur l'ensemble du génome, sans connaissance *a priori* de l'intérêt de ces marqueurs, on est capable de suivre la transmission d'une génération à l'autre de l'ensemble des gènes impliqués dans la régulation de l'expression d'un caractère d'intérêt grâce au déséquilibre de liaison entre un marqueur et un QTL. Avec l'avènement des nouvelles technologies de séquençage puis de génotypage, les sélectionneurs ont accès à de nouvelles informations sur le génome de leurs animaux grâce aux puces à SNP qui permettent de connaître le génotype d'individus sur plusieurs milliers de SNP.

Le principe de base de la sélection génomique repose sur l'hypothèse selon laquelle la majorité des caractères sont contrôlés par un grand nombre de QTL, chacun expliquant une petite part de la variance génétique, et que la somme de l'effet de tous les marqueurs pour un individu permet de calculer sa valeur génomique (GEBV pour *Genomic Estimated Breeding Value*). Ce calcul de GEBV se base sur l'accumulation de nombreuses mesures phénotypiques dans une population que l'on génotype (appelée population de référence) afin de prédire la relation statistique entre le génotype et le phénotype via une équation de prédiction. Une fois l'équation de prédiction bien établie à l'aide de la population de référence, on peut prédire la valeur génomique des candidats à la sélection uniquement à partir de leur génotype. Pour améliorer la précision de la prédiction, la population de référence doit satisfaire plusieurs critères : elle doit être la plus grande possible (Hayes et al., 2009) et elle doit être génétiquement proche de la population candidate (si possible contenir les ascendants).

Les premiers modèles d'évaluation génomique sont proposés en 2001 (Meuwissen et al., 2001). Cependant la mise en place de la sélection génomique nécessite d'avoir des outils de génotypage permettant de générer des données pour plusieurs milliers de SNP. Chez les bovins laitiers la sélection génomique a pu être mise en place dès 2008 grâce à la puce de génotypage 54K (*Illumina Bovine SNP 50™ beadchip*). En aquaculture, les premières puces de génotypage ont vu le jour chez le saumon atlantique (130K SNP, Houston et al., 2014 ; 200K, Yáñez et al., 2014b, 2016) et la truite arc-en-ciel (57K, Palti et al., 2015a) et sont maintenant disponibles pour de nombreuses autres espèces. La mise en place de la sélection génomique chez la truite en France fait l'objet de la thèse de Jonathan D'Ambrosio (SYSAF / INRA) au sein du projet SG-Truite (FranceAgriMer et FEAMP, 2017-2019), dont l'objectif est la constitution

des populations de référence pour les principaux caractères sélectionnés, et la mise en place des premiers outils permettant la mise en œuvre de la sélection génomique dans les élevages français.

1.2.3.2. Les différents objectifs de sélection

Pour toutes les espèces en sélection, les objectifs ont évolué et se sont adaptés aux exigences des éleveurs et de la société, aux besoins des filières, aux demandes des consommateurs et aux changements environnementaux. En 2009 en Europe, 14 espèces de poissons étaient sélectionnées à travers 37 programmes différents portant majoritairement sur 6 caractères (Figure 13. AquaBreeding).

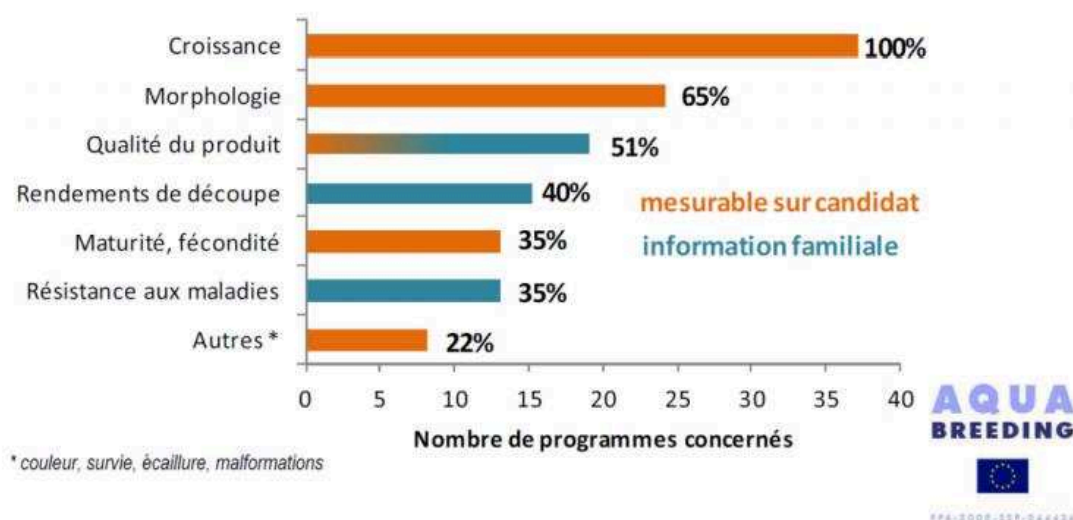


Figure 13. Caractères sélectionnés en Europe en 2009 dans le cadre des programmes de sélection AquaBreeding

En France, parmi les 5 entreprises de TAC adhérentes au SYSAAF, 4 ont un programme de sélection. Ces différents programmes utilisent principalement la sélection massale ou massale combinée au BLUP (SYSAAF, communication personnelle), cependant le nombre d'individus génotypés chaque année a sensiblement augmenté depuis le début des années 2010 pour atteindre 30 309 individus génotypés en 2016 (Haffray, communication personnelle). Chaque entreprise, en fonction des produits commercialisés, définit ses objectifs de sélection que l'on peut regrouper en deux catégories : les caractères de production et les caractères fonctionnels de santé et d'adaptation.

1.2.3.2.1. Caractères de production

Dans l'ensemble, les entreprises de sélection incluent la croissance, la morphologie, les rendements de transformation (filet ou caviar) ainsi que la qualité des produits dans leurs objectifs de sélection.

La croissance est le premier caractère de production que les éleveurs, toutes filières de viande et de chair confondues, ont cherché à améliorer. C'est le principal caractère en sélection dans l'ensemble des programmes piscicoles afin d'obtenir le plus rapidement possible des produits à taille commerciale. La mesure de la croissance est réalisée sur le poids ou la taille du poisson après une certaine période d'élevage (Gjedrem, 2012).

Les deux autres caractères de production que l'on retrouve dans les objectifs de sélection, **les rendements de découpe** et **la qualité de la chair**, sont des caractères létaux. Ils sont soit mesurés sur les collatéraux des candidats, soit mesurés directement sur les candidats eux-mêmes en utilisant des critères de sélection indirects (Gjedrem, 1997 ; Haffray et al., 2013). Pour **les rendements de découpe**, l'une des approches est d'utiliser les mesures de conformation avec soit une note globale donnée par un expert, soit une combinaison de mesures simples (taille de la tête, longueur du corps, hauteur) ou plus complexes (photographies, pointage 3D ou 2D, échographies de la cavité abdominale ; Haffray et al., 2013). Une étude de simulation a permis de mettre en évidence la faisabilité de la sélection directement sur le rendement de filet ou sur des indices dérivés de ce rendement à l'aide de la sélection sur collatéraux (Fraslin et al., 2018b a).

Pour la **qualité de la chair**, on peut mesurer directement sur le candidat le taux de lipides du filet à l'aide d'un *Fatmeter*, appareil qui mesure l'absorption d'un faisceau de micro-ondes par la chair du poisson, absorption qui est proportionnelle à la quantité d'eau dans la chair et donc liée au taux de lipides (Quillet et al., 2005). D'autres paramètres de qualité comme le pH, la couleur, la résistance mécanique ou une analyse histologique des fibres musculaires (Bugeon et al., 2010) peuvent être mesurés sur les collatéraux pour améliorer la qualité de la chair.

Enfin, pour les élevages dont la production est tournée vers le caviar de truite, le rendement de la ponte (kilos d'œufs par kilos de poids vif), la taille, la fermeté et la couleur des œufs sont mesurables sur les candidates à la sélection à chaque ponte.

1.2.3.2.2. Caractères de santé et adaptation

Les caractères de santé (résistance aux maladies) et d'adaptation (efficacité alimentaire, adaptation à un régime alimentaire différent) sont eux aussi sélectionnés avec plus ou moins de facilité.

L'efficacité alimentaire est un critère très intéressant du point de vue de la production et de l'impact sur l'environnement. Réduire la quantité d'aliment nécessaire pour produire un kilo de truite est évidemment très intéressant économiquement, de nombreux progrès ont déjà été observés chez les animaux terrestres et notamment le porc (Gilbert, 2015) et la volaille (Willems et al., 2013). Toutefois la mesure de l'efficacité alimentaire en aquaculture est complexe puisque l'ingéré des animaux est quasiment impossible à mesurer en routine. Différentes méthodes de mesure de l'ingéré des poissons ont été mises au point et donnent des résultats encourageants, que ce soit l'utilisation d'aliment marqué avec des microbilles radio-opaques (Kause et al., 2006a ; Grima et al., 2008) chez la TAC, l'analyse vidéo chez le tilapia (de Verdal et al., 2018) ou encore un isolement des poissons dans des bassins individuels chez le bar. Enfin une méthode indirecte qui lie la résistance au jeûne et la croissance compensatrice (Grima et al., 2010) semble prometteuse chez le bar. Cependant toutes ces méthodes restent coûteuses, demandent beaucoup de temps et de ce fait l'efficacité alimentaire reste difficilement mesurable dans les élevages. Un important caractère lié à l'adaptation que l'on peut sélectionner est la capacité des TAC à consommer un aliment dont la teneur en huile et farine de poisson est limitée voire nulle (Kause et al., 2006b ; Callet et al., 2017). Ce caractère est intéressant pour l'avenir de la pisciculture dans un contexte de raréfaction des ressources marines exploitables.

Enfin, l'amélioration de **la résistance des cheptels aux maladies** est un des enjeux majeurs dans les élevages (Quillet et al., 2007a; Yáñez et al., 2014a). En effet, en aquaculture, le nombre de vaccins et d'antibiotiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché est limité et les épisodes infectieux représentent un coût non négligeable pour les éleveurs (forte mortalités, déformations sur les survivants, intervention vétérinaires et traitements...). Les études sur la génétique de la résistance des TAC aux principales maladies qui touchent les élevages sont nombreuses et ont mis en évidence des héritabilités faibles à modérées (Yáñez et al., 2014a a), allant de 0,05 à 0,51 pour la nécrose pancréatite infectieuse (NPI) (Yamamoto et al., 1991), et de 0,13 à 0,69 pour la septicémie hémorragique virale (SHV) (Dorson et al., 1995 ; Henryon et al., 2005, 2002), deux maladies causées par des virus. De même pour des maladies bactériennes les héritabilités ont été estimées autour de 0,21 (Henryon et al., 2005) pour la yersiniose causée par *Yersinia ruckeri* et dans une fourchette de 0,07 à 0,53 pour la flavobactériose causée par *Flavobacterium psychrophilum* (Henryon et al., 2005 ; Leeds et al., 2010 ; Silverstein et al., 2009 ; Vallejo

et al., 2010). La résistance à ces maladies est donc, en pratique, améliorable par la sélection, mais sélectionner pour la résistance aux maladies nécessite des infrastructures particulières permettant de réaliser des infections expérimentales coûteuses en temps et en main d'œuvre.

Sonesson et al. (2011) proposent une méthode de sélection permettant d'améliorer simultanément la croissance et la résistance à une maladie via deux étapes : une première infection expérimentale des candidats suivie d'une sélection sur la croissance chez les survivants à l'aide de la méthode BLUP. Cependant cette méthode présente des limites pour les maladies transmises verticalement (des ascendants aux descendants par les gamètes et les œufs). De plus, même pour une infection expérimentale contrôlée, la mortalité finale peut être très importante et limiter fortement le nombre de candidats pour la sélection sur la croissance. De nombreuses études ont tenté de développer des mesures indirectes de la résistance à différentes maladies chez le saumon atlantique à l'aide de tests sanguins permettant par exemple de mesurer les variations d'activité du lysozyme (Røed et al., 1993), le niveau de cortisol sanguin (Fevolden et al., 1993) et d'autres paramètres relatifs à l'immunité (Hollebecq et al., 1995 ; Lund et al., 1995 ; Salte et al., 1993) ou encore la culture de virus sur des explants de nageoires pour la résistance des TAC à la septicémie hémorragique virale (SHV) (Quillet et al., 2007b). Cependant ces techniques restent contraignantes, coûteuses et n'expliquent qu'une faible partie de la variabilité de la survie qui semble trop faible pour être exploitée en sélection (Yáñez et al., 2014a). Avec les nouvelles méthodes de sélection à l'aide de marqueurs moléculaires, et notamment la SG, on peut envisager de sélectionner directement les candidats pour la résistance à un agent pathogène.

Conclusion partie 1.2

Dans ce deuxième chapitre, nous avons abordé la truite arc-en-ciel sous l'angle du premier poisson d'élevage en France, avec environ de 24 000 T produites en 2015. En Europe, les salmonidés (saumon atlantique et TAC) sont les principales espèces piscicoles produites, elles représentent un poids économique très important à l'échelle mondiale. La salmoniculture a connu un premier essor dans les années 1970 avec l'amélioration des techniques d'élevage et un second essor dans les années 1990 avec l'application en aquaculture des méthodes d'amélioration génétique basées sur la généalogie. Aujourd'hui, on estime que seulement 10% de la production aquacole mondiale repose sur des programmes de sélection. Le premier caractère d'intérêt en pisciculture à avoir été sélectionné est la croissance parce qu'il est économiquement le plus intéressant mais aussi parce qu'il est facile à mesurer et bien héritable. Différentes méthodes de sélection ont été développées et diffusées au travers du partenariat entre les instituts de recherche (INRA, Ifremer) et le SYSAAF. Ces méthodes ont évolué notamment avec les nouvelles technologies permettant de mesurer de nouveaux caractères (gras, texture). La première révolution pour l'amélioration génétique des poissons a été le développement des marqueurs moléculaires microsatellites permettant de prendre en compte l'information généalogique des candidats à la sélection et ouvrant ainsi la possibilité de sélectionner les candidats sur des caractères dont les mesures sont létales (rendement, résistance aux maladies, qualité de la chair) à l'aide de l'information familiale et de tirer ainsi profit de la variabilité entre les familles. Enfin, le récent développement des outils de génotypage à haute densité avec des marqueurs SNP ouvre de nouvelles perspectives pour l'amélioration génétique des cheptels et notamment pour la prise en compte de la variabilité intra-famille des caractères létaux dans la sélection des reproducteurs.

"TAKE HOME MESSAGE 2"

- Une production économiquement importante, en France, par rapport à l'ensemble de la production aquacole.
- Un essor de la production depuis les années 1970 et le développement de l'amélioration génétique de la TAC depuis les années 1980.
- Des contraintes liées aux particularités des poissons :
 - Animaux aquatiques très dépendants du milieu.
 - Difficulté de manipulation (anesthésie pour sortir les poissons de l'eau).
 - Animaux de très petite taille à l'éclosion (impossibilité de les marquer individuellement).
- Des objectifs de sélection variés, avec des caractères nécessitant des mesures létales réalisées sur les collatéraux des candidats à la sélection.
- Des méthodes de sélection qui évoluent rapidement grâce au développement de nouvelles méthodes et de technologies en partenariat avec les instituts de recherche, le SYSAAF et les éleveurs.
- Une sélection sur le génotype des candidats en plein essor avec le développement et la mise en place de la sélection génomique.

1.3. La génétique de la réponse aux maladies, l'exemple de la flavobactériose d'eau froide chez la truite arc-en-ciel

Quelles que soient les productions animales, les maladies qui touchent les élevages ont un coût non négligeable, en raison des mortalités parfois élevées, des pertes de croissance et des malformations qui peuvent persister chez les survivants. Les productions aquacoles sont particulièrement exposées aux agents pathogènes à cause de leur forte dépendance à un milieu ouvert (aquatique : marin ou rivière) dont la qualité n'est pas toujours prévisible et difficile à contrôler (Houston, 2017). De plus dans un élevage piscicole, les lots de poissons sont constitués d'un nombre très important d'individus dans un espace restreint. Cette densité peut favoriser la transmission rapide des agents pathogènes entre individus.

Les salmonidés d'élevage sont sensibles à divers parasites, virus et bactéries. Parmi ces bactéries, *Flavobacterium psychrophilum*, responsable de la flavobactériose d'eau froide, est l'un des pathogènes majeurs des élevages de truite arc-en-ciel en France. La flavobactériose d'eau froide, lorsqu'elle touche les alevins, peut provoquer des mortalités très importantes. Aujourd'hui aucun vaccin n'est commercialisé en France et seul l'usage d'antibiotiques permet de contrôler les épisodes infectieux, ce qui soulève des questions environnementales avec la croissance de l'antibiorésistance dans le monde (OMS⁹). En France, il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'outil de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes en pisciculture (Anses, 2014). Cependant, des informations de terrain mettent en évidence l'émergence de résistances responsables d'échec thérapeutiques récurrents (Anses, 2014). L'antibiorésistance et la diffusion de gènes de résistance dans les environnements d'aquaculture (bassins, aval des rivières...) en lien avec les activités aquacoles sont de plus en plus documentées (Gordon et al., 2007 ; Muziasari et al.,

⁹<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/r%C3%A9sistance-aux-antibiotiques> visité le 13/09/2018

2016 ; Schmidt et al., 2000). Des méthodes alternatives de lutte sont donc nécessaires pour limiter l'impact de *F. psychrophilum* sur la production de TAC.

La résistance des poissons aux différents agents pathogènes (virus, bactéries ou parasites) est le plus souvent héritable (voir revue de Robinson et al., 2017), et l'amélioration génétique est un bon levier pour répondre à cette nécessité. Comme introduit dans le chapitre précédent, la sélection pour la résistance, un caractère létal, nécessite de réaliser les mesures sur les collatéraux des candidats. La mise en place des méthodes de sélection sur le génotype (SAM et SG) permet de tirer profit de la variabilité individuelle mais elle nécessite d'approfondir les connaissances sur la nature et l'étendue de son déterminisme génétique.

Cette dernière partie de l'introduction a pour objectif d'introduire l'une des maladies bactériennes les plus importantes pour la trutticulture française, la flavobactériose d'eau froide, les différents moyens de lutte contre l'agent pathogène qui en est responsable et les principales connaissances sur les mécanismes immunitaires mobilisés en réponse à l'infection. Enfin, nous introduirons les différentes notions permettant de mieux appréhender les différentes composantes de la réponse à l'infection.

1.3.1. La flavobactériose d'eau froide

1.3.1.1. De la première observation à la caractérisation de la maladie

En 1946, Davis rapporte pour la première fois une maladie qui touche le saumon coho (Davis, 1946 ; dans Bullock et al., 1971). Il décrit les symptômes de ce qu'il appelle alors « *peduncle disease* » (Pacha et Ordal, 1970 dans Bernardet et Bowman (2006) ; Holt, 1993) : la peau se noircit et s'érode autour de la nageoire adipeuse, peu à peu la zone de lésion s'ulcère et s'agrandit autour de la nageoire caudale et la queue jusqu'à, parfois, exposer la colonne vertébrale. C'est en 1960 que la bactérie responsable est isolée pour la première fois par Borg (1960). Nommée dans un premier temps *Cytophaga psychrophila*, elle deviendra *Flexibacter psychrophilus*, et enfin *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*). La maladie se déclarant généralement quand la température de l'eau est basse (autour de 10 - 15°C), elle a été renommée « *Low temperature/coldwater disease* » en 1960 (Borg, 1960), puis le terme de « *Bacterial cold water disease* » (BCWD) a été proposé et est maintenant l'un des plus employés. En Europe, comme la maladie affecte principalement les alevins de TAC, on parle du syndrome de mortalité des alevins de truite arc-en-ciel (RTFS pour *Rainbow Trout Fry Syndrom*) ou syndrome de mortalité des alevins (FMS pour *Fry*

Mortality Syndrom) (Nematollahi et al., 2003b). En France, on parle principalement de flavobactériose d'eau froide ou flavobactériose. Il s'agit de la troisième maladie bactérienne la plus importante dans les élevages français de truites, après la furunculose (due à *Aeromonas salmonicida*) et la yersiniose (due à *Yersinia ruckeri*) (Anses, 2014).

Pendant dix ans, *F. psychrophilum* semblait cantonnée à l'Amérique du Nord, son aire d'origine, avant d'être identifiée en Europe au milieu des années 1980 (Von Weis, 1987 ; Bernardet et al., 1988 dans Bernardet et Bowman (2006)) et dès les années 1990 dans toutes les zones de production de salmonidés du monde. Si aucune étude n'explique de manière définitive la raison de sa diffusion, l'une des hypothèses est qu'il aurait été transporté, involontairement, sur des œufs contaminés lors des échanges internationaux (Kumagai et Takahashi, 1997 ; Wakabayashi et al., 1994). Il est aussi possible que *F. psychrophilum* ait toujours été présent mais qu'il soit passé inaperçu avant l'intensification de la production (Bernardet et Bowman, 2006).

La flavobactériose provoque une infection importante allant jusqu'à la septicémie hémorragique et est responsable d'un taux mortalité très élevé chez les alevins, pouvant atteindre 70% (Nematollahi et al., 2003b; Starliper, 2011). Les signes cliniques diffèrent aussi selon l'âge des poissons infectés (Nematollahi et al., 2003b). Chez les alevins, avant la mort, on observe uniquement des signes cliniques non spécifiques tels que anémie, léthargie, perte d'appétit, légère sur-coloration de la peau ou encore exophtalmie (Lorenzen, 1994). Sur des poissons un peu plus gros, on peut observer un début de nécrose au niveau des nageoires, des branchies, de la bouche et des yeux qui peut aller jusqu'à l'ulcération (Figure 14) (Bernardet et Kerouault, 1989 ; Dalsgaard, 1993 ; Lehmann et al., 1991 ; Lorenzen, 1994 ; Martínez et al., 2004). Des formes neurologiques de la maladie ont pu être observées aux Etats-Unis chez de jeunes saumons coho ayant survécu à un épisode infectieux important, avec des déformations de la colonne vertébrale. Quelques cas de méningite, d'ostéochondrose et d'ostéites ont aussi été observés (Kent et al., 1989 ; Meyers, 1989 ; Ostland et al., 1997). La flavobactériose s'accompagne souvent d'une hypertrophie importante de la rate dans laquelle la bactérie est retrouvée en grand nombre ; cette présence dans la rate des alevins est d'ailleurs considérée comme un signe clinique caractéristique du RTFS, des études ayant montré que la charge bactérienne dans la rate augmentait avec le temps après une injection expérimentale (Ekman et al., 2003 ; Ekman et Norrgren, 2003 ; Rangdale et al., 1999). La rate semble donc être un organe cible de *F. psychrophilum*.



Figure 14. Lésions caractéristiques de flavobactériose observées chez la truite arc-en-ciel après infection expérimentale par baignade (a) et injection (b).

- a. Lésions caractéristiques d'une infection par *F. psychrophilum* après une infection expérimentale par baignade chez la truite arc-en-ciel. La bactérie est à l'origine de la nécrose de tissus au niveau des branchies, de la nageoire caudale et de la tête. Dans les cas extrêmes, la nécrose est tellement importante qu'elle découvre la colonne vertébrale.
- b. Lésions caractéristiques d'une infection expérimentale par injection intramusculaire chez la truite arc-en-ciel. La nécrose est concentrée autour du point d'injection.

Comme la majorité des signes cliniques ne sont pas spécifiques de la maladie, le diagnostic de la flavobactériose nécessite l'isolement et l'identification de l'agent pathogène associé. Des prélèvements sont réalisés dans les organes internes (dont la rate) et/ou dans les lésions externes pour inoculation sur gélose et identification phénotypique ou moléculaire. Sur la gélose, les colonies sont facilement identifiables : circulaires et convexes, brillantes et de couleur jaune vif. Les cellules sont des bacilles aux extrémités arrondies, longs en général de 2 à 10 μm et large de 0,3 à 0,5 μm . Sous certaines conditions de culture, elles peuvent aussi former des filaments plus ou moins longs (de 20 μm à 50 μm). *F. psychrophilum* est relativement peu mobile par rapport à d'autres bactéries du même genre, qui se déplacent plus facilement en glissant sur les surfaces humides (Bernardet et al., 1996).

1.3.1.2. Carte d'identité de *F. psychrophilum*

Les principales références citées ci-dessous sont issues de (Bernardet et Bowman, 2006).

Physiologie, taxonomie, habitat et écologie

Flavobacterium psychrophilum est une bactérie Gram négative et strictement aérobie (Bernardet et al., 1996 ; Bernardet et Grimont, 1989). Elle appartient au phylum *Bacteroidetes*, à la famille des *Flavobacteriaceae*, et au genre *Flavobacterium* (Bernardet et al., 1996). Les bactéries de ce genre sont très largement distribuées dans la nature, on les rencontre principalement dans des écosystèmes aquatiques (Bernardet et Grimont, 1989). *F. psychrophilum* fait partie des 16 espèces du genre *Flavobacterium* qui sont dites psychrophiles ou psychrotolérantes car leur température optimale de croissance se situe autour de 15-20°C, certaines étant encore capables de pousser à 4°C (Bernardet et Bowman, 2006).

Cet agent pathogène, infecte presque exclusivement les salmonidés ainsi qu'une espèce proche, élevée au Japon et en Corée, l'ayu (*Plecoglossus altivelis*). Il a aussi été isolé de façon sporadique chez des anguilles, des cyprinidés et d'autres espèces de poissons (Amita et al., 2000 ; Iida et Mizokami, 1996 ; Izumi et al., 2003 ; Lehmann et al., 1991) et on la retrouve aujourd'hui un peu partout dans le monde (Etats-Unis, Canada, Chili, Argentine, Mexique, Europe, Turquie, Iran, Japon, Corée ou encore Tasmanie). Plusieurs études ont montré que *F. psychrophilum* pouvait survivre dans l'eau en partie grâce aux nutriments fournis par les sédiments (Madetoja et al., 2003) et jusqu'à 12 mois dans une eau filtrée en jeûnant (Vatsos et al., 2003). Wiklund et al. (2000) ont pu détecter de faibles quantités de *F. psychrophilum* à partir d'échantillons d'eau prélevés dans les piscicultures par des méthodes de PCR tandis que les mêmes échantillons inoculés sur de la gélose étaient négatifs, ce qui peut expliquer qu'en France, *F. psychrophilum* n'a jamais été détecté dans l'environnement (eau, sédiments ...) puisque la détection n'a été réalisée que sur gélose (Bernardet, communication personnelle). Ainsi, l'eau d'un bassin contaminé par *F. psychrophilum*, les poissons d'un élevage ou du milieu proche pouvant être infectés par l'agent pathogène sont donc autant de potentiels réservoirs qui entretiennent et propagent la maladie au sein d'un élevage, d'une rivière ou encore d'un bassin versant (Dalsgaard et Madsen, 2000 ; Madetoja et al., 2000).

La culture et la conservation : des étapes clefs difficiles à maîtriser

Plusieurs méthodes de cultures et de préservation existent pour les bactéries du genre *Flavobacterium* qui sont plus ou moins faciles à cultiver. La culture et la conservation de *F. psychrophilum* sont assez difficiles à maîtriser, de par sa sensibilité au sodium, la bactérie n'est pas capable de pousser sur les milieux marins

ou contenant une grande quantité de chlorure de sodium, et doit donc être cultivée sur des milieux à base de tryptone et d'extrait de levure appelé TYES (pour *Tryptone yeast extract salts*) du type de celui mis au point par Anacker et Ordal en 1955 (Holt, 1988 ; Uddin et Wakabayashi, 1997). Cette bactérie peut être conservée plusieurs années par cryoconservation à -70°C ou par lyophilisation (Bernardet et Bowman, 2006) cependant les méthodes de conservation influencent la virulence de la bactérie qui a tendance à diminuer au cours du temps (Michel et Garcia, 2003).

Plusieurs facteurs de virulence identifiés

L'**activité protéolytique** de la bactérie, responsable des lésions nécrotiques (Figure 14) caractéristiques de l'infection par *F. psychrophilum*, est l'un des facteurs majeurs de la virulence (Bertolini et al., 1994 ; Duchaud et al., 2007 ; Pacha et Porter, 1968). La capacité de *F. psychrophilum* à **adhérer à son hôte** semble aussi être un facteur de virulence primordial. Nematollahi et al. (2003a) montrent qu'une souche très virulente de *F. psychrophilum* s'attache plus facilement aux tissus de son hôte qu'une souche moins virulente. Deux études réalisées sur la TAC et sur l'ayu montrent que *F. psychrophilum* adhère préférentiellement au niveau de la mâchoire et du pédoncule caudal, qui correspondent aux points de lésions (Kondo et al., 2002 ; Vatsos et al., 2001). En plus de l'adhésion, la capacité de glissement, même si elle est limitée chez *F. psychrophilum*, est un potentiel facteur de virulence car elle permettrait à la bactérie de s'infiltrer plus facilement sous les écailles, dans le mucus ou les branchies (Bernardet, communication personnelle). Cette hypothèse a été vérifiée dans une étude qui a mis en évidence l'importance de deux protéines, responsables de la mobilité par glissement chez d'autres bactéries du genre *Flavobacterium*, dans la virulence de *F. psychrophilum* (Pérez-Pascual et al., 2017) avec une virulence plus faible de souches mutées pour ces deux protéines probablement imputée en partie au manque d'activité protéolytique ainsi qu'à l'absence de sécrétions d'enzymes et d'adhésines qui limitent la colonisation de l'hôte par la bactérie.

Une diversité génétique limitée avec la prédominance de quelques complexes-clonaux majeurs

Le premier génome complet de *F. psychrophilum* a été séquencé en 2007 par une équipe française (unité de Virologie et Immunologie Moléculaires de l'INRA de Jouy-en-Josas) (Duchaud et al., 2007); il s'agissait de la première souche isolée en France, la souche JIP02/86 (Bernardet et Kerouault, 1989). Ce séquençage a permis de repérer les gènes associés aux mécanismes de virulence et à la pathogénicité de la bactérie ainsi que sa capacité à produire des biofilms.

Différentes études ont été menées pour caractériser la diversité génétique des souches de *F. psychrophilum* par reséquençage de génome de plusieurs souches (Duchaud et al., 2018) ou à l'aide

d'approches plus simples, telles que la MLST (*Multilocus Sequence Typing*, Nicolas et al., 2008) ou le sérotypage par PCR multiplex (mPCR) (Rochat et al., 2017). Dans l'étude de Nicolas et al. (2008), qui portait sur 50 isolats bactériens prélevés sur 10 espèces de poissons différentes sur 4 continents, l'approche MLST a permis d'identifier différents *Sequence type* (ST), souvent associés à une espèce hôte (truite arc-en-ciel, saumon coho...) mais pas spécifiques d'une région du monde. Les deux principaux ST identifiés en Europe sont spécifiques de la truite arc-en-ciel, le ST2 regroupe aussi des souches isolées au Chili et le ST10 des souches isolées en Amérique du Nord. L'association préférentielle entre un ST et une espèce hôte pourrait refléter des mécanismes infectieux différents selon l'espèce cible. Une étude sur la diversité des souches isolées dans les piscicultures française (Siekoula-Nguedia et al., 2012) met en évidence la prédominance de deux ST (ST2 et ST90) dans les deux plus grandes régions productrices de salmonidés (Figure 15).

L'approche de sérotypage par mPCR (Rochat et al., 2017), effectuée sur 244 isolats bactériens, a mis en évidence une très forte association entre le sérotype et l'espèce hôte, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les différences génétiques observées sont possiblement liées à des voies d'infection spécifiques de l'espèce hôte. Pour le moment, on ne sait pas si des sérotypes différents qui infectent une espèce donnée ont des stratégies de virulence différentes. On peut faire l'hypothèse que des hôtes résistants à un isolat donné seront sensibles à un autre isolat provenant d'un sérotype, d'un ST et ou d'un CC différent car les mécanismes de virulence seraient différents. L'identification relativement facile des sérotypes par sérotypage mPCR, qui peut être un avantage pour la création de vaccin (Rochat et al., 2017) pourrait permettre aussi de vérifier l'hypothèse d'une possible coïnfection par plusieurs *F. psychrophilum* de sérotypes différents lors d'un épisode de mortalité spontané puisqu'on sait que plusieurs sérotypes différents peuvent cohabiter dans une même pisciculture (Projet Re-sist, communication de Bernardet).

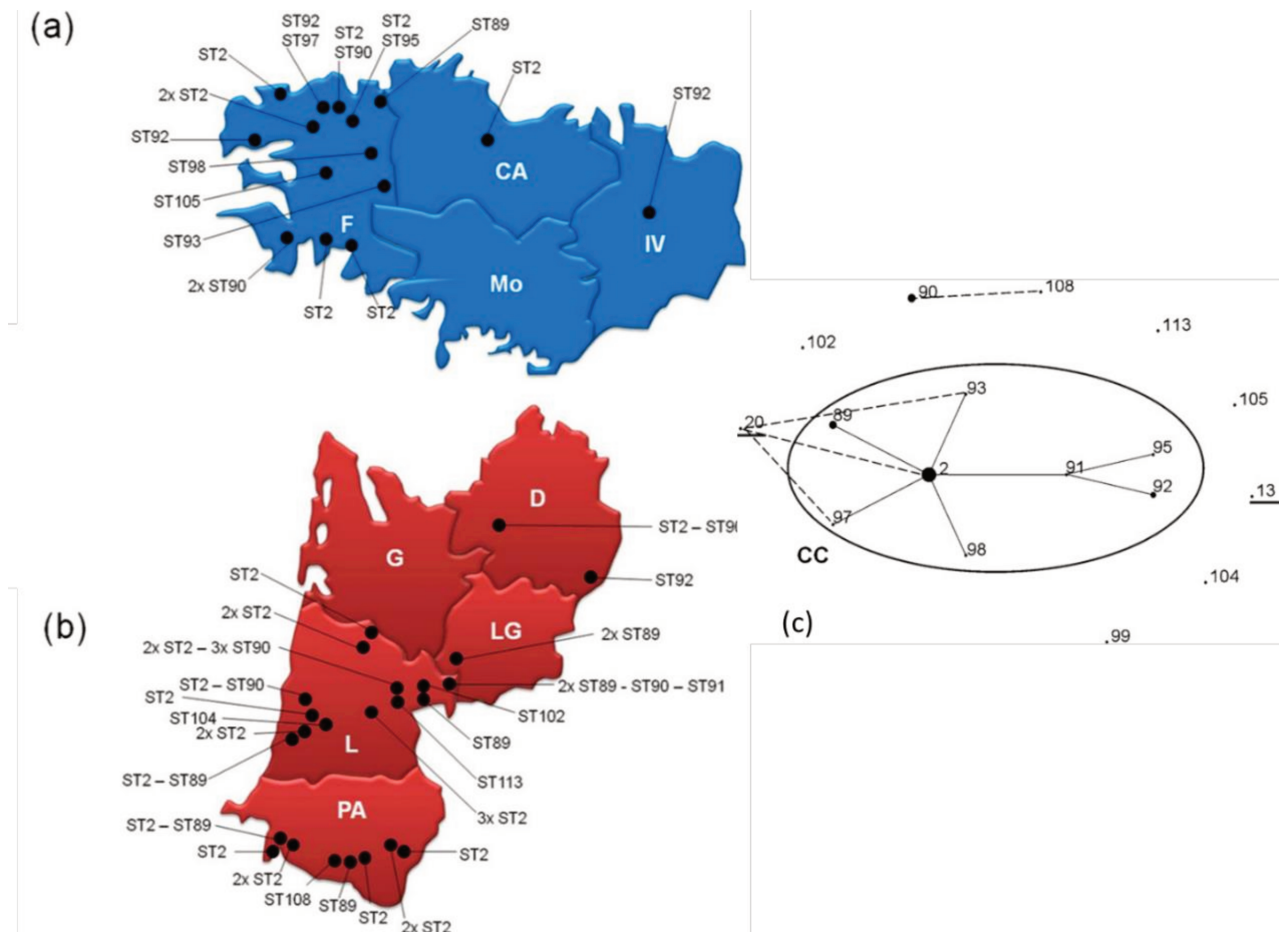


Figure 15. Origine géographique de différents isolats de *F. psychrophilum* français provenant de fermes d'élevage de salmonidés dans deux principales régions la Bretagne (a) et l'Aquitaine (b) et regroupement des ST en complexe-clonal (c)

Issue de Siekoula-Nguedia et al. (2012)

Les deux régions sont divisées en différents départements:

(a) Finistère (F), Côte d'Armor (CA), Morbihan (Mo) et Ile et Vilaine (IV)

(b) Dordogne (D), Lot et Garonne (LG), Landes (L), Gironde (G) et Pyrénées Atlantiques (PA)

(c) Diagramme de eBURST qui regroupe les ST proches en un complexe-clonal (CC)

Les ST qui ne diffèrent que par un locus sont reliés par des traits pleins et font partie du même CC-ST2

Les ST qui diffèrent par deux locus sont reliés par des traits pointillés

La taille des points est proportionnelle au nombre d'isolat dans chaque ST

Le ST20 contient la souche de référence JIP02/86, le ST90 la souche de référence FRGDSA 1882/11

1.3.2. Les moyens de défense dans les élevages

Des méthodes de prévention limitées

La principale voie connue de contamination par *F. psychrophilum* est horizontale, d'un poisson malade à un poisson sain. Cependant une contamination verticale, de la mère aux descendants par l'intermédiaire des œufs, n'est pas exclue et pourrait expliquer la dissémination du pathogène depuis les États-Unis dans le monde entier à travers le commerce d'œufs (Kumagai et Takahashi, 1997). En effet, différentes études mettent en évidence la présence de *F. psychrophilum* dans le sperme et les fluides ovariens qui pourrait expliquer une transmission verticale de la surface de l'œuf ainsi qu'une possible entrée de l'agent pathogène à l'intérieur de l'œuf lors de la phase de durcissement de l'œuf (Holt, 1993 ; Kumagai et Nawata, 2010 ; Long et al., 2014 ; Taylor, 2004). Brown et al. (1997) détectent *F. psychrophilum* dans le mucus qui entoure les œufs mais aussi à l'intérieur des œufs, probablement dans l'espace péri-vitellin, même après une procédure de désinfection à l'iode et la stérilisation de la surface des œufs. Des procédures de **désinfection systématique des œufs** sont nécessaires pour prévenir la dissémination de *F. psychrophilum* mais elles ne semblent pas suffisantes. Des méthodes de désinfection du sperme pour limiter la transmission verticale ont aussi été testées (Oplinger et al., 2015) mais leur usage induit une baisse de la fertilité du sperme et du taux de fécondation des œufs. Soltani et Burke (1995) ont suggéré qu'une augmentation de la température de l'eau et/ou de la salinité permettraient de réduire la mortalité dans un élevage infecté par *F. psychrophilum*, mais ces mesures se heurtent à des difficultés pratiques.

Différentes études ont mis en évidence que **l'alimentation** peut avoir un effet positif sur la survie suite à une infection expérimentale par *F. psychrophilum*, que ce soit par l'utilisation de **probiotiques** (LaPatra et al., 2014), ou de maïs naturellement contaminé par une mycotoxine (Ryerse et al., 2016). L'administration d'un probiotique dans l'eau (Boutin et al., 2013) qui diminue la quantité d'agents pathogènes dans le milieu pourrait aider à limiter les infections et surinfections. Enfin, d'autres études testent l'utilisation de bactériophages dans l'alimentation, de manière préventive, qui pourraient aider à lutter contre la bactérie (Castillo et al., 2015 ; Christiansen et al., 2016 ; Madsen et al., 2013). Cependant, plusieurs études ayant mis en évidence la capacité de *F. psychrophilum* à former des **biofilms** qui pourrait expliquer la survie prolongée de la bactérie dans le milieu (Duchaud et al., 2007) et lui permettrait de se protéger des bactériophages (Castillo et al., 2015). En conséquence, les méthodes classiques de prévention et de désinfection (iode) doivent s'accompagner de méthodes plus poussées comme le frottement des bac (Bernardet et al., 2015) ou encore le traitement préventif des reproducteurs (injection d'antibiotique à

large spectre) pour limiter la transmission verticale et des méthodes de désinfections des œufs poussées (Bronopol appliqué quotidiennement 24h après la ponte jusqu'au stade œillé) si on veut limiter la propagation de la maladie (Bernardet et Michel, communication personnelle).

Une absence de vaccination efficace

Il existe pour un petit nombre de pathologies bactériennes chez la truite, des vaccins qui permettent de réduire la mortalité, sans toutefois protéger totalement les animaux sur des périodes longues (Anses, 2014). Ces vaccinations peuvent être réalisées, pour des poissons de petite taille, par baignation ou par injection pour des poissons de taille plus importante. La vaccination par injection est coûteuse en main d'œuvre compte tenu des effectifs des lots d'élevage (plusieurs milliers ou dizaines de milliers d'individus) et est une source de stress importante pour les poissons (anesthésie et manipulation hors de l'eau). Les vaccins sont donc le plus souvent réservés aux poissons à « forte valeur ajoutée » comme les géniteurs (Anses, 2014). Bien que la vaccination chez les poissons soit un domaine de recherche relativement actif, les résultats sont en pratique limités. Ainsi, pour la flavobactériose, les premiers tests de vaccination ont été réalisés par injection ou immersion avec des cellules mortes de *F. psychrophilum* chez la TAC, le saumon coho ou l'ayu ; dans certains essais, la mortalité des poissons vaccinés était significativement plus faible que celle des poissons naïfs (Bernardet, 1997 ; Hoare et al., 2017 ; Nematollahi et al., 2003b ; Rahman et al., 2000). D'autres types de vaccins permettant de fournir une protection plus importante, seuls (Merle et al., 2003 ; Rahman et al., 2002) ou accompagnés d'un régime alimentaire stimulant les défenses immunitaires (Sudheesh et al., 2016), ont par la suite été testés. Cependant, plusieurs études mettent en évidence une efficacité limitée malgré la présence d'un grand nombre d'anticorps spécifiques à *F. psychrophilum* dans le mucus ou le sérum de TAC vaccinées. La protection n'est pas suffisante et la mortalité toujours trop importante (LaFrentz et al., 2002, 2003 ; Wiklund et Dalsgaard, 2002). Gómez et al. (2014) recensent les difficultés rencontrées dans la conception d'un vaccin efficace : *F. psychrophilum* affecte les alevins dès 0,2 g quand le système immunitaire n'est pas complètement développé ; les infections expérimentales destinées à tester l'efficacité des vaccins sont difficiles à mettre en place ; et l'existence de plusieurs sérotypes de *F. psychrophilum* nécessite l'administration d'un vaccin à large spectre. Du fait de la petite taille des poissons cibles qui complique l'injection de vaccin, de la faible efficacité de la vaccination orale ou par immersion, il est difficile de produire un vaccin économiquement intéressant pour les producteurs mais aussi pour les compagnies pharmaceutiques du fait de la petite taille du marché cible et à la difficulté d'obtenir des autorisations de mises sur le marché (AMM) (Lafferty et al., 2015). Depuis 2015, la compagnie PHARMAQ (Norvège), produit un vaccin (ALPHA JECT® IPNV-Flavo 0.025

PHARMAQ)¹⁰ pour la flavobactériose ainsi que la NPI pour le saumon atlantique. Cependant, ce vaccin n'est commercialisé qu'au Chili.

Les traitements antibiotiques restent la principale méthode de lutte contre *F. psychrophilum*

Pour de nombreuses maladies, principalement bactériennes, il n'existe pas de vaccin commercial et seul l'usage d'antibiotiques permet de contrôler les épisodes infectieux. Les traitements se présentent souvent sous la forme de granulés médicamenteux, contenant des antibiotiques mélangés aux aliments, ils peuvent aussi prendre la forme de poudre ou, pour les alevins, être administrés par balnéation (Anses, 2014). Ils sont généralement métaphylactique, c'est-à-dire qu'on administre le traitement à l'ensemble des poissons d'un bassin, qu'ils présentent ou non des signes cliniques (Anses, 2014). En France, Le nombre d'antibiotiques bénéficiant d'une AMM en pisciculture est limité, seuls 5 antibiotiques étaient autorisés fin 2011 : l'acide oxolinique, la fluméquine, l'oxytétracycline, l'association triméthoprim-sulfadiazine et le florfenicol (Anses 2014). Dans les élevages, la principale méthode de lutte contre *F. psychrophilum* passe par l'utilisation principalement du florfenicol (Holt, 1993 ; Nematollahi et al., 2003b ; Wahli et Madsen, 2018). Ainsi, en France, une étude réalisée en 2016 met en évidence que 53% des élevages de truite utilisent le florfenicol, essentiellement pour lutter contre *F. psychrophilum* (Le Bouquin et al., 2016). Cependant, à cause du risque d'émergence d'antibiorésistance, aussi bien chez *F. psychrophilum* (Nematollahi et al., 2003a) que chez d'autres bactéries présentes dans le même environnement (Muziasari et al., 2016 ; Schmidt et al., 2000) d'autres méthodes de luttés contre *F. psychrophilum* sont nécessaires pour limiter l'impact des antibiotiques sur l'environnement.

***F. psychrophilum*, l'un des principaux agents pathogènes qui infecte différentes espèces de salmonidés est une bactérie très répandue à travers le monde. Sa diversité génétique est limitée, par rapport à d'autres bactéries, avec la prédominance de quelques complexes-clonaux et sérotypes qui montrent une association préférentielle avec l'espèce hôte, probablement liée à une différence dans les principaux facteurs de virulence. La principale voie de transmission est horizontale. Une transmission verticale semble possible, aux seins des œufs, ce qui complique les méthodes de prévention. La contamination principalement à des stades précoces, avant le développement du système immunitaire adaptatif, et des conditions économiques qui compliquent la création de vaccins, résultent en une prophylaxie essentiellement au moyen d'antibiotiques. Pour développer de nouvelles méthodes de lutte, il est nécessaire de mieux comprendre la réponse immunitaire des TAC.**

¹⁰<https://www.pharmaq.no/updates/february-13th-2/> visité le 10/09/2018

1.3.3. La réponse immunitaire à une infection chez la truite arc-en-ciel : exemple de la réponse à *Flavobacterium psychrophilum*

Les poissons, comme tous les vertébrés gnathostomes possèdent les composants principaux de système immunitaire inné et adaptatif qui leur permet de combattre les infections liées aux bactéries, virus et autres parasites présents dans leur environnement et qui sont à l'origine de nombreuses maladies. Les principaux organes immunitaires des poissons sont le rein antérieur, le thymus et la rate ainsi que différents tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour *mucosa-associated lymphoid tissue*) qui se situent dans la peau, les branchies et l'intestin (Thompson, 2017).

Chez les poissons, l'éclosion représente une première étape critique dans l'évolution du système immunitaire avec la suppression des premières barrières physiques que sont la paroi de l'œuf (chorion) et les différentes membranes embryonnaires (Yamagami et al., 1992). La seconde étape critique est le début de l'alimentation exogène avec l'ouverture de la bouche et du tractus intestinal qui forment une première voie d'entrée des microorganismes, aussi bien les pathogènes que ceux permettant l'établissement du microbiote intestinal (Rendueles et al., 2012). Après l'éclosion, la première ligne de défense des poissons est constituée des barrières physiques comme la peau, les écailles, le MALT. Cependant, de par leur contact étroit avec le milieu, les MALT sont aussi d'importantes voies d'entrée des pathogènes (Thompson, 2017). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance du mucus dans les défenses immunitaires de nombreux poissons dont les salmonidés (Fast et al., 2002 ; Hjelmeland et al., 1983 ; Shephard, 1994), qui non seulement sert de barrière physique en "piégeant" les pathogènes mais contient aussi différents effecteurs anti microbiens comme le lysozyme, des protéines du complément, des peptides antibactériens et des immunoglobulines (Cordero et al., 2015 ; Salinas, 2015 ; Xu et al., 2013). Si les agents pathogènes arrivent malgré tout à franchir ces premières lignes de défenses, ils sont reconnus par différents récepteurs qui vont alors initier la réponse immunitaire. Les agents pathogènes sont alors confrontés à une réponse de phase aigüe puis à la réponse dite innée, qui va défendre l'organisme ce qui laisse le temps au système immunitaire adaptatif de se mettre en place et de répondre. Parfois, la réponse immunitaire innée suffit à stopper la maladie (Thompson, 2017).

Cette partie a pour objet de faire un court rappel des principales composantes du système immunitaire des poissons, avec un éclairage particulier sur la truite arc-en-ciel et la réponse immunitaire contre *F. psychrophilum*.

1.3.3.1. L'immunité innée et adaptatif des poissons

Chez les poissons téléostéens, comme chez l'ensemble des vertébrés, le système immunitaire inné, primordial, est composé de nombreux effecteurs qui peuvent être cellulaires ou humoraux. Les cellules du système immunitaire inné sont principalement des cellules phagocytaires mononucléiques (comme les monocytes, par exemple les macrophages) ou polynucléiques (par exemple les granulocytes neutrophiles) qui sont les premières cellules à migrer sur le lieu de l'infection et qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire (Neumann et al., 2001). Le système immunitaire inné fait aussi intervenir des composants humoraux qui incluent une large variété de protéines et glycoprotéines dont le rôle principal est de tuer ou d'inhiber la croissance de l'agent pathogène. Parmi les effecteurs de la réponse humorale innée, on trouve des peptides antimicrobiens, le lysozyme, des transferrines, des anti-protéases, des cytokines et le système du complément (Thompson, 2017).

Le système du complément est un ensemble de protéines impliquées dans les défenses humorales innées, particulièrement important contre les infections bactériennes. Très conservé au sein des vertébrés il joue de nombreux rôles comme l'élimination des bactéries, la réparation des dégâts causés par l'infection, la destruction des cellules apoptotiques, il module en partie la réponse adaptative et promeut l'inflammation (Boshra et al., 2006). Ce système se compose de nombreuses protéines différentes (plus de 35 chez les poissons) dont certaines sont des paralogues (en particulier dans le cas de génomes dupliqués comme la TAC, Nakao et al., 2011). Ces protéines peuvent activer des mécanismes antimicrobiens via trois voies convergentes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative (Figure 16). La protéine C3 est l'un des composants principaux du système du complément. Chez la TAC il existe de nombreux gènes codant pour différentes protéines C3 qui ont été identifiés sur les chromosomes 2, 3, 8, 13 et 17 codant pour plusieurs protéines C3 fonctionnelles (Sunyer et al., 1996 ; Omyk_1.0, Gao, 2016) .

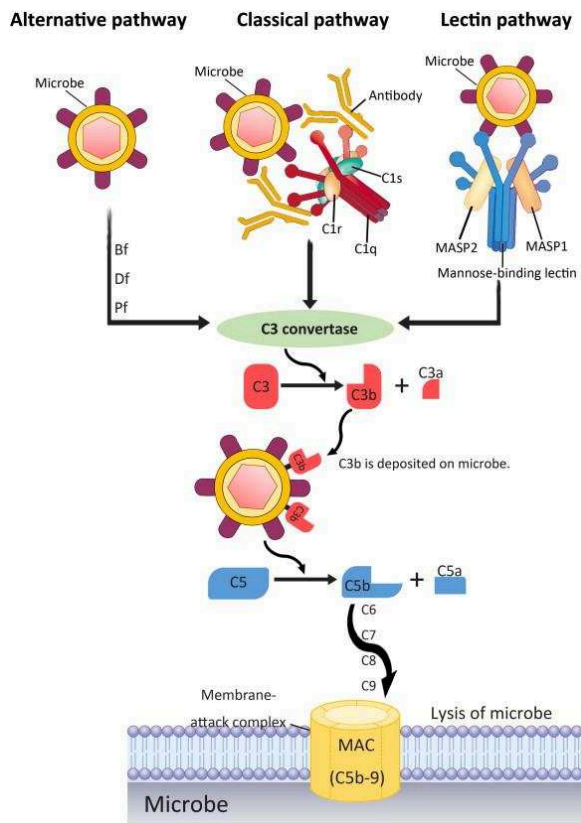


Figure 16. Les trois voies métaboliques du système du complément (issue de Zhang et Cui, 2014)

Les trois voies métaboliques : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative se rejoignent au moment d'activer, en la clivant, la protéine C3, en C3a qui est un médiateur de l'inflammation et en C3b qui favorise la phagocytose et la lyse cellulaire des bactéries en activant la formation du complexe d'attaque membranaire par l'assemblage de C5, C6, C7, C8 et C9. La voie classique est activée par des complexes d'antigènes et d'anticorps, tandis que la voie alternative est activée directement par la fixation de la protéine C3b sur l'agent pathogène. La voie des lectines est activée par la fixation du MBL (Mannose-binding lectine) sur l'agent pathogène.

Les cascades d'activations des trois voies métaboliques ainsi que les actions des protéines C3a et C3b présentés ici sont une simplification des cascades réelles (Sunyer et al., 2003).

L'immunité adaptative se met en place après une première exposition à l'agent pathogène via des réponses spécifiques d'un pathogène donné.

Elle requiert l'activation et la prolifération clonale de lymphocytes B et / ou T exprimant des récepteurs spécifiques d'antigènes exprimés par le pathogène. Ces réponses induisent l'établissement d'une mémoire qui s'active à la première exposition et qui permet à l'hôte de réagir rapidement en cas de nouvelle infection par le même agent pathogène, par réactivation de clones de lymphocytes mémoires B et ou T qui ont été sélectionnés et conservés lors de la première infection. Chez les poissons, la composition du système immunitaire adaptatif est comparable à celle des autres classes de vertébrés gnathostomes: il comprend des lymphocytes T (réponses cellulaires) et B (produisant des immunoglobulines intervenant dans la réponse humorale). Les cellules B et T coopèrent et sont impliquées dans des réponses B T-dépendantes (Miller et al., 1985).

Le **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** est un ensemble complexe génétique qui contient de très nombreux gènes du système immunitaire dont les gènes codant pour deux classes de protéines

exprimées à la surface cellulaire, les CMH-I et le CMH-II (Grimholt et Lie, 1998). Ces deux protéines, qui ont des structures globalement similaires, sont exprimées par des cellules différentes. Le CMH-I, est exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées tandis que le CMH-II est exprimé uniquement par les cellules spécialisées dites présentatrices d'antigènes (comme les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages). Les molécules CMH-I et II exprimées à la surface cellulaire comportent à leur extrémité des peptides provenant de la dégradation de protéines par la cellule; le récepteur de l'antigène des cellules T doit interagir avec les CMH-I et II pour reconnaître ces peptides antigéniques, qu'elles leur "présentent" dans une certaine configuration.

Les **lymphocytes T** comportent différentes classes de cellules qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire cellulaire, ils expriment à leur surface des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement un peptide présenté par le CMH. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) reconnaissent les antigènes présentés par le CMH-I à la surface des cellules infectées, ce qui déclenche leur activation et la destruction des cellules de l'hôte infectées (Thompson, 2017). Les lymphocytes T auxiliaires (CD4) reconnaissent les antigènes présentés par le CMH-II. Une fois activés, ils se divisent rapidement, migrent vers les lymphocytes B pour les aider à produire des anticorps et sécrètent différentes cytokines qui modulent l'activité des autres cellules immunitaires.

La principale fonction des **lymphocytes B** est la production d'anticorps lors de la reconnaissance de leurs antigènes. Ils présentent à leur surface des immunoglobulines (Ig), récepteurs similaires en structure aux anticorps et spécifiques d'un antigène, dont il existe trois classes chez les poissons (IgM, IgD et IgT). Les IgM peuvent être présent aussi bien dans le sang que dans la peau, l'intestin, le mucus des branchies (Morrison et Nowak, 2002). La fonction des IgD reste peu connue chez les poissons, bien qu'il ait été cloné dans différentes espèces de poissons, le sIgD (pour *secreted IgD*) a uniquement été caractérisé dans le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) (Wilson et al., 1997) et la truite (Ramirez-Gomez et al., 2012). En ce qui concerne la fonction des IgT, ils ont été associés, sous forme de polymères aux tissus muqueux, et sous forme de monomère dans le sérum (Zhang et al., 2010). Chez la TAC, il a été mis en évidence que les lymphocytes B présentant des IgM+ et IgT+ sont capables de réaliser une phagocytose et peuvent tuer des bactéries (Zhang et al., 2010).

1.3.3.2. L'immunité innée et adaptative et la réponse des truites arc-en-ciel à *F. psychrophilum*

Chez la TAC, deux études différentes de la réponse immunitaire **précoce** (1 et 5 jours après l'infection) après une infection par injection de *F. psychrophilum* ont été réalisées par transcriptomique. La première a été réalisée sur deux lignées isogéniques homozygotes de l'INRA présentant des niveaux de résistance contrastés (A03^R résistante et B57^S sensible; Langevin et al., 2012). La seconde étude a été réalisée sur une population témoin et deux souches de TAC du NCCCWA (National Center for Cool and Cold Water Aquaculture, Etats-Unis), une résistante et une sensible à *F. psychrophilum* (Marancik et al., 2015). Les deux souches (ARS-Fp-S pour sensible et ARS-Fp-R pour résistante) ont été produites par sélection divergente pour la résistance à *F. psychrophilum* à partir de 2005 (Silverstein et al., 2009).

Ces deux études ont mis en évidence l'importance de la réponse inflammatoire avec une surexpression de gènes pro-inflammatoires chez les TAC issues des lignées sensibles et de gènes codant pour différentes cytokines. Elles soulignent aussi toutes les deux l'importance des effecteurs antibactériens et du système du complément dans la réponse immunitaire innée à *F. psychrophilum*. Ainsi, l'expression de quelques gènes codant pour des protéines du système du complément était induite par l'infection (*C3*, *C9*, *C4-b-like* et *C1q-like*), mais sans différence significative entre ARS-Fp-S et ARS-Fp-R dans l'étude de Marancik et al., (2015) alors que Langevin et al., (2012) indiquent que l'expression d'un gène codant pour le complément C3 est plus induite chez les poissons de la lignée résistante (A03^R) que chez les poissons de la lignée sensible (G17^S). Et donc, on peut soupçonner un rôle particulier du système complément dans les différences individuelles de résistance avec une infection.

Une autre étude réalisée dans d'autres familles de TAC issues du NCCCWA infectées par injection intrapéritonéale avec *F. psychrophilum* (Johnson et al., 2008) a mis en évidence une association suggestive entre des marqueurs microsatellites du CMH-Ib et la survie à l'infection. Les auteurs suggèrent qu'une perte de polymorphisme aux marqueurs du CMH-Ib pourrait être associée à la moins bonne survie à l'infection. Plusieurs études soulignent aussi le rôle des lymphocytes B dans la réponse à une infection expérimentale avec *F. psychrophilum*. Deux études mettent en évidence une différence significative du niveau de maturation des lymphocytes B ainsi que de l'abondance des deux classes d'Ig (IgT et IgM) chez des TAC naïves, issues d'une lignée résistante et d'une lignée sensible après une infection par injection (Zwollo et al., 2015, 2017). Enfin, Marancik et al., (2015) mettent aussi en évidence une légère induction de l'expression des gènes *igm* et *igt* chez les poissons de la lignée ARS-Fp-R et de la lignée contrôle par

rapport aux poissons de la lignée ARS-Fp-S. Ces résultats semblent indiquer que la réponse immunitaire adaptative des truites sensibles (ARS-Fp-S) est plus tardive.

Outre les gènes impliqués dans la réponse immunitaire, différents gènes impliqués dans les processus de réparation tissulaire et de reconstruction après une blessure sont surexprimés chez les poissons infectés par *F. psychrophilum* (Marancik et al., 2015) ce qui est à mettre en relation avec l'importance des lésions nécrotiques induites par l'activité protéolytique de la bactérie lors de l'infection.

Les moyens à disposition des éleveurs pour lutter contre la flavobactériose étant limités et dans un objectif de diminution de l'usage d'antibiotiques, il est important de chercher d'autres solutions pour limiter l'impact économique de cette maladie. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la résistance permettrait d'envisager le développement de nouveaux vaccins plus efficaces. Une information précise sur l'implication de certains gènes dans la réponse immunitaire des TAC à *F. psychrophilum* permettrait d'envisager l'amélioration génétique de la résistance des cheptels par une approche dite de « gène candidat » en étudiant l'association entre le polymorphisme au gène et les variations de résistance. Cependant, la réponse immunitaire des TAC à l'infection est complexe et met en jeu de nombreux mécanismes immunitaires et voies métaboliques et donc semble compromettre l'identification de gènes candidat. D'autres méthodes d'amélioration génétiques (SAM, SG) permettant de tirer profit de la variabilité génétique d'un caractère héritable semblent plus adaptées dans le cas de la flavobactériose. Ces méthodes nécessitent dans un premier temps de définir à la fois les objectifs et les critères de sélection et de pouvoir mesurer correctement ces critères.

1.3.4. Qu'est-ce que la réponse à l'infection ?

La littérature propose de décomposer la réponse d'un hôte à l'infection par un agent pathogène en deux concepts. Ces concepts ont dans un premier temps été proposés en biologie végétale puis étendus à la biologie animale (Råberg et al., 2007, 2009) :

- La résistance, qui est la capacité de l'hôte à limiter l'infection soit directement en empêchant l'agent pathogène de pénétrer dans l'organisme (bloquant les voies d'entrées) soit en l'attaquant et en empêchant sa multiplication voire en s'en débarrassant.
- La tolérance, qui est la capacité de l'hôte à limiter l'impact d'une charge pathogène donnée sur la santé et les performances de l'hôte.

La résistance nécessite une réponse immunitaire adaptée à l'agent pathogène pour l'éliminer, qui impliquerait des gènes codant pour des voies métaboliques. Tandis que la tolérance met plutôt en œuvre des mécanismes de guérison protégeant l'hôte des effets néfastes de l'agent pathogène sans l'impacter directement (Glass, 2012). Plusieurs études réalisées chez les plantes ainsi que quelques études chez les animaux mettent en évidence que la résistance et la tolérance sont faiblement corrélées génétiquement et donc correspondent à deux éléments de réponse indépendants (Revue de Kause et Ødegård, 2012) ou liés par une corrélation génétique négative (Carr et al., 2006 ; Yáñez et al., 2010). On peut ajouter à cette dimension génétique de la différence entre tolérance et résistance une dimension écologique et évolutionniste avec des conséquences sur l'écologie des agents pathogènes. En effet, améliorer la résistance des individus agit négativement sur les pathogènes, ce qui peut avoir comme bénéfice d'éradiquer la maladie mais aussi d'imposer à l'agent pathogène une pression de sélection en faveur de nouveaux facteurs de virulence. En revanche, la tolérance ayant un impact neutre sur l'agent pathogène, son amélioration ne devrait pas modifier l'écologie des populations de pathogènes, ni positivement, ni négativement (Carr et al., 2006 ; Woolhouse et al., 2002). Il est donc important de mieux prendre en compte ces deux dimensions de la réponse de l'hôte à l'infection dans une optique d'amélioration de la santé des cheptels, afin de mieux savoir les mesurer et de décider de la meilleure stratégie d'amélioration génétique sur le long terme.

Si de nombreuses études ont mis en évidence une importante variabilité pour la résistance des poissons à différents agents pathogènes (Gjedrem et Gjedrem, 2015 ; Robinson et al., 2017 ; Yáñez et al., 2014a), peu d'études s'intéressent à la tolérance (Doeschl-Wilson et Kyriazakis, 2012). Ce faible nombre d'étude sur la

tolérance s'explique en partie par la difficulté de mesurer et quantifier la tolérance (Doeschl-Wilson et al., 2012b), au contraire différentes mesures de la résistance existent et sont relativement bien documentées.

1.3.4.1. Mesurer et analyser la résistance

En pratique, différentes mesures phénotypiques sont réalisables, plus ou moins facilement, pour quantifier la résistance globale d'un individu (Figure 17). Ces mesures de la résistance s'éloignent de la définition de résistance proposée par Råberg et al. (2007, 2009) dans le sens où, bien souvent, on n'est pas en mesure de quantifier l'infection de l'hôte par l'agent pathogène.

La première mesure consiste à répondre à la question : « est-ce que l'individu a survécu à l'infection ? ». Cette mesure revient à assimiler la résistance à la **survie**. Ce caractère est en pratique très simple à mesurer, en conditions expérimentales ou pour un éleveur et il est aussi particulièrement intéressant d'un point de vue économique. En génétique animale, on appelle généralement ce premier caractère le **statut** et on l'analyse comme une donnée binaire.

Une seconde mesure vise à mieux distinguer entre eux les individus sensibles (infectés et qui vont en mourir) en leur attribuant une valeur différente en fonction de la vitesse à laquelle ils succombent (Robinson et al., 2017). Dans ce cas, on fait l'hypothèse que l'ensemble des individus est infecté le même jour et on attribue comme valeur phénotypique à un individu sensible sa **date de mort** et on mesure alors **l'endurance**, c'est-à-dire la capacité de l'hôte à combattre l'infection. En tant que telle, l'endurance n'a pas d'intérêt pour les programmes de sélection mais elle permet de mieux caractériser la sensibilité des individus entre ceux qui succombent dès les premiers jours de l'infection et les individus moins sensibles qui succombent plus tardivement. L'endurance est analysée comme une variable gaussienne.

L'information de la cinétique de mortalité, portée par l'endurance n'est pas exploitée lorsqu'on mesure uniquement la survie. En pratique, on utilise souvent le caractère **date de mort** pour quantifier la résistance en donnant à l'ensemble des individus survivants une valeur phénotypique, c'est-à-dire une « fausse date de mort » (souvent la dernière date de mort +1). En génétique animale, on fait l'approximation que cette variable suit une distribution normale, même si dans la pratique on s'en éloigne (Moreno et al., 2005 ; Vallejo et al., 2017b). Cette approximation est nécessaire pour de nombreuses analyses puisque les modèles statistiques développés en génétique animale sont souvent basés sur des variables gaussiennes.

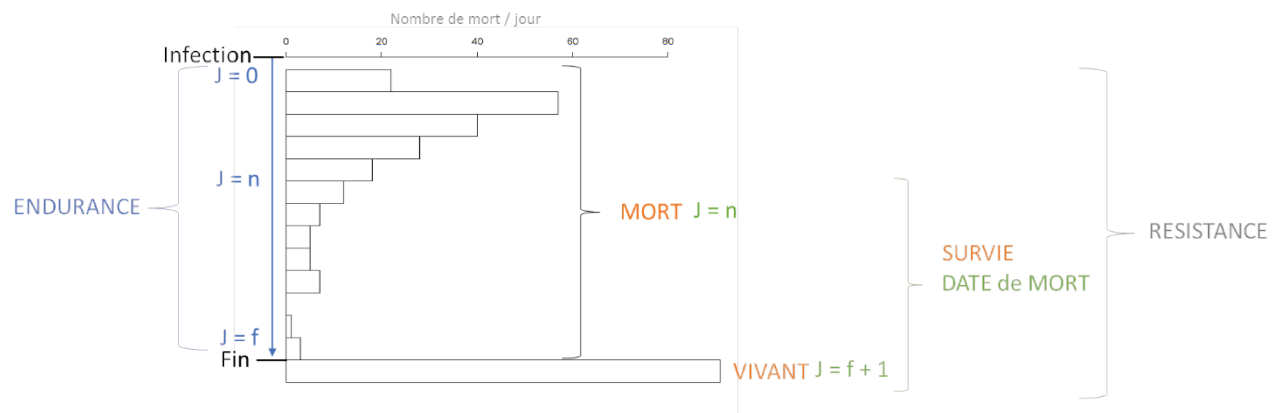


Figure 17. Décomposition de la résistance globale d'un individu à une maladie, un agent pathogène

La résistance globale à un agent pathogène après une infection (à $J = 0$) peut se décomposer en différents caractères: La **SURVIE**, une mesure binaire qui permet de classer les individus selon leur statut c'est-à-dire selon s'ils sont mort ou vivant à la fin de l'épisode de mortalité ($J = f$).

L'ENDURANCE, mesurée en jour et uniquement chez les individus ayant succombés à l'infection, permet de mieux distinguer les individus ayant succombé dès les premiers jours de ceux ayant succombé juste à la fin de l'épisode de mortalité.

La **DATE de MORT (DDM)**, mesurée en jour permet de prendre en compte la cinétique de mortalité avec comme phénotype la date de mort ($J = n$) pour les individus morts et une date de mort arbitraire pour les individus vivants ($J = f + 1$)

La **RESISTANCE** estimée à l'aide d'une analyse de survie et qui permet de combiner les informations de statut et de cinétique de mortalité est la mesure la plus complète de la résistance globale

Différents modèles statistiques ont été développés pour mieux combiner survie et cinétique de mortalité.

Il s'agit de **l'analyse de survie** (encart 3.1) qui utilise des modèles statistiques paramétriques comme le modèle de Weibull (Kalbfleisch et Prentice, 1980) ou semi-paramétriques comme le modèle de Cox (Cox, 1972), permettant de prendre en compte les données censurées pour les individus résistants (l'événement « mortalité » n'est pas observé).

Encart.3.1 Principe de base de l'analyse de survie et le modèle de Cox

L'analyse de survie est l'étude de l'apparition d'un événement au cours du temps dont la probabilité sur un temps infini est de 1. Dans le cas de la résistance à une maladie, cet événement est le décès. Elle permet de tenir compte des données de l'ensemble des individus, ceux qui meurent pendant l'expérience mais aussi tous ceux qui n'atteignent pas l'événement avant la fin de l'expérience, c'est-à-dire les survivants. On parle de **données censurées**

L'analyse de survie utilise une fonction de survie : $S(t) = P(T > t)$, $t \geq 0$ soit la probabilité que la durée de survie (T) dépasse un temps t fixé.

Le risque instantané ($\lambda(t)$) est, pour t fixé, la probabilité pour un individu de mourir dans un petit intervalle de temps après t sachant qu'il a survécu jusqu'à t :

$$\lambda(t) = \lim_{h \rightarrow 0} \left(\frac{P(T < t + h \mid T \geq t)}{h} \right)$$

Pour estimer le risque instantané il existe plusieurs méthodes, non-paramétriques (Kaplan-Meier), semi-paramétriques (Cox) ou paramétriques (Weibull).

Le modèle de Cox est largement utilisé en analyses de survies car il permet d'évaluer l'effet de covariables sur la durée de vie, on dit que c'est un modèle à hasards proportionnels.

Dans ce modèle, la fonction de hasard est commune à tous les individus :

$$\lambda(t \mid Z) = \lambda_0(t) \exp(\beta'Z)$$

Avec $\lambda_0(t)$ une fonction inconnue de t qui exprime le risque de base, $\beta'Z$ l'effet des covariables (avec Z un vecteur de covariables et β un vecteur de coefficient de régression).

On parle de **modèle à risques proportionnels** car pour deux populations a et b, le rapport des fonctions de hasard est constant au cours du temps :

$$\frac{\lambda(t \mid Z_a)}{\lambda(t \mid Z_b)} = \frac{\exp(\beta'Z_a)}{\exp(\beta'Z_b)}$$

Les fonctions de hasard sont donc proportionnelles et ce rapport des fonctions de hasard est appelé **risque relatif** (*Hazard ratio* en anglais. Si ce risque relatif est supérieur à 1 le risque de décès est plus important dans la population a que b (et inversement).

En fonction du protocole infectieux, on peut parfois difficilement affirmer que l'hôte a bien été infecté (cas de la balnéation, voir § 1.3.4.3) On ne fait donc généralement pas la distinction, au sein des individus résistants (qui survivent) entre les individus qui se sont laissés envahir par l'agent pathogène et ceux qui ont empêché l'infection. Pour mieux caractériser ces individus et donc raffiner la mesure de la résistance, on peut mesurer la **charge en agents pathogènes** d'un individu pendant ou après l'infection.

Pour certains agents pathogènes, cette charge est facilement accessible, c'est par exemple le cas du pou de mer (*Caligus lepeophtheirus*) qui affecte certains saumons et pour lequel il est possible de compter le nombre de poux à la surface d'un poisson. C'est aussi le cas de maladies dont les signes cliniques comme des lésions ou ulcères cutanés peuvent être dénombrés, par exemple l'infection du turbot (*Scophthalmus maximus*) par le parasite *Philasterides dicentrarchi*. En dehors de ces quels cas, la charge bactérienne ou virale dans les organes et/ou tissus infectés (le sérum, la rate, le mucus...) est réalisée de façon indirecte (détection (quantification) par (q)PCR, étalement, ...). Cependant, ce type de mesures est invasif (prélèvement de sang sur poissons assez grands, euthanasie pour prélèvements de tissus internes). En pratique, la mesure de la charge en agents pathogènes est réservée aux études expérimentales visant une description fine de l'infection.

1.3.4.2. Mesurer et analyser la tolérance et la résilience

La tolérance est encore plus complexe à mesurer que la résistance puisque selon la définition de Råberg et al. (2007, 2009), elle mesure la capacité de l'hôte à limiter les dommages provoqués par une charge en pathogène donnée. En pratique, la mesure de ces dommages est difficile.

En effet, la mesure individuelle de la tolérance nécessite des mesures répétées des performances individuelles pour différentes charges infectieuses (Simms, 2000), la tolérance est ensuite définie comme la pente de la régression des performances en fonction de la charge (Figure 18). En pratique, pour certains agents pathogènes et certaines méthodes d'infections, la charge en pathogène est difficile voire impossible à contrôler ou mesurer sur des individus vivants. Plusieurs études estiment donc la tolérance en moyenne dans un groupe d'hôte (Doeschl-Wilson et al., 2012b ; Kause et Ødegård, 2012). D'autres études font l'approximation que la tolérance peut être mesurée comme la différence de performance entre les individus infectés et les individus sains, cette mesure peut-elle être réalisée au niveau individuel ou d'un groupe (Carr et al., 2006 ; Fineblum et Rausher, 1995). Cette mesure individuelle de la tolérance permet de prendre en compte la variabilité individuelle pour éventuellement sélectionner ce caractère. Cependant, Doeschl-Wilson et al. (2012b) ont montré par des simulations que, sans connaissance précise

de la charge individuelle au moment de la mesure des performances, ce n'est plus la tolérance mais la résilience que l'on approxime.

La résilience est définie comme la capacité d'un hôte à maintenir un bon niveau de performance pendant un épisode infectieux (Albers et Gray, 1987). En pratique, dans le monde animal, la tolérance et la résilience sont souvent confondues (Bisset et al., 1996 ; Riffkin et Dobson, 1979 ; Yáñez et al., 2010).

Performance individuelle = croissance

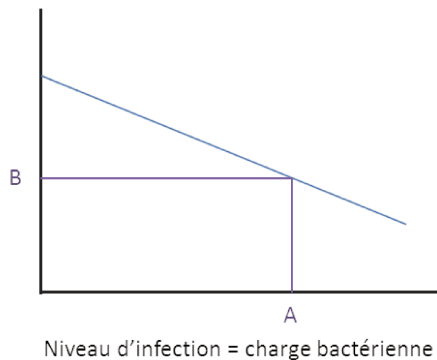


Figure 18. Définition des concepts de tolérance et résilience comme utilisé dans cette thèse

La tolérance est définie comme la pente de la régression entre les performances individuelles et la charge bactérienne individuelle.

La résilience est définie comme la performance individuelle (mesurée au point B) pour une certaine infection (mesurée au point A)

Dans le cas de nombreuses espèces animales (mais aussi végétales), comme le poids est facile à mesurer, la performance utilisée pour évaluer la tolérance et la résilience est la croissance (ou l'absence de croissance, voire la perte de poids).

1.3.4.3. Déclencher l'infection : les infections expérimentales et les épisodes de mortalité naturels

Pour mesurer les différents caractères de réponse à l'infection, il faut commencer par réussir à infecter les individus, si possible à l'aide de protocoles reproductibles. Dans le cadre de l'analyse génétique d'un caractère et des programmes de sélection, il est important de pouvoir infecter un grand nombre d'individus simultanément pour limiter les effets d'environnement. Pour les poissons, on peut réaliser différents types d'infections expérimentales, ou tirer profit d'un épisode naturel de mortalité.

1.3.4.3.1. Les différentes méthodes d'infection expérimentales en condition contrôlées

La reproductibilité et le fait de pouvoir contrôler un certain nombre de paramètres environnementaux avant et pendant l'infection sont les principaux avantages de l'infection induite expérimentalement. Dans une certaine mesure, elle permet aussi de maîtriser la sévérité de l'infection en contrôlant la dose infectieuse appliquée ou la virulence du pathogène par le choix de la souche. Pour cela, la DL50 d'un pathogène (d'une souche) qui correspond à la dose nécessaire pour tuer 50% des individus est estimée au préalable. Les trois principales méthodes d'infections utilisées en aquaculture sont l'injection, la balnéation et la cohabitation.

Une solution contenant l'agent pathogène peut être administrée par une **injection** intramusculaire ou intra-péritonéale. Cette méthode est, théoriquement, la plus facile à standardiser. La dose injectée est contrôlée. Le moment précis de l'infection est connu et c'est la seule méthode qui permet d'infecter avec certitude tous les poissons. Comme l'agent pathogène est introduit directement dans l'hôte, cette méthode court-circuite les premières lignes de défense de l'hôte (la peau, le mucus, les écailles...). L'injection ne peut être réalisée que sur des poissons préalablement anesthésiés. Cependant, l'anesthésie et la manipulation des individus peuvent avoir des effets collatéraux sur la survie qui ne peuvent pas être distingués des effets de l'infection.

Pour la **balnéation**, aussi appelée **immersion**, on met l'agent pathogène en contact avec l'hôte via leur environnement commun : l'eau. Pour ce faire, on verse une solution contenant l'agent pathogène dans l'eau d'un aquarium contenant les hôtes à infecter. Les paramètres de balnéation varient selon le couple hôte/pathogène comme la durée de la balnéation, la température de l'eau, l'oxygénation. L'infection par balnéation est plus proche de l'infection naturelle que l'injection. Elle stimule l'ensemble des lignes de défense habituelles de l'hôte. Elle permet donc de mieux prendre en compte l'ensemble des mécanismes, externes et internes, de défense de l'hôte. Si on maîtrise la culture du pathogène (pour des volumes souvent très supérieurs à ceux requis par l'injection), la balnéation est relativement facile à standardiser et elle ne nécessite pas d'anesthésie. Avec la balnéation, on peut exploiter la capacité de l'hôte à bloquer l'infection, qui est une des composantes de la résistance. Pour assurer un contact suffisamment long entre l'agent pathogène et l'hôte, et donc donner la possibilité à l'agent pathogène d'infecter l'hôte, il faut une grande quantité d'inoculum et donc produire l'agent pathogène en grande quantité. Ce qui, pour certains agents pathogènes, peut être limitant. Contrairement à l'injection chez les poissons, la balnéation ne nécessite pas d'anesthésie, mais est généralement associée à un stress de confinement pendant la période

de contact avec l'agent infection. Enfin, si la balnéation est supposée mimer l'infection naturelle, l'infection n'est généralement déclenchée qu'avec une exposition à des concentrations massives d'agents pathogènes, non représentatives de ce qui se passe en conditions naturelles.

La **cohabitation** se réalise en deux temps : un petit groupe de poissons dit « réceptacles » est infecté, généralement par injection, puis, placés en contact (dans le même bassin, ou en amont de l'arrivée d'eau) avec les poissons sains étudiés. Cette méthode mime la séquence des événements lors d'épisode infectieux spontané avec quelques poissons malades qui libèrent et transmettent l'agent pathogène. Comme la balnéation, elle stimule l'ensemble des mécanismes de défense de l'hôte. Elle peut aussi permettre, dans certaines conditions particulières, de mesurer la capacité des poissons réceptacles à libérer l'agent pathogène et à infecter leurs congénères. Elle ne nécessite que l'injection d'un petit nombre de poissons, et donc est relativement peu coûteuse en temps de préparation et en quantité d'inoculum. Elle nécessite une étape supplémentaire afin de choisir des individus réceptacles suffisamment réceptifs pour pouvoir infecter les autres individus.

Balnéation ou cohabitation ne permettent pas de savoir si un poisson survit parce qu'il ne s'est pas laissé infecté par l'agent pathogène ou parce qu'il a résisté à l'infection après s'être laissé envahir. Ce type d'infection ne permet pas non plus de connaître la dose infectieuse individuelle ni le moment de l'infection (limitant pour mesurer l'endurance). Une simulation a montré qu'une faible mortalité (moins de 50%) induisait une estimation erronée de l'héritabilité, paramètre crucial pour les analyses génétiques, de la résistance puisqu'une partie des individus n'étaient sans doute pas infectés (Bishop et Woolliams, 2010). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres analyses (voire revue de Robinson et al., 2017), par exemple, si on mesure la résistance comme un caractère binaire (statut), la meilleure précision de l'héritabilité est obtenue pour une mortalité entre 30% et 70% (Vandeputte et al., 2009b dans Robinson et al., 2017).

1.3.4.3.2. Utiliser les épisodes de mortalité naturelle

De nombreux épisodes de mortalités se produisant spontanément dans les élevages, il peut être intéressant d'essayer d'en tirer parti pour mesurer la réponse à l'infection. Dans ce cas, pour profiter pleinement d'un épisode infectieux *in campo*, il faut simplement pouvoir enregistrer la mortalité de façon quotidienne (ou biquotidienne pour plus de rigueur) pour recueillir les phénotypes « statut » et « date de mort ». Il faut aussi s'assurer de la présence de l'agent pathogène, pour confirmer l'origine de l'infection.

De très nombreux paramètres difficilement contrôlable en situation d'infection naturelle (température et qualité de l'eau, historique d'élevage, épisodes infectieux antérieurs...) peuvent influencer la réponse à

l'infection. De plus, le travail en milieu non contrôlé expose à des situations d'infections intercurrentes avec co-infection par plusieurs agents pathogènes, voire par plusieurs souches d'un même pathogène (Bernardet, communication personnelle). Il est aussi impossible de contrôler la sévérité de l'épisode puisque la virulence de l'agent pathogène n'est pas connue *a priori*. Ainsi, on peut avoir des épisodes infectieux avec une mortalité très limitée ou au contraire très importante et non exploitables (Morin et al., 2016). Dans un lot de candidats à la sélection, on sera tenté de contrôler la maladie en administrant un traitement et donc de biaiser la mesure de la résistance. Enfin, comme pour l'infection par balnéation et cohabitation, on ne distingue pas les individus qui ont réellement été infectés de ceux qui ne l'ont pas été. La mesure de la réponse à l'infection est donc moins fine et il est impossible, pour des raisons pratiques, de mesurer la tolérance.

En pratique aujourd'hui, les éleveurs souhaitant améliorer la résistance à un pathogène font appel à une structure spécialisée qui réalise une infection expérimentale contrôlée sur un certain nombre de collatéraux des candidats. Ainsi, des infections expérimentales sur le bar, la daurade et la TAC pour cinq pathogènes différents sont réalisées dans le cadre de programmes de sélection et de programmes de recherche à « FORTIOR Genetics », une structure conjointe entre l'ANSES et le SYSAAF (Morin et al., 2016) (Finistère, France). Dans le cas de la flavobactériose, seul l'INRA maîtrise les infections expérimentales qui pour le moment sont uniquement réalisées dans le cadre d'études expérimentales.

1.3.4.3.3. Les infections expérimentales avec *Flavobacterium psychrophilum*

La principale difficulté dans la mise en place de protocoles infectieux avec *F. psychrophilum* réside dans la maîtrise de la culture de la bactérie. Comme indiqué dans le paragraphe 1.3.1.2, *F. psychrophilum* est plutôt fastidieuse à cultiver en grande quantité, et sa virulence a tendance à diminuer légèrement avec le temps selon les méthodes de conservations. Plusieurs infections expérimentales par injection intrapéritonéale (IP) de *F. psychrophilum* ou cohabitation avec des poissons scarifiés ont été menées chez le saumon coho par Borg dès 1948 (Borg, 1948 dans Madsen et Dalsgaard, 1999). Cependant, les expériences n'étaient pas reproductibles. Différentes méthodes ont aussi été testées chez la TAC, comme l'injection IP, intramusculaire (IM) ou sous-cutanée ou encore la balnéation dans une suspension de bactérie (Holt, 1988; Rangdale, 1995) dans (Madsen et Dalsgaard, 1999). Là encore, ces méthodes n'étaient souvent pas reproductibles et difficiles à mettre en œuvre. Madsen et Dalsgaard (1999) ont comparé différentes méthodes d'infection : l'injection IP, la balnéation, la balnéation avec des poissons ayant été stressés par

un traitement à base de formaline et la cohabitation. L'injection IP donne les meilleurs résultats avec une mortalité plus importante (60 - 70%) en fonction de la virulence de la souche utilisée. La balnéation se révèle difficilement reproductible avec des mortalités plus faibles (30%) pour les poissons non stressés que pour les poissons stressés (40 - 60%). Enfin, la cohabitation s'est révélée inefficace pour faire mourir les poissons (10% de mortalité). Les auteurs concluent donc leur étude en recommandant d'utiliser l'injection IP pour des infections expérimentales reproductibles et permettant d'obtenir une mortalité contrôlée, en fonction de la virulence de la souche employée. Parallèlement, en France, Garcia et al., (2000) proposent une méthode standardisée d'infection par injection IM, plus efficace que l'IP. La sévérité de l'infection pouvant être contrôlée en calculant la DL50 avec différentes concentrations de solution. Ils soulignent aussi les problèmes de reproductibilité des infections par balnéation pendant 1h sur des poissons stressés (scarifiés) en partie à cause de la forte sensibilité de la bactérie à la qualité de l'eau et de la difficulté de culture de la bactérie. Ainsi, la majorité des infections expérimentales avec *F. psychrophilum* ont été menées via des protocoles utilisant l'injection IM ou IP. Cependant, un protocole d'infection par balnéation a été mis au point au sein d'un laboratoire de l'équipe de Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM) à l'INRA de Jouy-en-Josas. Ce protocole, standardisé et reproductible, a été utilisé dans le cadre de cette thèse pour une partie des infections expérimentales.

1.3.4.4. Approche QTL de l'architecture génétique d'un caractère

Une fois les caractères d'intérêt définis et mesurés, plusieurs méthodes permettent d'étudier leurs bases génétiques. La première approche de la génétique d'un caractère d'intérêt consiste à estimer les paramètres génétiques tels que l'héritabilité pour prédire les valeurs génétiques des individus à partir du modèle décrit en encart 2.2. Estimer l'héritabilité du caractère est primordiale dans le cadre de programmes de sélection car cela permet de savoir si la sélection sera possible ou non. Les valeurs génétiques prédites servent à classer les candidats à la sélection afin de ne conserver que les meilleurs comme parents de la génération suivante. Une deuxième approche consiste à préciser l'architecture génétique d'un caractère en identifiant les polymorphismes génétiques associés à une variation d'expression phénotypique du caractère par une cartographie des QTL (QTL pour Quantitative Trait Loci). Cette approche ne nécessite pas de connaissances *a priori* sur l'architecture du caractère et explore l'ensemble du génome en testant l'association entre le polymorphisme de marqueurs moléculaires et la variation du phénotype. On localise ainsi une ou des régions du génome (QTL) contenant les mutations responsables de la variation phénotypique observée. Le principe de base de l'analyse QTL est la détection d'une association statistique entre les allèles aux marqueurs et le phénotype mesuré. Il existe plusieurs méthodes de détection des QTL qui se basent sur l'analyse de liaison (LA) dans un dispositif familial, l'analyse d'association (LDA) dans une population ou encore une combinaison des deux analyses (LD-LA). On ne détaillera ici que les méthodes utilisées dans le cadre de cette thèse.

1.3.4.4.1. La détection de QTL par analyse de liaison : la cartographie d'intervalle

L'analyse de liaison (LA) est utilisée dans un dispositif familial simple, de pleins frères-sœurs ou de demi-germains lorsqu'une carte génétique est disponible. Elle permet d'estimer l'effet des allèles aux marqueurs transmis par les ascendants sur les performances des descendants (Figure 19). L'hypothèse sous-jacente est que, s'il existe une différence de performances entre les groupes de descendants selon l'allèle porté au marqueur, elle s'explique par la ségrégation des allèles d'un QTL lié au marqueur. Sous l'hypothèse nulle H_0 « absence de QTL », la valeur moyenne de la performance d'un groupe est indépendante de l'allèle au marqueur. La détection d'un QTL consiste donc à tester la différence de performances moyennes des descendants selon l'allèle au marqueur transmis par leurs ascendants. Quand on utilise un dispositif familial simplifié, comme des familles HD, on compare les moyennes entre deux classes à l'aide d'un test de Student. Dans les cas de dispositifs plus complexes, on utilise des modèles de régression linéaire.

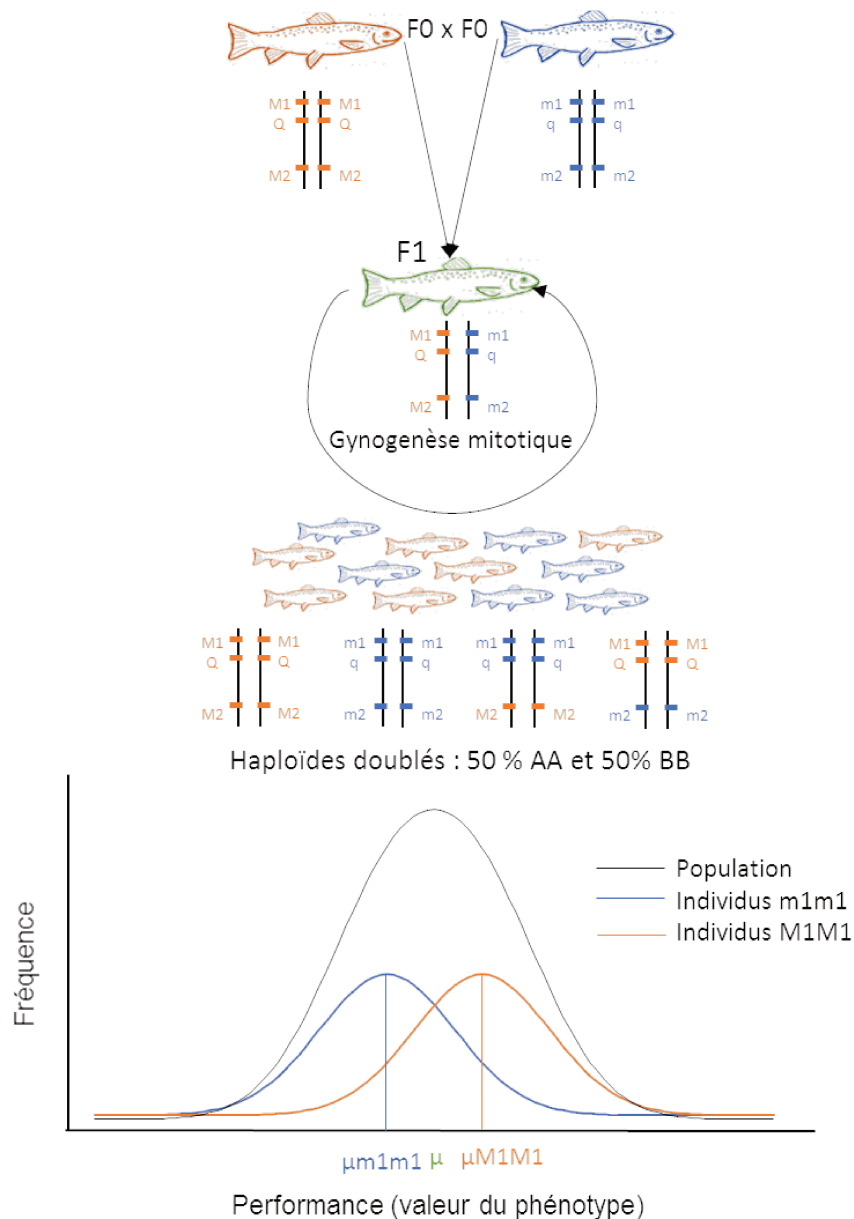


Figure 19. Principe de détection des QTL par analyse de liaison dans un dispositif simplifié composé d'individus haploïdes doublés (HD)

On suppose un QTL unique (avec deux allèles : Q et q) pour un caractère mesuré, en déséquilibre de liaison avec un marqueur (aux allèles M1 et m1) dans une population initiale. Des individus F0, HD (M1M1 et m1m1) issus de lignées isogéniques dont les performances sont connues et contrastées sont croisés pour obtenir une génération F1(M1m1). Un individu de la F1 est reproduit par gynogenèse mitotique pour obtenir une population HD. Les allèles des grands-parents F0 sont en ségrégation parmi les individus HD. Les performances de la population sont mesurées et confrontées aux allèles des différents marqueurs du génome. Les moyennes des performances en fonction des allèles au marqueur (μ_{M1M1} et μ_{m1m1}) sont comparées par un test de Student qui permet de conclure ou non à la présence d'un QTL proche du marqueur selon : $H_0 = \{\mu_{M1M1} = \mu_{m1m1}\}$ vs $H_1 = \{\mu_{M1M1} \neq \mu_{m1m1}\}$

La cartographie d'intervalle (Lander et Botstein, 1989) est une méthode de détection de QTL par analyse de liaison qui consiste à tester en différents points régulièrement espacés l'hypothèse H1 « présence d'un QTL » contre l'hypothèse H0 « absence de QTL » sur un segment du génome, c'est-à-dire dans un intervalle entre deux marqueurs flanquant la position testée. Cet intervalle peut être un groupe de liaison, un chromosome ou encore l'ensemble du génome (Figure 20) (Elsen et al., 1999 ; Knott et al., 1996). Cette méthode a été implémentée dans le logiciel QTLMap (Filangi et al., 2010) développé à l'INRA. Ce logiciel permet la détection de QTL associés à des caractères dont la distribution est normale ou non : caractères discrets ou données censurées pour faire une analyse de survie (Moreno et al., 2005) en utilisant le modèle de Cox (voir encart 3.1).

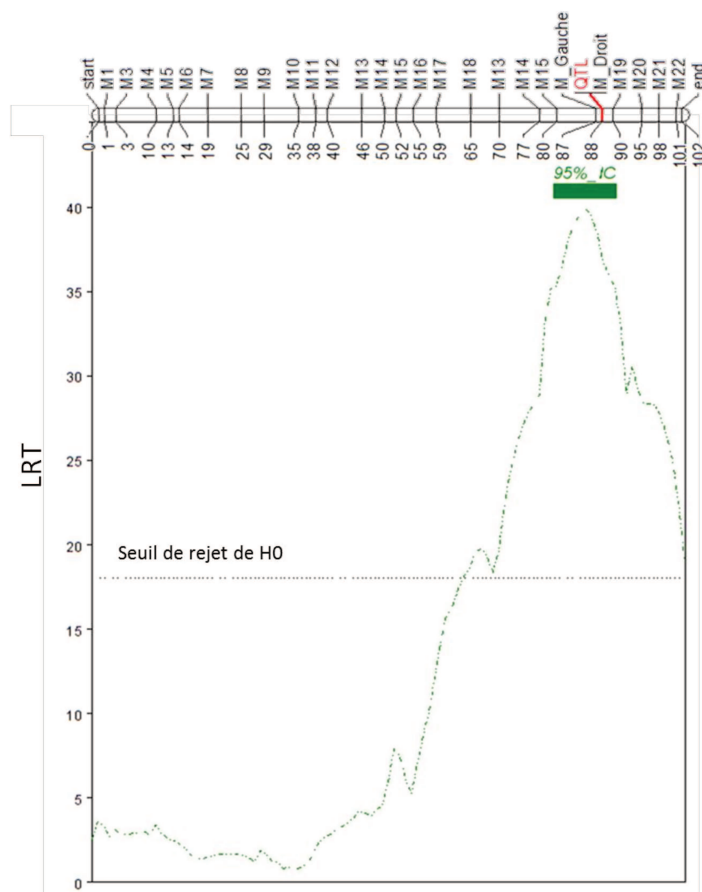


Figure 20. Principe de la cartographie par intervalle pour détecter des QTL

En des points régulièrement espacés sur le chromosome (tous les 1cM) on calcule :

- La vraisemblance de l'existence d'un QTL
- Le rapport des vraisemblances (LRT *Likelihood Ratio Test*) :

$$LRT(q) = -2\ln(\text{vraisemblance de } H_0 / \text{vraisemblance de } H_1 \text{ en } q)$$

On détermine le seuil de rejet de l'hypothèse H0 par simulation ou permutation (QTLMap).

Les marqueurs flanquant le QTL (M_Gauche et M_Droit) sont utilisés pour inférer le génotype au QTL en calculant la probabilité du génotype de l'individu au QTL, en connaissant les allèles aux marqueurs sur la carte génétique.

Pour tester l'hypothèse de l'existence d'un QTL, on utilise une méthode basée sur la fonction de vraisemblance en faisant un rapport de vraisemblance (LRT pour *Likelihood Ratio Test*) en tout point de l'intervalle (Le Roy et al., 1998). On obtient alors un profil de vraisemblance qui décrit le LRT obtenu pour toutes les positions testées (Figure 20). Dans QTLMap, le seuil de rejet est déterminé par plusieurs simulations ou permutations successives (Voir § 3.1.1.1 et 3.1.2.1).

La cartographie par intervalle qui utilise les marqueurs flanquant d'un QTL est considérée comme relativement robuste (erreur de type I faible) et peu sensibles au non-respect de la normalité de la distribution (Knott et Haley, 1992). La puissance de détection du QTL dépendrait principalement de l'effet du QTL et de l'effectif de la population utilisée et non pas de la densité de marqueurs selon une simulation de Darvasi et al., (1993). Dans leur étude, pour un effectif et un effet du gène donné, la puissance de détection d'un QTL était identique entre un nombre infini de marqueurs et une densité de un marqueur tous les 10 cM. En revanche, doubler l'effectif de la population permettait de réduire de moitié la taille de l'intervalle de confiance de la position du QTL ainsi que d'augmenter significativement la puissance de détection du QTL. Dans le cas d'une famille HD, l'absence d'hétérozygotes dans la descendance augmente fortement la puissance du test statistique (test de Student) puisque l'effet du QTL estimé est le double de l'effet de substitution alléliques (Falconer et Mackay, 1996), ce qui, en théorie au moins, permet d'utiliser des dispositifs avec moins de poissons pour détecter des QTL (Martinez et al., 2002)

La localisation des QTL est peu précise, les intervalles de confiance à 95% sont très larges, souvent plusieurs dizaines de Mb et peuvent couvrir l'ensemble d'un chromosome (Darvasi et al., 1993). En effet, on utilise la transmission de fragments chromosomiques entre grands-parents et descendants, le nombre de recombinaisons est donc limité et les fragments de grande taille. Afin d'affiner le plus possible la cartographie des QTL on peut utiliser des familles de grande taille avec de nombreux descendants. On augmente ainsi mécaniquement la probabilité de recombinaisons entre les marqueurs, ce qui permet de d'avoir des cartes génétiques plus fines (Darvasi et Soller, 1997). Augmenter l'effectif permet aussi d'augmenter la puissance des t-test. La taille importante des intervalles de confiance obtenus par analyse de liaison rend quasiment impossible la recherche de gènes candidats puisque des centaines de gènes peuvent se trouver dans ces zones.

1.3.4.4.2. La détection de QTL par analyse d'association

Lorsque l'on possède un très grand nombre de marqueurs permettant de couvrir l'ensemble du génome, comme les SNP, on peut détecter les QTL par **analyse d'association (LDA)** qui exploite le déséquilibre de liaison dans une population pour estimer l'effet du génotype aux marqueurs sur le caractère.

Le principe de base de l'analyse d'association repose sur l'étude du **déséquilibre de liaison (DL)** qui mesure l'association préférentielle entre les allèles de deux locus dans une population d'individus supposés non apparentés. Plus les loci sont proches et plus les allèles seront transmis ensemble, on dit dans ce cas qu'ils sont en déséquilibre de liaison. A l'inverse, deux loci éloignés transmis de façon indépendante sont en équilibre de liaison. La détection de QTL par LDA fait l'hypothèse que le QTL et un marqueur (ou un groupe de marqueurs) sont en déséquilibre de liaison et donc que la variation de performance observée dans une population est statistiquement liée à la variation de fréquence allélique au marqueur. Lorsque l'analyse d'association est effectuée avec des marqueurs couvrant l'ensemble du génome, on parle de GWAS pour *Genome Wide Association Study*. Plusieurs modèles statistiques ont été développés afin d'estimer les effets des SNP individuellement ou par bloc haplotypique (Meuwissen et Goddard, 2000).

L'avantage principal de l'analyse d'association est qu'elle permet de détecter des QTL dans une population complexe sans avoir besoin de produire des croisements expérimentaux spécifiques ni d'utiliser des familles. L'échantillonnage au sein de la population est simple et la cartographie des QTL est aussi plus précise qu'avec l'analyse de liaison.

En raison du grand nombre de tests multiples réalisés, liés à la densité des marqueurs, de nombreux faux-positifs sont attendus. En génétique animale, les données dont on dispose sont souvent issues de populations contenant un grand nombre d'individus apparentés. La structure de la population peut aussi être la cause de nombreux faux-positifs lorsqu'elle n'est pas prise en compte dans le modèle par un effet aléatoire polygénique. L'association génotype au marqueur-génotype au gène qui agit sur le caractère change au cours des générations à cause des recombinaisons, créant de nouveaux haplotypes et des effets différents des marqueurs sur le caractère. Il peut aussi exister un DL entre des locus éloignés des mutations causales qui amène à déclarer des associations significatives pour des marqueurs très éloignés des QTL. Ainsi, dans les populations de TAC françaises, le DL s'étend sur de longues distances (> 1Mb) (D'Ambrosio et al., in prep), ce qui ne permet pas de localiser précisément un QTL.

Différents modèles statistiques ont été proposés pour prendre en compte la structure de la population dans les analyses d'association en les combinant avec les analyses de liaison.

1.3.5. L'approche LD-LA

Une approche combinant l'analyse d'association et l'analyse liaison (LD-LA) permet de prendre en compte la structure de la population et de bénéficier des intérêts des deux approches. L'avantage est de combiner la robustesse de l'approche LA, qui permet de suivre la ségrégation des allèles aux marqueurs et aux QTL intra-famille, et l'approche LD, qui corrèle le génotype aux marqueurs aux phénotypes observés entre familles, permettant de conserver la précision de la localisation des QTL. Différents modèles ont été proposés pour la détection de QTL à partir des modèles utilisés pour l'évaluation génétique des individus à l'aide d'approches LD-LA.

Meuwissen et al., (2002) proposent une première méthode qui combine LA et LD en considérant des haplotypes de marqueurs avec le modèle d'analyse suivant :

$$y = \mu + X\beta + Z_h h + Zu + \varepsilon$$

Avec y le vecteur des performances, μ la moyenne, β le vecteur des effets fixes et X la matrice d'incidence des effets fixes et $\varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$, le vecteur des résidus. Z est la matrice d'incidence qui relie les animaux aux phénotypes avec $u \sim N(0, A\sigma_u^2)$ le vecteur des effets polygéniques, Z_h la matrice d'incidence qui relie les haplotypes aux phénotypes et enfin $h \sim N(0, H\sigma_h^2)$ le vecteur des effets haplotypiques. La matrice A est la matrice d'apparentement entre les individus, calculée à partir du pedigree et la matrice H est la matrice de variance-covariance entre haplotypes qui prend en compte le DL.

Le modèle GBLUP (Genomic BLUP, (Henderson, 1963, 1973) est un modèle multi-marqueurs qui permet d'estimer simultanément les effets de l'ensemble marqueurs à l'aide une matrice de parenté génomique (G) (VanRaden, 2008) :

$$y = \mu + X\beta + Zg + \varepsilon$$

avec y le vecteur des performances, μ la moyenne, β le vecteur des effets fixes, g un vecteur des effets des marqueurs, supposés aléatoires avec $g \sim N(0, G\sigma_g^2)$, Z la matrice d'incidence des génotypes (codés 0,

1 ou 2) et $\varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$, le vecteur des résidus. La matrice G, construite à partir de l'ensemble des marqueurs permet de prendre en compte la structure de la population.

On peut augmenter la précision et la puissance de détection (H. Wang et al., 2012 b) par une analyse avec un modèle ssGBLUP (single-step GBLUP) incluant des individus phénotypés, non génotypés, mais apparentés aux individus génotypés. Le ssGBLUP utilise le même modèle que le GBLUP mais on remplace la matrice G par une matrice de parenté mixte qui combine la matrice G et la matrice A (Aguilar et al., 2010).

Ces méthodes LD-LA sont plus robustes que les approches LDA dans le cas de populations structurées.

Il existe donc plusieurs méthodes statistiques qui permettent de détecter des QTL associés à une performance dans des familles (LA) ou des populations peu structurée (LD) ou très structurées en familles (LD-LA). Ces différentes méthodes permettent d'avoir une vision plus ou moins fine de l'architecture génétique des caractères. Avant l'avènement des nouvelles technologies de génotypage permettant d'obtenir des dizaines (voire des centaines) de milliers de marqueurs SNP, les méthodes LA étaient très utiles dans des dispositifs familiaux simples. En raison de l'arrivée des puces de génotypage à moyenne et haute densités, associée à l'essor de la sélection génomique qui permet d'obtenir les phénotypes et génotypes de nombreux individus dans des populations structurées en familles, les méthodes LD-LA semblent les plus intéressantes à mettre en œuvre actuellement pour l'étude de caractères complexes (Legarra et Fernando, 2009).

Chez la TAC, de nombreux QTL associés à la résistance à différentes maladies ont ainsi été identifiés. Certaines de ces maladies ont un déterminisme quasi-monogénique avec un QTL majeur qui explique plus de la moitié de la variance phénotypique du caractère. C'est par exemple le cas de la résistance à la septicémie hémorragique virale (Verrier et al., 2013) avec un QTL qui explique entre 49% et 65% de variance phénotypique ou encore la résistance au pathogène *Myxobolus cerebralis* (Baerwald et al., 2011) avec un seul QTL expliquant entre 50% et 86% de variance phénotypique. D'autres maladies ont plutôt une structure oligogénique avec quelques QTL majeurs impliqués, comme la résistance à la NPI (Ozaki et al., 2001) avec deux QTL expliquant entre 27% et 34% de variance phénotypique. Enfin, pour d'autres maladies, la résistance est polygénique car elle est expliquée par un grand nombre de QTL ; c'est par exemple le cas de la nécrose hématopoïétique infectieuse (Palti et al., 1999 ; Khoo et al., 2004 ; Rodriguez et al., 2004).

Conclusion partie 1.3

La flavobactériose d'eau froide est une maladie bactérienne qui touche l'ensemble des salmonidés élevés en eau douce. Elle est responsable chaque année d'importantes pertes économiques à cause de la forte mortalité et des malformations qui peuvent persister chez les survivants en raison de l'activité protéolytique de son agent pathogène *F. psychrophilum*. Les principaux facteurs de virulence de cette bactérie sont sa capacité à adhérer aux surfaces muqueuses de son hôte et son activité protéolytique. Plusieurs études ont mis en évidence une diversité génétique modérée de la bactérie avec la prédominance de quelques complexes-clonaux, souvent associés à une espèce hôte. L'ensemble des mécanismes immunitaires de la réponse à l'infection chez la TAC ne sont pas encore entièrement connus, mais *F. psychrophilum* déclenche une forte réponse inflammatoire qui mobilise de nombreuses voies métaboliques impliquées dans l'immunité innée et adaptative.

L'analyse génétique de la réponse à l'infection des TAC par *F. psychrophilum* nécessite, dans un premier temps de définir les différentes composantes de cette réponse et d'identifier des méthodes de mesures et quantification de ces différents composants. En pratique, il est parfois difficile voire impossible de mesurer la variabilité individuelle de la résistance et de la tolérance comme défini dans la littérature. Le développement de protocoles standardisés permettant une infection expérimentale avec *F. psychrophilum* permet, aujourd'hui, de mesurer différents caractères de résistance et d'approximer la tolérance chez la TAC. Enfin, différentes méthodes de détection de QTL permettent de tirer pleinement profit de ces phénotypes précis pour mieux appréhender l'architecture génétique complexe de la réponse des TAC à une infection par *F. psychrophilum*.

« TAKE HOME MESSAGE 3 »

- *Flavobacterium psychrophilum* est une bactérie particulièrement virulente pour différentes espèces de salmonidés. Les moyens de prévention et de lutte contre cet agent pathogène sont aujourd'hui limités.
- Les deux composantes de la réponse d'un hôte à l'infection par un agent pathogène, la résistance et la tolérance/résilience sont importantes à prendre en considération.
- Différentes méthodes d'infections des TAC avec *F. psychrophilum* sont possibles. Elles ne permettent pas tout à fait de mesurer les mêmes caractères de résistance ou de tolérance et peuvent stimuler différentes réponses immunitaires selon si l'agent pathogène est injecté directement dans l'hôte ou s'il doit d'abord contourner ses défenses externes.
- Différentes méthodes de détection de Quantitative Trait Loci (QTL) permettent de mieux appréhender l'architecture génétique d'un caractère complexe.
 - L'analyse de liaison (LA), dans des dispositifs structurés en familles, estime l'effet des allèles aux marqueurs transmis par les ascendants sur les performances des descendants. Les méthodes LA sont très robustes.
 - L'analyse d'association (LDA), dans des populations non structurées, exploite le déséquilibre de liaison entre un QTL et les marqueurs pour estimer l'effet du génotype aux marqueurs sur le caractère. L'utilisation de méthode LDA permet de localiser plus précisément les QTL.
- Aujourd'hui, avec les nouvelles technologies de génotypage fin, les analyses LD-LA qui exploitent le déséquilibre de liaison entre un QTL et les marqueurs et qui permettent de prendre en compte la structure des familles semblent les plus intéressantes pour l'étude de caractères complexes.

Pour toutes les approches, un facteur limitant la puissance de détection des QTL est le nombre important d'individus à génotyper et phénotyper. Cependant, l'utilisation d'individus HD permet, dans le cas de détection de QTL par LA, de réduire l'effectif de la famille tout en conservant la puissance de détection des QTL.

2. LE TRAVAIL DE THESE

2.1. Contexte scientifique du travail de thèse

2.1.1. Données de la littérature : la résistance, un caractère héritable, avec mise en évidence de quelques QTL après des infections expérimentales

Plusieurs études ont estimé l'héritabilité de la résistance, mesurée comme le statut ou la date de mort, à *F. psychrophilum* entre 0,07 et 0,53 (Henryon et al., 2005 ; Leeds et al., 2010 ; Silverstein et al., 2009 ; Vallejo et al., 2010). En pratique, on pourrait donc améliorer ce caractère par la sélection à partir des performances des collatéraux des candidats à une infection expérimentale (Chapuis et al., 2012). C'est ce qui a été fait par le NCCCWA (Etats-Unis) à partir de 2005 (Leeds et al., 2010 ; Silverstein et al., 2009). Après deux générations de sélection, les premiers résultats se sont avérés très encourageants avec une augmentation de 45% de la différence de survie entre souches sélectionnées et souches témoins après deux générations de sélection (Leeds et al., 2010).

Des premiers travaux prospectifs réalisés à partir de simulations (Bayesian Segregation Analysis) utilisant uniquement des données phénotypiques de résistance sur ces mêmes familles ont estimé que la résistance à *F. psychrophilum* était contrôlée par un petit nombre de QTL (6 à 10) expliquant plus de 80% de la variance phénotypique (Vallejo et al., 2010). Suite à cet article, les premières détections de QTL de résistance (survie ou date de mort) ont rapidement été réalisées par analyse de liaison à l'aide de marqueurs microsatellites dans des croisements entre familles résistantes et familles sensibles (Vallejo et al., 2014 ; Wiens et al., 2013). Puis une première GWAS a été réalisée dans une population commerciale en sélection (Clear Springs Foods Inc., Etats-Unis) grâce à un premier panel de SNP obtenus par RADseq (Campbell et al., 2014). Ces différentes analyses ont permis de détecter plusieurs QTL de résistance (survie ou date de mort), dont quelques QTL qualifiés de majeurs par les auteurs car expliquant plus de 20% de la variance phénotypique et jusque 40% dans le cas de la date de mort (Vallejo et al., 2014). Cependant, toutes ces analyses ont été réalisées dans des populations américaines, soit commerciales (Campbell et al., 2014) soit issues du programme de sélection du NCCCWA (Vallejo et al., 2014 ; Wiens et al., 2013) et

avaient donc une portée potentiellement limitée pour des populations françaises dont le fond génétique est sans doute différent.

D'une part, ces différentes études reposent toutes sur un protocole d'infection par injection. Elles ne permettent donc pas d'explorer l'ensemble des mécanismes de défense de l'hôte, en particulier le rôle potentiel de la peau et du mucus pour contrôler et limiter l'entrée des agents pathogènes, de plus en plus souligné dans la littérature.

D'autre part, aucune de ces études n'a exploré les possibles interactions entre génotype de l'hôte et génotype bactérien. Or différentes souches de *F. psychrophilum* sont susceptibles d'avoir différents facteurs de virulence et la question se pose donc de savoir si la résistance à une souche bactérienne obtenue par sélection permet de résister à une souche différente.

Enfin, ces différentes études s'intéressent presque uniquement à la résistance mesurée avec la survie en fin d'épreuve ou la date de mort. Elles passent ainsi sous silence les autres composantes de la réponse à l'infection, comme la tolérance, la résilience ou encore la charge bactérienne.

2.1.2. Dans les projets développés à l'INRA : mise au point d'une infection expérimentale par balnéation et utilisation des lignées isogéniques comme modèle d'analyse génétique

A l'INRA, la résistance à *F. psychrophilum* chez la TAC est étudiée dans le cadre d'un programme conjoint entre bactériologistes et généticiens. Cette collaboration a permis de combiner des approches au niveau de la bactérie (physiologie, génomique, recherche des facteurs de virulence) et de l'hôte (variabilité génétique, réponse immunitaire antibactérienne). Parallèlement, les professionnels ont affiché une motivation importante pour l'introduction de la résistance aux maladies dans les schémas de sélection. La caractérisation de l'architecture génétique de la résistance et les modalités de son exploitation dans les schémas de sélection (choix d'un protocole d'infection expérimentale, modalités de sélection) est donc devenu un enjeu pour la filière.

L'optimisation des conditions de culture et de récolte de la bactérie a permis de mettre au point un protocole expérimental permettant d'infecter par balnéation un nombre important de poissons. Plusieurs souches bactériennes ont été testées, et seule la souche FRGDSA 1882/11 (ST90), isolée en France à l'occasion d'un épisode infectieux sévère, s'est révélée compatible avec une bonne efficacité de l'infection par immersion. Les autres souches ont induit des mortalités trop faibles pour être exploitées dans des analyses génétiques. Cependant, du fait de cette virulence, la mortalité après injection sur des jeunes poissons peut être vraiment très importante et est parfois difficile à maîtriser même en diluant la solution injectée.

Les deux protocoles infectieux (balnéation et injection) ont permis de tester et de comparer la résistance des lignées isogéniques de la collection de l'INRA. Quel que soit le protocole, une forte variabilité de la résistance entre lignées est mise en évidence, avec des lignées très résistantes (R23^R) et des lignées très sensibles dont la mortalité est rapide et importante (G17^S, A36^S) (Figure 21). Ces lignées isogéniques sont donc un matériel biologique intéressant pour une analyse génétique de la résistance à la bactérie puisqu'il est relativement facile de choisir des lignées à la résistance contrastée pour produire un croisement expérimental pour la détection de QTL une ou plusieurs fois tout en bénéficiant des informations acquises sur les lignées parentales. D'autre part, la maîtrise au laboratoire des techniques de gynogenèse permet d'obtenir des individus haploïdes doublés (HD) qui améliorent la puissance de détection de QTL dans des dispositifs où le nombre d'individu est limité, ce qui est souvent le cas pour des caractères difficiles à mesurer comme la résistance à une maladie.

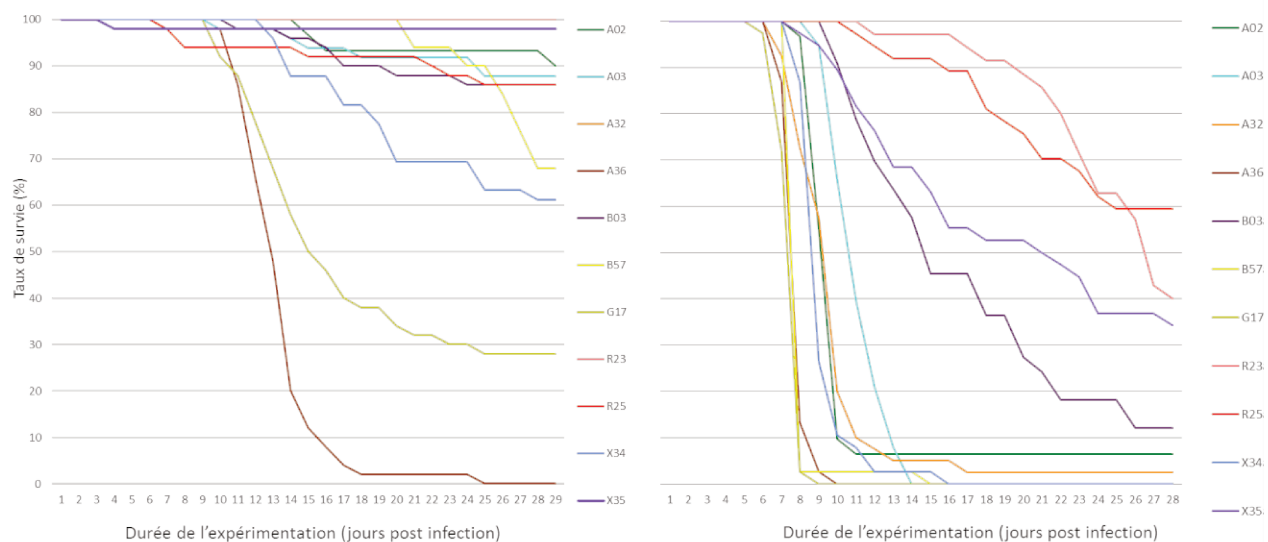


Figure 21. Courbes de survie pour une partie des lignées isogéniques de la collection de l'INRA après une infection expérimentale par baignation (gauche) et par injection (droite)

Données issues de travaux préliminaires réalisés au sein de l'équipe GenAqua (Dechamp et al., 2018)

Lorsque l'on compare la résistance relative des lignées (Figure 22) on remarque que certaines lignées se reclassent en fonction du protocole infectieux. C'est le cas par exemple des lignées B57 (jaune) et X22 (bleu) qui sont les lignées les plus sensibles après une infection par injection mais qui se reclassent (+4 et +5 places) après une infection par baignation.

Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle différents modes d'infections pourraient stimuler des mécanismes de résistance différents et l'utilisation de lignées dont la sensibilité au protocole infectieux varie semblent particulièrement intéressantes pour valider cette hypothèse.

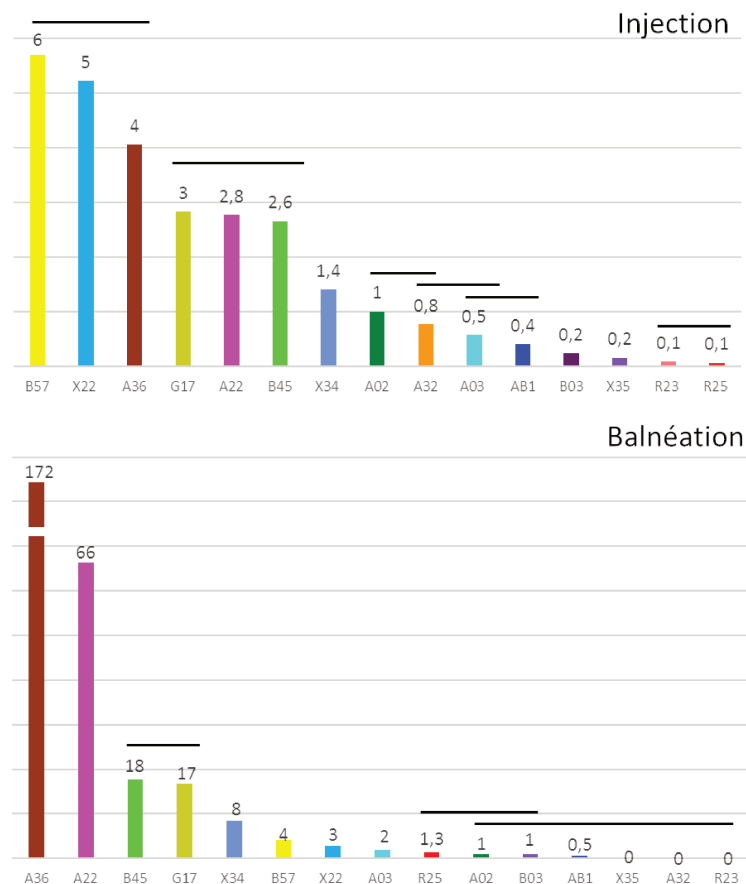


Figure 22. Classement de différentes lignées isogéniques selon leur résistance à une infection par injection (haut de la figure) ou par baignation (bas de la figure)

Les chiffres sont les risques relatifs des lignées, calculés à l'aide d'un modèle de Cox (Ducrocq et al., 2010) en prenant la lignée A02 comme référence (risque relatif de 1). Les risques relatifs se comprennent comme : « les individus issus de lignée B57 ont 6 fois plus de chance de mourir après une infection par injection que les individus de lignée A02, sur un même intervalle de temps ». Les barres regroupent les lignées dont les risques relatifs ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$). Données issues de travaux préliminaires réalisés au sein de l'équipe GenAqua (Dechamp et al., 2018)

Enfin, le développement de nouvelles technologies de marquage et de génotypage a permis d'envisager différentes approches. Ainsi, les nouvelles technologies permettant le marquage d'animaux de petite taille, donc avant l'infection, ont permis d'obtenir des données sur l'effet de la taille au moment de l'infection et d'envisager le suivi individuel des performances avant et après l'infection. Les technologies de GBS avec le RADseq et le ddRADseq permettent de générer un nombre important de SNP et donc d'affiner les localisations de QTL (réalisée avec des microsatellites dans l'EXP3b). Enfin, la mise sur le marché de la puce de génotypage truite ainsi que l'implication grandissante des professionnels de la filière pour l'amélioration génétique de la résistance aux maladies a été le point de départ de projets visant à améliorer les connaissances du déterminisme génétique de la résistance dans les populations des sélectionneurs en France.

2.2. Objectifs et plan du travail de thèse

Dans ce contexte, ma thèse a pour ambition de contribuer à préciser l'architecture génétique de la réponse de la truite arc-en-ciel à *F. psychrophilum*. J'ai mené une première partie de mes travaux de recherche sur la caractérisation fine de la résistance à *F. psychrophilum* dans trois croisements expérimentaux obtenus à partir de différentes lignées isogéniques et infectées par injection et balnéation. La seconde partie de mes recherches a porté sur l'identification de marqueurs de résistance à *F. psychrophilum* dans une lignée sélectionnée après un épisode de mortalité naturel *in campo*.

Le travail sur les **croisements expérimentaux** a pour objectifs de

- Détecter des QTL associés à différentes composantes de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum* : la résistance, l'endurance, la résilience et le portage bactérien dans la rate en fin d'épisode infectieux. Un des objectifs est d'évaluer dans quelle mesure le déterminisme génétique de ces différents caractères est partagé ou si des déterminants spécifiques importants modulent la variabilité de chaque composante.
- Valider les hypothèses selon lesquelles (i) une infection expérimentale par balnéation fait intervenir des déterminants génétiques différents d'une infection par injection et (ii) les déterminants génétiques de la résistance sont conservés en fonction du variant bactérien responsable de l'infection.
- Mieux caractériser les déterminants de la réponse précoce à l'infection (avant l'apparition des premières mortalités) en analysant particulièrement l'évolution de la charge bactérienne dans la rate, un organe cible de l'infection, 3 jours après l'infection et l'expression de gènes du complément C3, un élément important de la réponse immunitaire antibactérienne innée.

Pour répondre à ces différents objectifs, nous avons utilisé six lignées isogéniques à la résistance contrastée : trois lignées classées résistantes (AP2^R, A02^R, A03^R) et trois classées sensibles (B57^S, A36^S, G17^S) (Figure 23). Les lignées ont été appariées pour former trois couples résistante/sensible : AP2^R/B57^S, A02^R/A36^S, A03^R/G17^S.

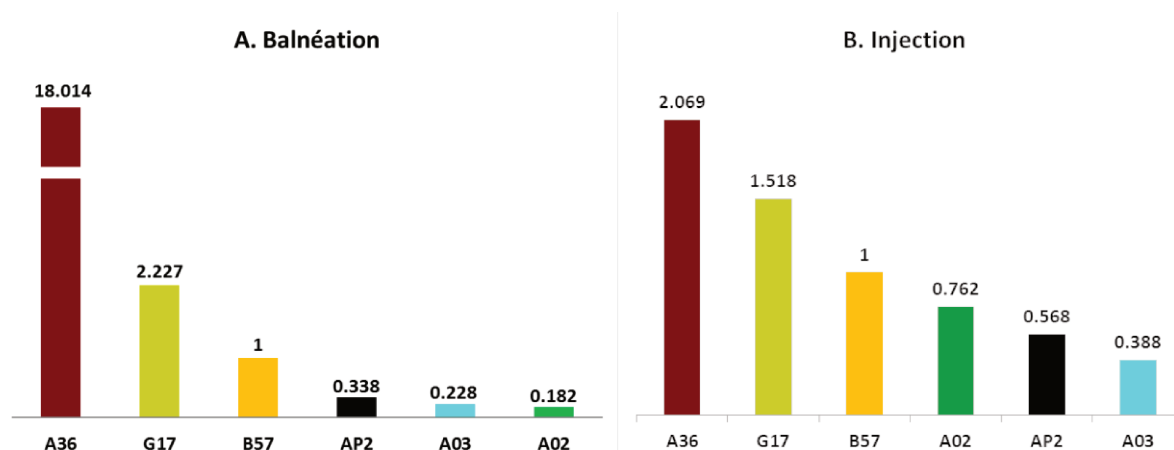


Figure 23. Classement des six lignées isogéniques de truite arc-en-ciel ayant été utilisées comme F0 pour les différents croisements permettant de produire les familles QTL selon leur valeur de risque ratio après une infection expérimentale avec *F. psychrophilum* par balnéation (A) et par injection (B)

Le risque relatif de chaque lignée a été calculé à l'aide du « Suvrival Kit » (Ducrocq et al., 2010), en prenant la lignée B57 comme référence.

Après l'infection par balnéation, les risques relatifs des lignées AP2, A03 et A02 ne sont pas significativement différents et A36 est la lignée la plus sensible.

Après l'infection par injection, tous les risques relatifs sont significativement différents, A36 est la lignée la plus sensible et A03 la lignée la plus résistante.

Données non publiées analyse réalisée par A. Konieczka en 2016.

Ces trois couples ont permis de produire trois croisements F1 différents, composés uniquement d'individus femelles. Un individu F1 unique a été échantillonné dans chacun des croisements AP2^R/B57^S et A02^R/A36^S et reproduit par gynogenèse mitotique afin d'obtenir deux familles QTL composées d'individus haploïdes doublés (HD). La gynogenèse sur la dernière famille (A03^R/G17^S) n'ayant pas fonctionné, une femelle F1 a été reproduite avec un néomale F1 pour obtenir un croisement F2.

J'ai utilisé les deux croisements F2-(A03^R/G17^S) et HD-(A02^R/A36^S) dans les expériences (EXP1 et EXP2) pour répondre au premier objectif de caractérisation plus fine de la réponse à l'infection. Ce travail a été réalisé en partie en partenariat avec le Roslin Institute (Edinbourg, Royaume-Unis) dans le cadre du projet européen FISHBOOST dont les objectifs sont l'amélioration des programmes de sélection européens pour les principales espèces de poissons d'élevage.

J'ai utilisé le croisement HD-(AP2^R/B57^S) dans les EXP3a et 3b. L'EXP3a avait pour objectif de tester l'hypothèse selon laquelle balnéation et injection feraient intervenir des mécanismes immunitaires en partie différents. Dans cette expérience, les individus ont été infectés avec la souche FRGDSA 1882/11. Les

données de l'EXP2 ont complété ces résultats à partir d'un fond génétique différent. J'ai tiré pleinement profit des avantages des individus HD pour étudier les relations d'épistasie entre QTL. Enfin, les résultats obtenus dans l'EXP3b, après une infection par injection avec la souche JIP02/86 m'ont permis d'apporter un premier élément de réponse aux interactions génotypes de l'hôte – génotype de la souche. Ce même croisement a aussi servi pour caractériser la réponse précoce à l'infection dans l'EXP3b.

Les résultats obtenus avec les croisements expérimentaux sont présentés dans la partie 3.1 des résultats (§3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 et 3.1.4).

Le travail sur **la lignée commerciale** (Les Aquaculteurs Bretons, Milin Nevez) a permis d'analyser la structure génétique de la résistance à *F. psychrophilum* dans cette population, après un épisode infection survenu spontanément en pisciculture. Ce travail s'inscrit dans le projet 57K-Truite (FranceAgriMer, n° SIVAL 2015-0638), commun entre le SYSAAF et l'INRA et visant à utiliser, pour la première fois, la puce de génotypage Axiom™ Trout Genotyping Array (Affymetrix) en France avec comme perspective l'implémentation de la sélection génomique chez les éleveurs de truites français. Cette étude était aussi l'occasion de réaliser la première GWAS, sur une population de TAC française en sélection et surtout d'étudier la résistance après une infection naturelle avec *F. psychrophilum*, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été réalisé avant. Enfin, ces résultats devaient nous permettre de valider, dans une lignée commerciale, les différents QTL obtenus dans les croisements expérimentaux.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la partie 3.2 des résultats.

Tableau 2. Récapitulatif des différentes expériences à l'origine des résultats présentés dans cette thèse

Expérience	Croisement	N° d'agrément	Méthode d'infection	Méthode de génotypage	Caractères mesurés	Détection de QTL	Publication envisagée
EXP1	F2- (A03 ^R /G17 ^S)	n° 12/051 n° 12/053	Expérimentale par injection et baignée avec la souche FRGDSA 1882/11	ddRADseq	STATUT, ENDURANCE, RESISTANCE, RESILIENCE, PORTAGE	LA	En cours de rédaction, soumission envisagée dans Aquaculture
EXP2	HD- (A02 ^R /A36 ^S)	n° 12/051 et 12/053	Expérimentale par injection et baignée avec la souche FRGDSA 1882/11	ddRADseq	STATUT, ENDURANCE, RESISTANCE TOLERANCE	LA	Non
EXP3a	HD- (AP2 ^R /B57 ^S)	n° 12/051 et 12/053	Expérimentale par injection et baignée avec la souche FRGDSA 1882/11	RADseq	STATUT, RESISTANCE ENDURANCE	LA	Publiée dans Genetic Selection and Evolution
EXP3b	HD- (AP2 ^R /B57 ^S)	E.Quillet n°78-67 et C29106	Expérimentale par injection avec la souche JIP02/86	Microsatellites et RADseq	RESISTANCE CHARGE BACTERIENNE PRECOCE Expression des gènes <i>c3</i> et <i>c3-3</i>	LA	A définir ultérieurement
EXP4	Lignée commerciale (Milin Nevez)	NA	Episode de mortalité naturel <i>in campo</i>	Puce : Axiom TM Trout Genotyping Array (57K)	STATUT et DDM	LD-LA	Publiée dans Animal Genetics

3. RESULTATS

Sommaire des résultats

3.1.	ARCHITECTURE GENETIQUE DE LA REPONSE A <i>FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM</i> : APPROCHE DANS LES CROISEMENTS EXPERIMENTAUX.....	124
3.1.1.	<i>Les composantes de la réponse à l'infection : survie, endurance, résistance, résilience et portage</i>	124
3.1.1.1.	Manuscrit : « Une approche QTL de la réponse de la truite arc-en-ciel à l'infection par <i>Flavobacterium psychrophilum</i> »	125
3.1.1.2.	Résultats complémentaires : infection expérimentale par injection et baignade de la famille HD-(A02 ^R /A36 ^S) (EXP2)	150
3.1.1.2.1.	Résumé des matériels et méthodes.....	150
3.1.1.2.2.	Détection de QTL associés à la réponse à l'infection	152
3.1.1.3.	Discussion : les différentes composantes de la réponse à l'infection par <i>F. psychrophilum</i>	158
3.1.1.4.	Conclusion	160
3.1.2.	<i>Analyser plus finement la résistance : l'épistasie</i>	162
3.1.2.1.	Publication scientifique : "Quantitative trait loci for resistance to <i>Flavobacterium psychrophilum</i> in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions"	163
3.1.2.2.	L'existence d'interactions entre QTL confirmées avec la famille HD-(A02 ^R /A36 ^S) (EXP2)	182
3.1.2.3.	Discussion et conclusion : la résistance un caractère complexe (EXP3a et EXP2)	184
3.1.3.	<i>L'effet de la souche de <i>F. psychrophilum</i> utilisée (EXP3a et EXP3b)</i>	187
3.1.3.1.	L'EXP3b : résumé du matériel et méthode	187
3.1.3.2.	L'EXP3b : principaux résultats.....	188
3.1.3.3.	Comparaison des résultats avec l'EXP3a : l'effet de la souche de <i>F. psychrophilum</i> sur la résistance..	188
3.1.3.4.	Discussion et conclusion : effet des souches bactériennes	190
3.1.4.	<i>La réponse précoce à l'infection dans la rate : charge bactérienne précoce et expression de gènes codant pour la protéine C3 du système du complément</i>	192
3.1.4.1.	Méthodologie	193
3.1.4.2.	Rapport spléno-somatique et charge bactérienne précoce dans la rate.....	193
3.1.4.3.	Expression des gènes <i>c3</i> et <i>c3-3</i> dans la rate 76h après l'infection	197
3.1.4.4.	Discussion et conclusion.....	200
3.2.	LA RESISTANCE A LA FLAVOBACTERIOSE EN CONDITION D'ELEVAGE	202
3.2.1.	Publication scientifique : "La résistance des truites arc-en-ciel à la flavobactériose d'eau froide : identification de deux nouveaux QTL après un épisode de mortalité naturel dans une pisciculture française "	203
3.2.2.	Résultats complémentaires : GWAS sur le caractère STATUT (mort/vivant)	211
3.2.3.	Bilan de l'approche sur une lignée standard.....	212

3.1. Architecture génétique de la réponse à *Flavobacterium psychrophilum* : approche dans les croisements expérimentaux

3.1.1. Les composantes de la réponse à l'infection : survie, endurance, résistance, résilience et portage

Ce chapitre présente les résultats des expériences EXP1 et EXP2, réalisées avec les familles F2-(A03^R/G17^S) et HD-(A02^R/A36^S). Ces deux expériences ont été conçues dans le cadre du projet Fishboost.

L'objectif était de mieux caractériser la réponse des TAC à une infection expérimentale par injection et immersion avec *F. psychrophilum*, en distinguant différentes composantes de la réponse à l'infection : la survie en fin d'épisode infectieux (statut mort/vivant), l'endurance, la résistance (analyse de survie), la résilience et le portage bactérien dans la rate des survivants.

Les résultats des deux familles devaient être couplés dans une analyse unique, mais plusieurs aléas expérimentaux ont perturbé le projet. D'une part, il n'a pas été possible de produire des haploïdes doublés dans le croisement (A03^R/G17^S). D'autre part, à cause de la très forte mortalité des poissons infectés par injection, je n'ai pu réaliser la détection de QTL associés à la résilience que pour les individus infectés par balnéation dans l'EXP2. Enfin, seule l'EXP1 m'a permis de mesurer le portage dans la rate.

Les résultats de l'EXP1, obtenus sur le dispositif F2-(A03^R/G17^S) sont présentés dans un projet de manuscrit qui sera soumis à la revue **Aquaculture** (§ 3.1.1.1). Les résultats de l'EXP2, obtenus sur la famille HD-(A02^R/A36^S) sont présentés en complément dans le paragraphe 3.1.2.1.

3.1.1.1. Manuscrit : « Une approche QTL de la réponse de la truite arc-en-ciel à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum* »

A QTL-BASED VISION OF RAINBOW TROUT RESPONSE TO INFECTION BY *Flavobacterium psychrophilum*

C. Fraslin, C. Palaiokostas, N. Dechamp, C. Ciobotaru, C. Hervet, M. Bernard, T. Rochat, E. Duchaud, A. Houel, J.F. Bernardet, R.D. Houston and E. Quillet

1. Introduction

Infectious diseases are responsible of important economic losses in fish farming (Houston, 2017; Yáñez et al., 2014a). To limit the negative effect of disease outbreaks, prophylactic methods are used. However the development of new vaccines is often challenging (Gómez et al., 2014) and getting regulatory approval is expensive and hardly profitable due to the limited size of the target market (Lafferty et al., 2015). Consequently, the number of new fish vaccines and drugs approved by institutions is limited (Hadidi et al., 2008; Lafferty et al., 2015; Wahli and Madsen, 2018). In the context of growing antibiotic-resistance threat, additional methods to tackle fish diseases are highly needed. One way to maintain healthy broodstock while limiting the use of drugs is to improve the natural host defense mechanisms against infectious pathogens through selective breeding.

Host defense against a pathogen is complex, in plants it has been decomposed into resistance, the ability of the host to control and limit the infection, and tolerance, the ability of the host to cope with a certain disease severity while limiting the impact on fitness or performances (Fineblum and Rausher, 1995; Simms and Triplett, 1994). However, even if the concept of tolerance has gain attention in the animal literature, included

in the aquaculture world, the number of studies is still limited (Kause and Ødegård, 2012; Levraud et al., 2014). In animal studies tolerance is often defined as the ability of the host to limit the disease severity induced by a given pathogen load (Doeschl-Wilson et al., 2012a; Råberg et al., 2009, 2007). In order to improve the natural host defense, one can choose to use genetic selection to improve either host resistance or host tolerance. If both strategies might have similar impact on host defense, they have different consequences on the host-pathogen co-evolution. Indeed, resistance will have a negative impact on pathogen evolution while tolerance will have no impact on the pathogen evolution (Carr et al., 2006; Woolhouse et al., 2002). Therefore, improving resistance may lead to a co-selection of more virulent pathogen and so limit the potential improvement of host health.

In order to select for those two components of the response to infection, they need to be quantifiable. Resistance, when possible, is measured as pathogen burden (Bishop, 2012). In fish, pathogen load is most often impossible to record so disease resistance, as opposed to susceptibility, is assessed as survival after an infection. Many studies have now evidenced that fish exhibit an important genetic variability in resistance to viral, bacterial or parasitic infections (Gjedrem and Gjedrem, 2015; Robinson et al., 2017; Yáñez et al., 2014a). Tolerance, on the other hand, is more complicated to measure at the individual level, as it requires to measure individual host fitness (for example a given performance) at different levels of pathogen load (Simms, 2000). As a consequence, tolerance is often measured at a group level using regression models (Doeschl-Wilson et al., 2012b; Kause and Ødegård, 2012). Some studies have used different proxies of tolerance such as the slope of the relation between infection intensity and the host performance (Råberg et al., 2007, in mice). It can also be measured as the difference in a given trait between infected and naïve host at the individual or the group level (Carr et al., 2006; Fineblum and Rausher, 1995, in *Mimulus guttatus* and *Ipomoea purpurea* the tall morning glory, respectively). At the individual level, Doeschl-Wilson et al., (2012b) have suggested from a theoretical approach that in the absence of precise individual pathogen burden, it is in fact the resilience, defined as the ability of the host to maintain a certain level of performance while infected (Albers and Gray, 1987), that is measured. In animals, it is often difficult to measure this

pathogen burden therefore in practice most studies measure resilience instead of tolerance (Bisset et al., 1996; Riffkin and Dobson, 1979, in sheep).

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), one of the most important freshwater salmonids, is greatly affected by *Flavobacterium psychrophilum*. This bacterium is the causative agent of bacterial cold water disease (BCWD), one of the most important disease to affect both fry and bigger trout (Nematollahi et al., 2003b a). It is responsible of important losses with mortality as high as 70% as well as deformities in surviving fish (Dalsgaard, 1993; Lorenzen, 1994; Nematollahi et al., 2003b a; Starliper, 2011). Until now, the main way to fight the disease is through the use of antibiotics as no efficient commercial vaccine is available worldwide. Moreover, the use of preventative methods to limit the spread of the disease are limited as the possibility of a vertical transmission of the bacterium through eggs, ovarian fluids and sperm of infected fish to the next fish generation has been evidenced (Kumagai, 2016; Kumagai and Takahashi, 1997; Long et al., 2014; Oplinger et al., 2015). Selective breeding to improve trout defense mechanisms against *F. psychrophilum* is a promising alternative highly needed.

Resistance to *F. psychrophilum* is a moderately heritable trait (Henryon et al., 2005, 2002; Silverstein et al., 2009). A number of Quantitative Trait Loci (QTL) associated with resistance have been identified (Vallejo et al., 2010; Wiens et al., 2013; Vallejo et al., 2014; Liu et al., 2015; Palti et al., 2015b; Vallejo et al., 2017b; Fraslin et al., 2018a). However, studies usually focused on survival at the end of infection or on time to death but did not investigated the genetic determinism of other components of host response such as tolerance. To the best of our knowledge, the study of Yáñez et al., (2010) in Atlantic salmon was the first to demonstrate the existence of additive genetic variation for tolerance/resilience to an infectious disease in a fish. Another interesting component of host response to infection, especially in the case of *F. psychrophilum* would be the presence of bacteria in the spleen of surviving fish. Indeed, spleen is a target organ of *F. psychrophilum* with bacterial load in the spleen raising shortly after infection (Ekman and Norrgren, 2003; Hadidi et al., 2008; Rangdale et al., 1999). Investigating the bacterial load of fish that survived after an

infection would help determine whether surviving fish become healthy carriers and thus potential reservoir to spread out the pathogen or to transmit it to their offspring.

In this study, we aimed at refining the description of trout response to infection with *F. psychrophilum* and its genetic determinism. The experiment and QTL detection was carried out using a F2 cross from two INRA rainbow trout isogenic lines, with contrasting resistance to *F. psychrophilum* (Fraslin et al., 2018a) and unpublished data) and two routes of infection (immersion or intramuscular injection), were compared. We investigated the fish resistance, measured as both survival at the end of the infection and endurance (time to death) and we combined those two traits using a survival analysis. We also investigated the fish resilience, measured as the growth during the challenge, as it was not possible to record infection load for the immersion challenge. Finally, we investigated the bacterial load in spleen five days after the end of the infectious event.

2. Material and Methods

2.1. Ethic statement

All animals were handled in strict accordance with good practice as defined by the European Union guideline for the handling of laboratory animals and by Comethea, the Regional Paris South Ethics committee. The experiment was carried out in INRA fish facilities (IERP, Jouy-en-Josas) according to authorizations n° 12/051 and 12/053.

2.2. The F2 QTL family

INRA has produced a collection of rainbow trout gynogenetic isogenic lines that are being maintained at PEIMA experimental farm (Sizun, France) (see (Quillet et al., 2007c) for a complete description of the production and maintenance of lines). The lines were screened for resistance to various diseases including *F. psychrophilum* and expressed a wide range of susceptibility (Biacchesi et al., 2007; Frasin et al., 2018a; Langevin et al., 2012; Verrier et al., 2018). Two isogenic lines with contrasting resistance to *F.*

psychrophilum were chosen as grandparents to produce a QTL family; the G17^S (susceptible) and the A03^R (resistant) line (Fig. A.1). One female from the G17^S line was mated with one sex-reversed male from the A03^R line to produce an all-female F1 progeny with all fish sharing the same genetic background and heterozygous at loci for which the F0 had different fixed alleles. One female and one sex-reversed male from the F1 progeny were mated together to produce the F2 cross that was used for QTL detection.

F0 and F1 breeders were reared and spawned at PEIMA. After incubation, the F2 eyed eggs were transported to IERP experimental facility INRA, (Jouy-en-Josas, France) where they were iodine disinfected and placed into rearing tanks with recirculated and dechlorinated tap water (10°C) for hatching and the rearing of fry until infectious challenge. Fish were fed manually with commercial pellets several times a day.

2.3. Experimental infection protocols and traits recording

Two experimental infectious challenges, using immersion and intramuscular injection protocols were carried out at 2-months interval. Fish were infected with the *F. psychrophilum* FRGDSA 1882/11 isolate, belonging to the clonal complex CC-ST90 (Duchaud et al., 2018), that was isolated in 2011 from a diseased rainbow trout in a farm in the South-West of France. In both cases, the bacterial inoculum was grown at 18°C and 200rpm in TYES broth until late exponential phase (OD₆₀₀ approximately 1). The infectious dose was estimated by optical density before infection and controlled after infection by enumeration of visible bacteria colonies on agar after a 48h incubation period at 18°C.

Experimental infection by immersion was performed on 5.5-month-old fish (post fertilization). Because of the very high virulence of the FRGDSA 1882/11 bacterial isolate that may induce almost complete mortality in small fish (unpublished data), the infection using intramuscular injection was performed on slightly older fish (8-months post fertilization).

For immersion, 405 F2 fry were anaesthetized and individually tagged (intraperitoneal implantation of Tiny chip Biolog ID) at an average body weight of 1.4g. After a recovery period of 20 days, body weight of naïve

fish was recorded. Experimental infection was performed 36 days later on 300 fish randomly sampled. Fish were individually weighted and immersed for 4h in a bacterial suspension (6.10^7 cfu/mL at the beginning of the protocol and 1.10^8 cfu/mL after 4h) in static water maintained at 10°C with vigorous aeration in a single 3 L aquarium. After immersion, fish were randomly distributed into four 15L aquaria with a 10°C water flow supply, each containing 75 fish.

For the experimental infection using the injection protocol, 365 F2 fish were individually tagged at an average weight of 4.6 g. Body weight was recorded after a 32 days recovery period and 30 days later 336 fish were anaesthetized, individually weighted and infected through intramuscular injection with 50µL of bacterial inoculum (corresponding to 300 cfu/fish). After infection, fish were kept in a single tank (300 L) with a 10°C water flow supply.

During the period of survey after both injection and immersion protocols, fish were fed manually twice a day. Mortality was monitored twice a day. Dead fish were removed from tanks and identified by tag recording. A piece of caudal fin was clipped and stored in absolute ethanol for further DNA extraction and genotyping. At day 31 and day 45 for the immersion and injection protocols respectively, mortality had reached a plateau. The challenge ended few days later (day 36 and 51 for the immersion and injection protocols respectively). All remaining fish were euthanized by an overdose of anaesthetics, weighted, and, for the injection protocol, the spleen was immediately collected, for further measurement of bacterial load.

2.3.1. Status, endurance and resistance

Two traits were analyzed to investigate fish resistance: (i) STATUS, i.e. the dead/alive status at the end of the challenge and (ii) for dead fish, ENDURANCE, measured as the number of days between the beginning of the challenge and the death. Both traits were combined in an overall RESISTANCE trait using a survival analysis that takes into account the fact that resistant fish did not died during the challenge (i.e. censored data). We used a Cox model (Cox, 1972; Moreno et al., 2005), as it that makes no assumption on the trait distribution (Fraslin et al., in press).

2.3.2. Resilience

For QTL detection, resilience had to be measured at the individual level. For each surviving fish, the growth performance during the infectious challenge was used as a proxy of the ability of an individual to maintain performance while fighting the disease. The daily growth coefficient (DGC) (Bureau et al., 2000), which is independent of the fish body weight and time interval at a given temperature (Kaushik, 1998) was used to calculate growth performance:

$$DGC = \frac{(BW_f^{1/3} - BW_i^{1/3})}{(T_f - T_i)} * 100 \text{ with } BW_i \text{ and } BW_f \text{ the body weight (g) of the fish at the start and the end of}$$

the recording period and $(T_f - T_i)$ the duration (days) of the recording period.

We calculated the DGC before the challenge to estimate the naïve fish potential growth performance (DGC_N) and the DGC of infected fish (DGC_I) calculated from the infection time until the end of the challenge. As those two measurements were independent, we simply estimated RESILIENCE as DGC_I and made no correction to take into account the ‘base’ individual growth rate (DGC_N).

2.3.3. Spleen bacterial load

At the end of the injection protocol, all fish that were euthanized were frozen and kept at -80°C . After defrosting, the spleen of each fish was surgically removed and cut in two parts with disinfected material in order to avoid cross contamination. Half of the spleen was frozen at -80°C before being ground with liquid nitrogen in a mortar with cautious cleaning and disinfection of pestle and mortar between two individuals. For each individual, 50 mg of powder were sampled for DNA extraction using the Wizard® genomic DNA purification kit (Promega) and following manufacturer’s instructions.

After standardization of DNA concentration, DNA samples were processed for real-time PCR using the Stratagene Mx3000P real-time PCR instrument on five different plates, including some cross validations (samples duplicated on two or more plates). Real-time PCR was carried out with a pre-commercial kit designed by the Phylogene company. Primers (forward and reverse) were used to amplify a 136 bp fragment

specific of *F. psychrophilum* genome, an internal TaqMan probe, labeled with a FAM reporter dye at its 5' end and a BHQ quencher at its 3' end, hybridized the DNA. Resulting fluorescence was measured at 516nm. A chimeric DNA with an internal sequence different from *F. psychrophilum* was used as inhibition control (228 bp); the fluorescence generated was measured at 555nm and thus could be distinguished from the fluorescence due to *F. psychrophilum* amplification. For each plate, a calibration curve made of known *F. psychrophilum* concentration was established according to $CT = f(\log(\text{DNA copy}))$ but, due to a lack of repeatability, it did not allowed to quantify precisely the amount of *F. psychrophilum* DNA. Thus, results of the real-time PCR were analyzed as a binary trait. Within each plate, the CT of the negative control was recorded (CT_{nc}) and served as threshold value to declare a sample positive or negative.

2.4. DNA extraction, ddRAD sequencing libraries preparation and sequencing

In total 643 fish fin were genotyped corresponding to 632 F2 fish (297 from immersion and 335 from injection), three fish from the G17^S line (the F0 dam and two sisters), three fish from the A03^R line (the F0 sire and two brothers), and five fish from the F1 cross (the F1 dam, sire, two sisters and one brother). F0 and F1 fish siblings were used as controls to validate pedigree across generations.

Genomic DNA was extracted from fin portion using the DNA Tissue HTS 96 Kit, (Invisorb, Germany) following manufacturer's instructions. DNA quantity was measured by a Qubit fluorimeter with a dsDNA BR Assay (Invitrogen, California) and standardized at 0.1µg DNA. DNA quality was controlled after migration in 1% agarose gel electrophoresis. Double-digest RAD sequencing (ddRAD) libraries were prepared according to (Palaikostas et al., 2015) protocol which is a modified version of the (Peterson et al., 2012) methodology. Briefly, each DNA sample was digested at 37°C for 40 minutes by two restriction enzymes SbfI and SphI (recognizing CCTGCA/GG and GCATG/C motif, respectively). Individual-specific combinations of 5 or 7 bp barcode and SbfI compatible P1 and SphI compatible P2 adapters were ligated to the digested DNA at 22°C for 60 minutes. The ligation reactions, after cooling to room temperature, were then combined in a single pool containing up to 288 samples and purified. Size selection (300-400 bp) was

performed by agarose gel separation and purification, after gel purification all fragments were amplified by 13 to 14 cycles of PCR. Two libraries were produced and sent to BMR Genomics (Padova, Italy) for pair-end sequencing on a NextSeq500 (2x82 bp) on 2 lanes. Because of technical issues during the second library preparation (probably DNA quality or existence of some inhibitors during libraries construction), 107 fish from the injection challenge (70 resistant and 37 susceptible) had too low coverage and had to be genotyped again. The 2 F0 grandparents and the 2 F1 parents were included in the new genotyping process as controls. A new ddRAD library was constructed with the 111 individuals as previously described and sent to the GeT-PlaGe genotyping platform (Toulouse, France) for genotyping on 1 lane of an Illumina HiSeq3000 pair-end (2x150 bp).

All raw reads were treated with the `process_radtags` program from Stacks® software (version 1.44, Catchen et al., 2011). Reads with ambiguous barcode were discarded. Remaining reads were assigned to a single individual after a demultiplexing step allowing zero mismatch in the barcode and one mismatch in the restriction site and then trimmed to a conservative 76bp-length to remove barcode.

2.5. de novo genotyping and SNP discovery

SNP calling was performed as in Fraslin et al. (2018) through a de novo analysis using the Core pipeline of Stacks® software version 1.44 (Catchen et al., 2011). Briefly, putative alleles within individual were created by at least 5 identical reads (-m option) with 2 maximum mismatches allowed between reads (-M option). Secondary reads were not used (-N option set to 0). The maximum number of alleles to create a single de novo locus (-max_locus_stacks option) was set at 3 for F1 and F2 individual and at 2 for F0 individual (DH, fully homozygous) in order to allow detection of paralogous sequence variants (PSV). The catalogue of loci was created, with F0 and F1 individuals, allowing one mismatch between samples (-n option). Calling individual genotypes was performed by matching individuals' stacks against the catalogue. Duplicated samples from the same biological individual that were genotyped twice due to low coverage in the first

sequencing process were treated separately, as different individuals, for the genotyping process and the sample with the highest loci coverage was retained for later quality control.

2.6. Quality control and duplicated loci removal

A first sorting on marker coverage with a very low threshold was performed on the 643 samples: all markers genotyped in more than 10% fish were kept. As F0 grandparents are expected to be homozygous, an heterozygous locus is likely to be a PSV and not a true SNP (Palti et al., 2014; Frasin et al., 2018). Thus, PSV were first filtered out by removing all markers that were heterozygous in at least two individuals from either G17^S or A03^R lines (F0 and control siblings). In a F2 cross, the expected distribution of allele is 50% of heterozygous (G17^S/A03^R), 25% of homozygous for each alternative allele G17^S and A03^R. All markers that departed from this expected distribution among the F2 individuals were discarded from the analysis (tested with a χ^2 at 5%).

From that point, in order to keep the largest number of markers for each trait, three different datasets were analyzed independently for genotype calling. The two first datasets corresponded to the 297 fish challenged by immersion (susceptible and resistant), and the 335 fish challenged by injection (susceptible and resistant) respectively. The last dataset included only the 75 resistant fish from the injection challenge that were resequenced with the Illumina HiSeq3000 technology. Those three datasets corresponded to three different ddRAD libraries produced separately and it is known that the size-selection step may influence the depth of coverage among loci (Andrews et al., 2016, Robledo et al., 2017) and thus, the reproducibility of marker detection. Indeed we observed an important "library effect" on the coverage of some markers. Consequently, the final quality control on minimum coverage of loci and individual was performed within each of the three dataset. Only loci with more than 80% of genotype calls and individuals with more than 90% of genotype calls were kept for the final analyses (Figure 2).

2.7. Construction of the linkage maps

The CarthaGène software (version 1.2, de Givry et al., 2005) was used to build three linkage maps, corresponding to the three dataset fish, with parameters for the group command set at 0.3 and 15 for two points distance and logarithm of the odds, respectively. Linkage groups were assigned to trout chromosomes by aligning sequences on the last published reference trout genome (Omyk_1.0) as described in Fraslin et al. (2018).

2.8. QTL detection

QTL mapping was performed chromosome by chromosome with the QTLMap software (version 0.9.8, Filangi et al., 2010) that performs QTL detection using an approximate likelihood ratio test (LRT, Le Roy et al., 1998) as described in Elsen et al. (1999).

STATUS was analyzed using the unitrait discrete distribution option (calcul = 2, Filangi et al., 2010) with values of 0 for susceptible and 1 for resistant fish. ENDURANCE and RESILIENCE were assessed using the Gaussian distribution option (calcul = 2, Filangi et al., 2010). RESISTANCE was assessed using the unitrait Cox model option (calcul = 7, Filangi et al., 2010) as described in Fraslin et al., (2018) with the A03^R origin taken as the reference for relative risk. Finally, BACTERIAL LOAD for fish that survived the injection challenge was assessed using the unitrait discrete distribution with values of 0 for negative sample and 1 for positive samples. Each phenotype within each challenge was analyzed separately. For the immersion protocol, all traits were analyzed using the complete data set with both survivors and dead fish (dataset 1, Figure 2). For the injection protocol, STATUS, ENDURANCE and RESISTANCE were analyzed using the second datasets, composed of both survivors and dead fish (dataset 2, Figure 2) while RESILIENCE and BACTERIAL LOAD were analyzed using the third dataset composed only of survivors (dataset 3, Figure 2).

The H1 hypothesis that one QTL affect the trait versus the null hypothesis (no QTL) was tested with an interval mapping method (Elsen et al., 1999) scanning the chromosome every 1cM. The F2 structure of the QTL family was coded into the software as a full-sib family with a unique F1 as both dam and sire, QTL

effects were estimated as the allelic substitution effects (Le Bras et al., 2011). We made no assumption on allele frequencies at the QTL. The effect of body weight at time of challenge on survival was tested for both routes of infection with the logistic regression on STATUS with the R software (version 3.4.2, R Core Team, 2013). It was significant only for the injection challenge and kept as co-factor in analyses on RESISTANCE, STATUS and ENDURANCE for this protocol. For the immersion protocol, QTL detection was carried out with aquarium as fixed effect for all traits.

For each trait and each chromosome the type-I error rejection threshold of H_0 at a chromosome-wide level was estimated with the Harrell and Davis, (1982) methods from empirical distribution of maximum LRT (LRTmax) obtained through 1,000 simulations or permutations (for the Cox option only) with a trait heritability set as 0.5 (Fraslin et al., 2018). QTL with $P \leq 0.01$ or $P \leq 0.001$ were retained as chromosome-wide, significant or highly significant, respectively. For RESILIENCE and BACTERIAL LOAD, chromosome-wide suggestive QTL ($P \leq 0.05$) were considered. For chromosome-wide highly significant QTL, the genome-wide suggestive ($P \leq 0.05$) and significance ($P \leq 0.01$) thresholds were estimated using the LRTmax distribution obtained under a 10.000 simulation/permutation under H_0 and a Bonferroni correction to adjust for the number of chromosomes tested (Fraslin et al., 2018). The Li method (Li, 2011) was used to estimate the 95% confidence interval. All LRTmax curves were visually inspected and when they showed two peaks, the hypothesis of two QTL versus one QTL was tested for all traits except RESISTANCE (not available with the Cox model), but it was never significant.

As the grandparents alleles were known, the lineage origin i.e. S (susceptible, G17^S) and R (Resistant, A03^R) of each QTL could be obtained. The homozygous or heterozygous status of all individuals at the QTL was obtained with the out_pded option (Filangi et al., 2010) of the QTLMap software. Percentage of phenotypic variance explained by a QTL was calculated, with a logistic regression for STATUS and RESISTANCE and with an ANOVA for ENDURANCE and RESILIENCE using the R software (R Core Team, 2013).

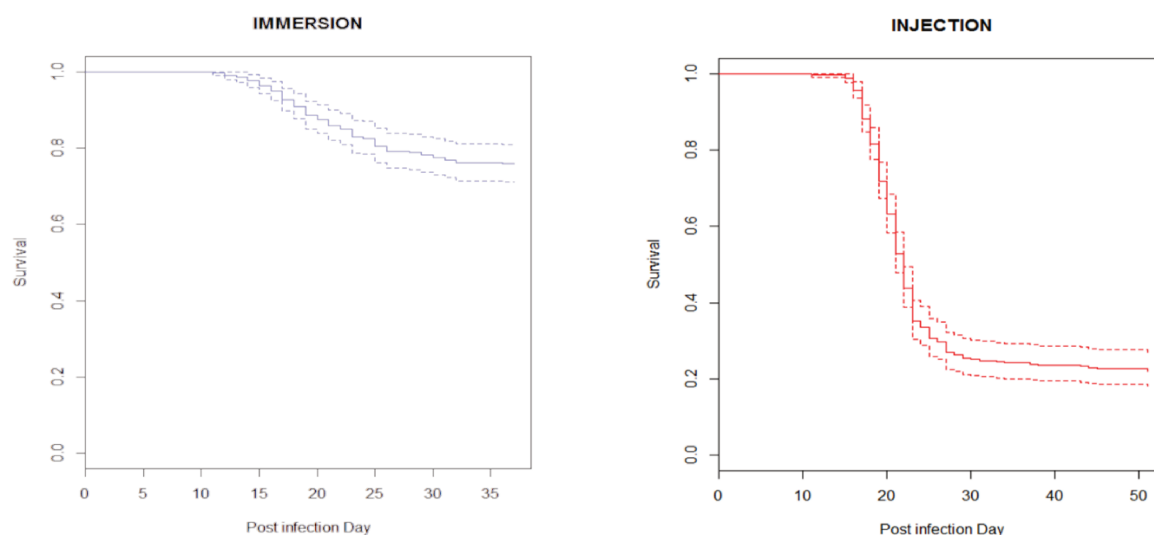
3. Results

3.1. Challenges and phenotyping

3.1.1. Survival

Both immersion and injection protocols were efficient to infect the fish, with mortality rates in the ranges recorded in previous experiments (Garcia et al., 2000) (Fraslin et al., 2018). Mortality started 11 days after infection for both routes of infection. Fish that died within the first two days after infection were removed from the dataset, as mortality was probably not due to *F. psychrophilum* (2 fish from the immersion protocol and 5 fish from the injection protocol). Final survival rate was 76.5% at day 31 and 22.7% at day 45 after immersion and injection respectively (Figure 1). Body weight at challenge had no significant effect on survival after the immersion protocol but had a significantly positive effect on final survival with resistant fish being bigger than susceptible fish (15.2 g vs. 13.1 g, respectively, $P < 0.001$).

Figure 1. Survival curves after infection of F2 fish by *F. psychrophilum*



(Kaplan-Meier estimation of survival function in the QTL F2 family after an infectious challenge. (Blue) Hazard function of fish challenged by immersion (36 days, 4 aquaria, $n=298$ fish, 92 susceptible and 206 resistant fish). (Red) Hazard function of fish challenged by injection (51 days, 1 aquarium, $n=331$ fish, 256 susceptible and 75 resistant fish)

3.1.2. Growth during and before the challenge as approximation for resilience

The Table 1 presents the results of body weight at the end of the infectious challenge and DGC_I calculated for infected fish after the two types of infection protocols. In average, the growth of fish was strongly reduced during the challenge particularly after the injection challenge.

Table 1. Descriptive statistics for body weight and Daily Growth Coefficient calculated on naïve fish and infected fish that survived immersion and injection challenges.

	N	Final body weight	DGC_N	DGC_I
Immersion				
Mean + SE	194	5.0 ± 0.1	0.72 ± 0.01	0.52 ± 0.02
Injection				
Mean + SE	67	23.3 ± 1.3	1.33 ± 0.03	0.67 ± 0.11

DGC_N calculated for naïve fish before the challenge (36 days for immersion, 30 days for injection)

DGC_I calculated for infected fish during the challenge (36 days for immersion, 51 days for injection)

At the individual level, 27% and 3% of the fish lost weight during the challenge after the injection and immersion protocols, respectively.

3.1.3. Bacterial load in the spleen of surviving fish

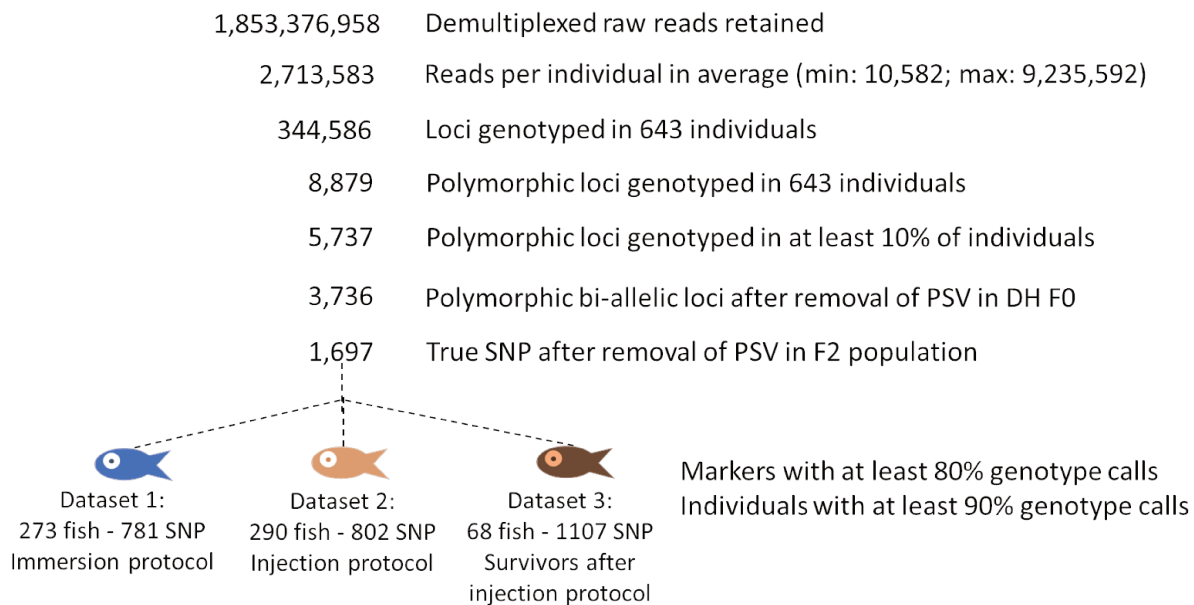
Only 7 fish out of 75 surviving fish had a positive bacterial load in the spleen after the injection protocol. The 7 fish with a positive bacterial load had an average DGC_I of $0.47 \text{ g/d} \pm 0.16$, whereas the 66 fish had no bacteria in the spleen had an average DGC_I of $0.72 \text{ g/d} \pm 0.12$ (ns).

3.2. ddRADseq, SNP calling and genotyping

In total 1,853,376,958 demultiplexed raw reads (2,713,583 reads per individual in average) were retained after removal of ambiguous barcode, low quality sequences and orphaned paired-end-reads. After the Stacks procedure, 344,586 loci were genotyped in 683 individuals among them 5,737 loci were polymorphic in at least 10% of the F2 individuals. A total of 1,697 true SNP were obtained in the F2 population after removal of PSV in the F0 population and markers that departed from expected 25/50/25 distribution. The dataset for

the immersion protocol contained 781 SNP genotyped in more than 80% of the individuals and 273 fish with at least 90% coverage. The dataset for the injection protocol contained 802 SNP genotyped in more than 80% of the individuals and 290 fish with at least 90% coverage. The last dataset that comprised only the resistant fish from the injection protocol contained 68 individuals with at least 90% coverage and 1107 SNP genotyped in more than 80% of the individuals. Figure 2 shows a summary of the ddRAD sequencing and quality control for all three datasets.

Figure 2. Summary of ddRAD sequencing and quality control for all fish from both injection and immersion protocols



Details of number of raw reads, loci, polymorphic loci and true SNP before and after quality controls for each of the three datasets

3.3. Linkage maps

Linkage maps 1, 2 and 3 were constructed for all fish from the immersion protocol, all fish from the injection protocol and only resistant fish from the injection protocol, respectively (Table A.1). Linkage groups were named after assignment to trout chromosome from the last genome assembly (Omyk_1.0). Linkage map 1 was composed of 31 linkage groups with 781 markers corresponding to 680 unique positions on the genetic map and covering 2,291 cM. Linkage map 2 was composed of 32 linkage groups with 774 markers

corresponding to 703 unique positions on the genetic map and covering 2,735 cM. Finally, linkage map 3 was composed of 999 markers corresponding to 649 unique positions on the genetic map and covering 2,194 cM over 32 different linkage groups. In all three maps, 2 linkage groups corresponded to each arm of chromosome 14 and in both linkage maps 2 and 3, chromosome 1 was also separated into two linkage groups. Finally, as expected from previous linkage analysis in the INRA SY population (Guyomard et al., 2006; Fraslin et al., 2018) chromosome 25 was also separated into two chromosomes. From that point, chromosomes 1, 14 and 25 that will be named Omy1a, Omy14a and Omy25a for their shorter arms and Omy1b, Omy14b and Omy25b for their longer arms.

3.4. Two QTL associated with different resistance traits after both immersion and injection protocols

In total, 5 QTL were associated with STATUT and RESISTANCE after the immersion protocol (Table 2) on chromosomes Omy2, Omy6, Omy12, Omy14 and Omy25a. Omy25a-QTL was also associated with ENDURANCE. This QTL explained 5.6 and 6.3% of the phenotypic variance of STATUS and RESISTANCE, respectively, and up to 19% of the phenotypic variance of ENDURANCE. Surprisingly, the favorable allele of this QTL originated from the susceptible G17^S line and individuals homozygous for this favorable allele survive, in average, 8.6 days longer than individuals homozygous for the unfavorable allele and 5.7 days longer than heterozygous individuals (Table 2).

The QTL on Omy6, highly significant at the genome level, was considered to govern both STATUS and RESISTANCE (close positions at 97 cM for STATUS and 107 cM for RESISTANCE, overlapping 95% CI and same favorable G17^S origin). This Omy6-QTL explained 14.5 and 8.2% phenotypic variance for STATUS and RESISTANCE, respectively (Table 2). The two QTL on Omy14 and Omy25a were highly significant (5% at the genome and 0.1% at the chromosome level, respectively) when associated with RESISTANCE. The other two QTL on Omy2 and Omy12, were less significant. They explained between 3.4 and 6.4% of phenotypic variance and their favorable allele originated from the A03^R grandparent. For

every QTL, the survival rate of individuals homozygous for the favorable allele at the QTL location was significantly higher than the survival rate of heterozygous individuals (Table 2).

After the injection protocol, only two QTL associated with STATUS were detected at a chromosome-wide-significant level on Omy12 and Omy13, explaining 5.9 and 3.5% of phenotypic variance respectively. Two QTL on Omy2 and Omy25a were associated with both ENDURANCE and RESISTANCE. Omy2-QTL explained less than 4% of phenotypic variance for both traits and Omy25a-QTL explained 7.2 and 9.8% of the phenotypic variance of ENDURANCE and RESISTANCE, respectively. Two QTL were associated with ENDURANCE only, on Omy4 and Omy21, explaining 5% of phenotypic variance or less. Finally, four additional QTL were detected as associated with RESISTANCE only, on Omy1, Omy9, Omy17 and Omy19, they all explained less than 5% of phenotypic variance (Table 2).

Three chromosomes carried QTL associated with different traits after both immersion and injection protocols. For the QTL on Omy2, markers that flanked the QTL within each protocol were quite distant (50.8 Mb and 52.7 Mb after immersion, 36.7 Mb and 41.0 Mb after injection, Table A.2), but as the two QTL had the same A03^R favorable allele origin and their 95% CI overlapped we would consider that it is a unique Omy2-QTL. For the two QTL on Omy 12, even if the two 95% CI overlapped, the two QTL flanking markers were distant from more than 30Mb between the QTL detected after the injection protocol (at 8.8 Mb) and the QTL detected after the immersion protocol (at 39.1 Mb and 40.2 Mb) (See Table A.2). We considered that those two QTL on Omy12 were different and we will refer as Omy12.1-QTL for the QTL associated with STATUS and detected after injection and as Omy12.2-QTL for the QTL detected after immersion and associated with STATUS and RESISTANCE (Table 2). Finally, Omy25a-QTL, was shared between the two protocols as the favorable allele origin was G17^S and position were very similar across the two protocols (Figure 3, Table 2).

Table 2. Results of QTL analyses for STATUS, ENDURANCE, RESISTANCE and RESILIENCE after an experimental infection using an immersion or an injection protocol

Trait	QTL	LRTmax	Position (cM)	CI (95%)	QTL effect	Favorable origin	% of phenotypic variance explained in the F2 progeny	Performance according to allele at QTL A03 ^R vs A03 ^S /G17 ^S vs G17 ^S
IMMERSION								
STATUS	Omy2	10.0**	38	0 – 73.4	0.16	A03 ^R	3.4%	86% ^a - 74% ^{ab} - 61% ^b
	Omy6	19.9*****	97	20.9 – 115.4	-0.25	G17 ^S	14.5%	61% ^a - 72% ^a - 94% ^b
	Omy12.2	12.7**	31	11.4 – 49.2	0.20	A03 ^R	6.4%	87% ^a - 74% ^b - 58% ^b
	Omy14	11.7**	0	0 – 21.6	0.18	A03 ^R	4.8%	91% ^a - 71% ^b - 67% ^b
	Omy25a	11.3**	18	0 – 52.6	-0.19	G17 ^S	5.6%	64% ^a - 74% ^a - 88% ^b
ENDURANCE	Omy25a	17.3***	6	0 – 24.2	-4.65	G17 ^S	19%	17.8 ^a - 20.7 ^b - 26.4 ^c
RESISTANCE	Omy2	9.2**	38	0 – 70.1	0.34	A03 ^R	3.4%	89% ^a - 72% ^b - 67% ^b
	Omy6	22.9*****	107	33.4 – 115.1	7.92	G17 ^S	8.2%	59% ^a - 74% ^b - 94% ^c
	Omy12.2	11.0**	34	0 – 51.6	0.29	A03 ^R	4.9%	87% ^a - 74% ^b - 60% ^b
	Omy14	14.6*****	0	0 – 11.8	0.21	A03 ^R	4.8%	91% ^a - 71% ^b - 67% ^b
	Omy25a	13.3***	17	0 – 52.4	4.63	G17 ^S	6.3%	63% ^a - 75% ^a - 89% ^b
RESILIENCE	Omy1	8.1*	76	0 – 76.0	0.08	A03 ^R	3.4%	0.61 ^a - 0.53 ^a - 0.44 ^b
	Omy7	7.3*	0	0 – 86.0	0.07	A03 ^R	4.1%	0.62 ^a - 0.48 ^b - 0.48 ^b
	Omy8	14.9**	75	33.2 – 87.3	-0.10	G17 ^S	5.8%	0.41 ^a - 0.52 ^b - 0.61 ^b
	Omy11	7.7*	15	0 – 92.5	0.07	A03 ^R	2.6%	0.58 ^a - 0.51 ^{ab} - 0.45 ^b
	Omy12.3	9.9*	82	23.4 – 103.0	-0.09	G17 ^S	4.8%	0.44 ^a - 0.52 ^a - 0.63 ^b
	Omy24.2	13.9***	63	26.4 – 63.0	0.10	A03 ^R	19.0%	0.64 ^a - 0.50 ^b - 0.45 ^b
INJECTION								
STATUS	Omy12.1	10.5**	0	0 – 103.4	0.21	A03 ^R	5.9%	21% ^a - 13% ^a - 3% ^b
	Omy13	9.8**	0	0 – 98	0.194	A03 ^R	3.5%	20% ^a - 13% ^{ab} - 5% ^b
ENDURANCE	Omy2	11.2**	26	10.6 – 73.9	1.24	A03 ^R	3.4%	22.6 ^a - 21.0 ^b - 20.3 ^b
	Omy4	13.8**	75	52.9 – 73.9	-1.39	G17 ^S	5.0%	20.2 ^a - 21.0 ^a - 23.1 ^b
	Omy21	12.1**	11	0 – 22.4	-1.35	G17 ^S	4.2%	20.2 ^a - 21.1 ^a - 22.8 ^b
	Omy25a	19.9*****	17	0 – 48.7	-1.78	G17 ^S	7.2%	20.2 ^a - 20.7 ^a - 23.5 ^b
RESISTANCE	Omy1	6.0**	33	0 – 44.5	1.55	G17 ^S	1.5%	10% ^a - 11% ^a - 18% ^a
	Omy2	11.3***	25	2.9 – 62.5	0.56	A03 ^R	2.3%	18% ^a - 13% ^{ab} - 6% ^b
	Omy9	9.2**	23	0 – 82	0.57	A03 ^R	4.4%	22% ^a - 9% ^b - 8% ^b
	Omy17	9.0**	76	0 – 100.3	1.63	G17 ^S	2.6%	7% ^a - 14% ^a - 19% ^a
	Omy19	10.0**	32	0 – 30	2.01	G17 ^S	7.0%	7% ^a - 12% ^a - 28% ^b
	Omy25a	13.0**	4	0 – 41.8	1.96	G17 ^S	9.8%	4% ^a - 15% ^b - 14% ^b
RESILIENCE	Omy24.1	6.6*	1	0-25.5	-0.41	G17 ^S	7.4%	0.29 ^a - 0.84 ^b - 1.00 ^c
	Omy29	6.8*	14	0-53.7	-0.39	G17 ^S	8.2%	0.4 ^a - 0.56 ^a - 1.17 ^b
BACTERIAL LOAD	Omy2	6.9*	33	9.8-94	0.67	G17 ^S	NA	NA
	Omy10	5.6*	0	0-79	-0.64	A03 ^R	NA	NA
	Omy20	6.4*	16	7.4-59.2	-0.68	A03 ^R	NA	NA

STATUS: survival status at the end of the challenge, analyzed as a binary trait with 0 = dead and 1 = survivors

ENDURANCE: time to death in days after infection for dead fish only, analyzed as a Gaussian trait

RESISTANCE: analyzed with a Cox model that takes into account failure time to death and final survival (censored observations)

RESILIENCE: DGC_I; measured only on resistant fish and analyzed as a Gaussian trait

BACTERIAL LOAD: analyzed as a binary trait with 0 = individual negative for Fp detection and 1 = individual positive for F. psychrophilum detection using real-time PCR

Chromosome-wide significance: * = P ≤ 0.05; ** = P ≤ 0.01; *** = P ≤ 0.001

Genome-wide significance: **** = P ≤ 0.05; ***** = P ≤ 0.01.

QTL effect measured as the relative risk for RESISTANCE (A03 as the reference, risk = 1), as the allelic substitution effect (Falconer and Mackay, 1996) for STATUS, ENDURANCE, RESILIENCE and BACTERIAL LOAD

% of variance explained for RESISTANCE and STATUS estimated with a logistic regression, for ENDURANCE and RESILIENCE estimated with an ANOVA.

Favorable origin corresponding to: better survival rate for STATUS, longer time to death for ENDURANCE, lower risk ratio for RESISTANCE, better DGC_I for RESILIENCE and lower bacterial load in the spleen for BACTERIAL LOAD

Final survival rate according to the allele calculated as: (number of surviving fish with allele 1) / (total number of fish with allele 1) (Fisher exact test, same letter = non-significant)

3.5. No common QTL between RESILIENCE and resistance traits after both immersion and injection protocols

After the immersion challenge, two QTL on Omy 8 and 24 were significantly associated with RESILIENCE and four QTL were only suggestive at the chromosome level on Omy 1, 7, 11 and 12 (Table 2). The two significant Omy8-QTL and Omy24-QTL explained 5.8% and 19% of phenotypic variance, respectively. The four suggestive QTL explained between 2.6 and 4.8% of phenotypic variance. After the injection challenge, only two suggestive QTL associated with RESILIENCE were detected on Omy24 and Omy29. Surprisingly, the QTL on Omy24 detected after the injection challenge was likely different from the QTL detected on the same chromosome after the immersion challenge as, the favorable alleles originated from opposite grandparents and their positions were very distant (8.9 Mb for Omy24.1-QTL in the injection protocol and 37.5 - 39.3 Mb for Omy24.2-QTL in the immersion protocol). Moreover their 95% CI did not overlap.

Three different QTL were likely detected on Omy12. The Omy12.3-QTL associated with RESILIENCE after an immersion protocol is different from the two QTL associated with resistance traits (STATUS, RESISTANCE) as they are distant from each other and the favorable allele of Omy12.3-QTL originated from the G17^S line whereas it originated from the A03^R line for both Omy12.1- and Omy12.2-QTL.

3.6. One QTL associated with both BACTERIAL LOAD, RESISTANCE and ENDURANCE after an experimental injection protocol

The three QTL detected for BACTERIAL LOAD were chromosome-wide suggestive only (located on chromosomes 2, 10 and 20, Table 5). The favorable allele originated from G17^S for Omy2-QTL and from A03^R for Omy10-QTL and Omy20-QTL. Omy10-QTL and Omy20-QTL were not detected before. This Omy2-QTL could correspond to the Omy2-QTL detected for resistance traits (similar position with one common flanking marker and overlapping intervals). However, favorable allele origin were different, as G17^S was associated with a lower bacterial load but with a higher susceptibility. This would indicate that

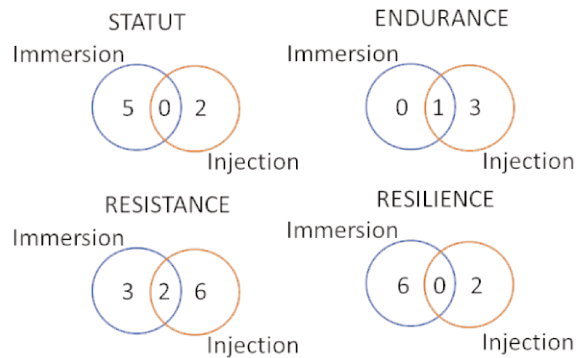
fish died from the disease even if they were able to eliminate the pathogen burden. Such an hypothesis is quite complicate to apprehend thus it is important to note that the Omy2-QTL associated with BACTERIAL LOAD was only suggestive at the chromosome wide level.

4. Discussion

In this study, we aimed at further characterizing the genetic architecture of rainbow trout response to *F. psychrophilum* by breaking down the host response in different components. Thus, we searched for QTL associated with not only survival at the end of the infectious challenge (STATUS) but also with ENDURANCE (corresponding to day of death), RESILIENCE (corresponding to growth during the challenge) and finally, the presence of bacteria in the spleen of surviving fish (BACTERIAL LOAD).

Most of the detected QTL were specific to the route of infection (Figure 3) as only 2 QTL associated with RESISTANCE and 1 QTL associated with STATUT was shared between injection and immersion. The QTL on Omy25a, associated with ENDURANCE and RESISTANCE after both infection protocols. Omy2-QTL was associated with both RESISTANCE, ENDURANCE and possibly BACTERIAL LOAD after the injection protocol.

Figure 3. Shared and specific QTL associated with different component of response to infection between the two infection protocols



Venn diagram that summarized the number of shared and specific QTL associated with different resistance traits between two experimental injection protocols with *F. psychrophilum*.

The low number of common QTL detected after both infection protocol is in accordance with a previous study we conducted in a cross between two other isogenic lines (Fraslin et al., 2018) where we suggested that different infection protocols trigger different resistance mechanisms (QTL specific to a protocol) with probably a common genetic response (shared QTL between protocols).

In this study, we detected 23 QTL associated with response to infection that were located on 18 chromosomes. All those 18 chromosomes have been previously reported to carry QTL associated with resistance traits in previous studies using both infection protocols (Fraslin et al., 2018) or only injection protocols (Campbell et al., 2014; Liu et al., 2015; Palti et al., 2015b; Vallejo et al., 2017b, 2014). However, 10 QTL, out of the 23 were located at distant position from other QTL mapped on the same chromosome. Among those 10 QTL, two QTL on Omy6 and Omy14 were detected only after the immersion challenge, and may be associated with immune mechanisms that are specifically triggered by an infection using immersion protocols. In the injection challenge, the QTL on Omy10 associated with BACTERIAL LOAD was never detected before. The other 13 QTL mapped closer to already known QTL and might very well correspond to already known QTL. Among them, Omy25a-QTL, which explained most of the phenotypic variance of RESISTANCE, ENDURANCE and STATUS in this study, was likely a shared resistance QTL

detected among different rainbow trout populations with different genetic backgrounds (Campbell et al., 2014; Johnson et al., 2008; Vallejo et al., 2014; Fraslin et al., 2018).

In this study, we also investigated the bacterial load of resistant fish that survived the challenge. The ability of a resistant fish to eliminate the pathogen is very important, as we do not want to select for healthy carriers that can act as a reservoir for a new outbreak. In the case of *F. psychrophilum*, as there is a probable vertical transmission of the bacterium from parent to offspring (Kumagai and Nawata, 2010; Kumagai and Takahashi, 1997; Long et al., 2014; Oplinger et al., 2015) it is particularly important to select broodstock with the ability to eliminate the pathogen. In total, only 7 fish that survived the injection protocol (out of 75) were reported to still carry *F. psychrophilum* in their spleen five days after the last mortality event occurred. It might be fish that eliminates the pathogen more slowly or that were infected with a greater concentration, indeed, as the bacterium keep multiplying between the first and the last injection fish that were injected the latest might have received a greater dose. However, bacteria may still be present at low level in negative fish. Nevertheless, results show that most of the fish that survived were able to efficiently control the bacterium during the experiment.

We only detected three suggestive QTL associated with bacterial load in surviving fish after the injection protocol. The limited power of the analysis, due to the high mortality following the injection protocol and the small number of fish available is probably responsible for this result. With a higher number of fish, we would probably have detected more QTL or confirm those detected in this study.

To the best of our knowledge, our study is the first to detect QTL associated with RESILIENCE to a pathogen in rainbow trout. As we did not detect any common QTL between the three resistance traits (STATUT, ENDURANCE and RESISTANCE) and RESILIENCE, in this study, this suggest that resistance and resilience are partly controlled by different genetic determinisms. This hypothesis is in accordance with the trade-off between resistance and resilience or tolerance that was found using theoretical or experimental approaches (Mauricio et al., 1997; Pilson, 2000; Råberg et al., 2007; Simms and Triplett, 1994; Yáñez et

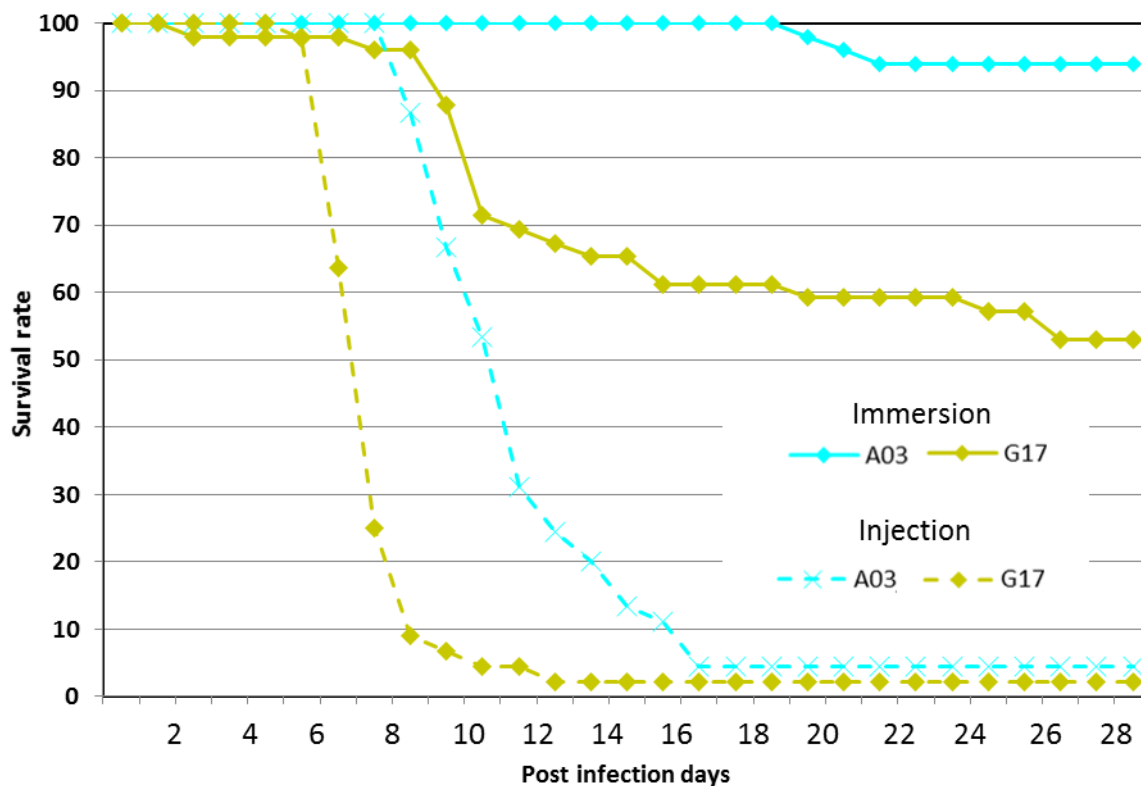
al., 2010). As a consequence, improving host fitness through selective breeding would perform better if both resistance and tolerance were targeted together.

5. Conclusion

In this study, we confirmed that rainbow trout response to infection with *Flavobacterium psychrophilum* is a complex trait that involves many QTL with moderate effects. We also confirmed that experimental infection using injection or immersion protocol trigger different immune mechanisms, as only two QTL were common between both protocols. To the best of our knowledge, this study is the first one to detect QTL associated with RESILIENCE in rainbow trout. As no QTL were common between resilience and resistance traits, the results support the hypothesis that resistance, and resilience are two different traits with partly different genetic control.

Appendices:

Fig. A.1. Survival curves of A03^R and G17^S grandparents isogenic lines



Survival curves after infection by immersion (–) and injection (– – –) of fish from both A03^R and G17^S isogenic lines

In the injection protocol, fish were infected with ~ 450 cfu/fish

Table A.1. The three linkage maps for the three data sets (non include)

Table A.2. All QTL detected associated with resistance traits after experimental infection using immersion and injection protocols

(Non include voir Annexe 4)

Messages principaux de l'EXP1 : la réponse à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum* est contrôlée par des déterminants génétiques en partie distincts

Dans cet article plusieurs composants de la résistance globale à *F. psychrophilum* sont étudiés:

- **STATUT** : (mort/vivant) qui correspond à la **survie en fin d'épisode infectieux**
- **ENDURANCE** : qui correspond à la **date de mort des individus sensibles** (qui meurent)
- **RESISTANCE** : qui cumule les informations portées par le STATUT et l'ENDURANCE dans une **analyse de survie** (modèle de Cox)
- **RESILIENCE** : qui correspond au taux de **croissance des survivants pendant l'épisode infectieux**
- **PORTAGE** : qui correspond à la **présence de *F. psychrophilum* dans la rate** des individus résistants (qui survivent) 5 jours après la dernière mortalité

PRINCIPAUX RESULTATS

12 QTL associés au STATUT et à la RESISTANCE (4 + 8)

- Omy2-QTL et Omy25a-QTL commun à la **balnéation** et l'**injection**

4 QTL associés à l'ENDURANCE

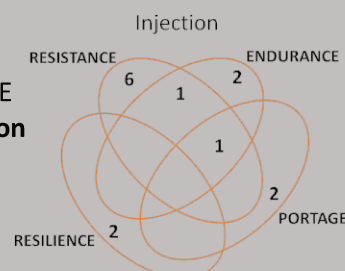
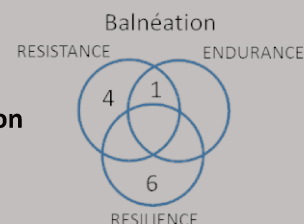
- Omy25a-QTL commun aux deux méthodes d'infection
- 1 QTL commun avec STATUT ou RESISTANCE par **balnéation**
- 2 QTL commun avec STATUT ou RESISTANCE par **injection**

8 QTL associés à la RESILIENCE

- Pas de QTL commun aux deux méthodes d'infection
- Pas de QTL commun avec STATUT, RESISTANCE ou ENDURANCE

3 QTL (tous suggestifs) associés au PORTAGE dans la rate après injection

- Omy2-QTL, commun avec RESISTANCE et ENDURANCE



PRINCIPALES CONCLUSIONS

- ✓ L'identification de 27 QTL associés aux différents caractères de réponse est en faveur d'une architecture polygénique de la réponse à l'infection.
- ✓ L'identification de 6 QTL après l'infection par **balnéation**, 12 QTL après l'**injection** et d'uniquement deux QTL partagés suggère l'existence de mécanismes de résistance spécifiques de la voie d'infection.
- ✓ Le petit nombre de QTL communs entre les différentes composantes de la réponse à l'infection indique que la **résistance globale** et **résilience** sont gouvernées par des déterminants génétiques en partie distincts.
- ✓ La faible proportion d'individus survivants avec une charge bactérienne détectable post-infection par injection suggère que le contrôle de la prolifération bactérienne est effectif à ce stade de l'infection chez les individus qui ont survécu.

Cette étude est la première à rechercher des QTL pour les différentes composantes de la réponse de la truite arc-en-ciel à une infection par *F. psychrophilum* et à détecter des QTL associés à la résilience.

3.1.1.2. Résultats complémentaires : infection expérimentale par injection et balnéation de la famille HD-(A02^R/A36^S) (EXP2)

3.1.1.2.1. Résumé des matériels et méthodes

Cette expérience a été conduite avec un autre croisement HD-(A02^R/A36^S), avec l'objectif d'étendre les résultats dans un fond génétique différent. Le protocole expérimental est identique à celui de l'EXP1 : application des deux modes d'infection expérimentale, et génotypage par ddRADseq (préparation des librairies au Roslin Institute et séquençage à BMR Genomics), le détail des matériels et méthodes est disponible en Annexe 2.

Brièvement, 300 individus ont été infectés par balnéation ($1,6 \cdot 10^9$ cfu/mL) et 325 par injection intramusculaire (200 cfu/poisson au début de l'infection et 500 cfu/poisson à la fin de l'infection) à des poids moyens de 3,1 g ($\pm 0,2$) et 6,4 g ($\pm 0,1$) respectivement. Pour les deux protocoles, la mortalité a débuté au 7^e jour et a été relevée quotidiennement pendant 32 et 28 jours pour l'infection par balnéation et injection, respectivement. Malgré l'ajustement de la dose infectieuse pour tenir compte de la forte virulence de la souche de *F. psychrophilum* utilisée (FRGDSA 1882/11), la mortalité suite à l'injection a été foudroyante (3% de survivants) (Figure 24). La petite taille des poissons au moment de l'infection, et sans doute aussi l'extrême sensibilité de la lignée A36^S, peuvent expliquer ce résultat. Quoiqu'il en soit, le très petit nombre de survivants n'a pas permis d'effectuer la recherche de QTL liés au STATUT et à la RESILIENCE pour l'infection par injection.

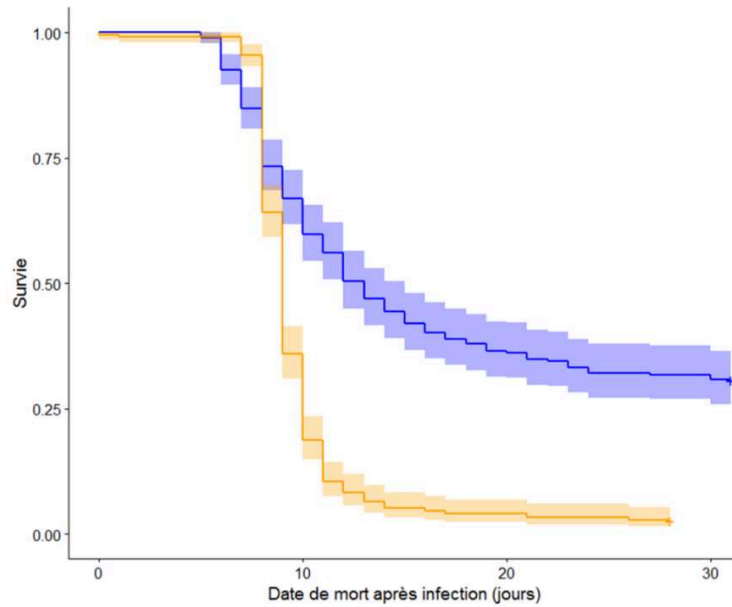


Figure 24. EXP2 : Courbes de mortalité des individus HD-(A02^R/A36^S) après une infection expérimentale par baignation (courbe bleue) et par injection (courbe orange).

Pour chacun des deux protocoles infectieux, les poissons ont été individuellement identifiés par marque magnétique interne (Nonatag). Les poissons infectés par baignation ont été pesés 20 jours avant l'infection et au moment de l'infection pour calculer le DGC_N selon la formule employée dans l'EXP1. Les poissons ayant survécu à l'infection par baignation ont été pesés à la fin de l'expérimentation pour calculer le DGC_I (Tableau 3). Les deux taux de croissance avant et après infection ne sont pas corrélés. L'effet du poids à l'infection sur la survie ou la date de mort (endurance) a été testé par ANOVA et régression logistique et n'était jamais significatif.

Tableau 3. EXP2 : Statistiques descriptives du poids, de la croissance et du taux de survie des individus HD-(A02^R/A36^S) infectés par baignation et injection.

Protocole infectieux	N	Poids au Marquage	Poids au début de l'expérimentation	Poids à la fin de l'expérimentation	DGC_N	DGC_I	Survie finale
Baignation	300	$1,1 \pm 0,3$	$3,1 \pm 1,1$	$4,6 \pm 1,8$	$1,1 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,4$	30%
Injection	325	$3,2 \pm 0,9$	$6,4 \pm 2,0$	$7,8 \pm 2,1$	NA	NA	3%

N = nombre de poissons dans les différents protocoles

DGC_N : taux de croissance journalier pour les individus naïfs mesuré avant l'épisode infectieux.

DGC_I : taux de croissance journalier pour les individus infectés mesuré pendant l'épisode infectieux.

Génotypage et construction de la carte génétique : après avoir appliqué les contrôles qualités (Annexe 2) sur les marqueurs et les individus, le jeu de données contenait 1 479 SNP, et 296 et 288 individus pour la balnéation et l'injection, respectivement. Une carte génétique unique de 2 370,6 cM a été construite avec le logiciel Carthagène (de Givry et al., 2005). Sur les 1 479 SNP, 761 SNP correspondaient à une position unique sur la carte et étaient répartis sur 31 groupes de liaison correspondant à 30 chromosomes. Les chromosomes 4 et 14 étaient séparés en 2 groupes de liaison et aucun groupe de liaison ne correspondant au chromosome 23.

Détection de QTL : la détection de QTL a été réalisée comme dans l'EXP1 (§ 3.1.1.1) pour les caractères STATUT, ENDURANCE, RESISTANCE et RESILIENCE pour le challenge par balnéation et uniquement pour les caractères ENDURANCE et RESISTANCE pour les individus infectés par injection. Pour ces derniers, lorsque la courbe de LRTmax présentait plusieurs pics, la présence de deux QTL sur le chromosome a été testée (option qtl = 2 : "H1 = 1 QTL sur le chromosome" vs. "H2 = 2 QTL sur le chromosome" (Filangi et al., 2010)). Cette option n'étant disponible que pour les caractères gaussiens, le test été réalisé avec la variable DDM (date de morts) en attribuant la date de morts aux individus mort et la valeur J+1 aux individus survivants (J= jour de la dernière mortalité enregistrée). Pour les deux protocoles, un effet fixe (aquarium) a été inclus dans le modèle d'analyse.

3.1.1.2.2. Détection de QTL associés à la réponse à l'infection

Après l'infection par balnéation, plusieurs QTL communs aux caractères de résistance (STATUT, ENDURANCE et RESISTANCE) et des QTL associés uniquement à la RESILIENCE

Après l'infection par balnéation, 3 QTL associés au STATUT (dont deux seulement suggestifs au niveau du chromosome) sont détectés sur Omy17, Omy25a et Omy28 (Tableau 4). Le QTL sur Omy25a n'est associé qu'au STATUT. Le QTL sur Omy17, le plus significatif et qui contribue le plus à la variance phénotypique (5,1%) est aussi associé à l'ENDURANCE (7,2% de la variance phénotypique expliquée) et, logiquement, à la RESISTANCE qui combine les deux caractères. Le QTL sur Omy28 est associé au STATUT et à la RESISTANCE, il explique moins de 2% de la variance phénotypique des deux caractères.

Deux QTL associés uniquement à l'ENDURANCE sont détectés sur Omy3 et Omy16 et un QTL uniquement associé à la RESISTANCE est détecté sur Omy18. Le QTL sur Omy16 explique 7,6% de la variance phénotypique de l'ENDURANCE. De façon surprenante, l'allèle favorable à ce QTL provient du grand-parent

sensible (A36^S), pourtant issu de la lignée isogénique la plus sensible de toute la collection (Figures 21 et 22).

Enfin, trois QTL associés à la RESILIENCE sont détectés sur les chromosomes 7, 12 et 17 (Tableau 4). Les deux QTL sur Omy7 et Omy12 sont nouveaux dans ce croisement HD-(A02^R/A36^S). Le QTL sur Omy7 est positionné à l'extrémité des intervalles de confiance du QTL sur Omy17 pour les caractères STATUT, l'ENDURANCE et RESISTANCE, ce qui ne permet pas de conclure de manière définitive sur l'existence ou non d'un unique QTL qui gouvernerait tous les caractères de réponse. Compte-tenu des écarts importants de localisation, l'hypothèse 2 QTL est privilégiée, et le QTL associé au STATUT, à l'ENDURANCE et la RESISTANCE sera nommé Omy17.1 et le QTL associé à la RESILIENCE nommé Omy17.2.

Après l'infection par *injection*, 5 QTL communs entre ENDURANCE et RESISTANCE

Après l'infection par injection, 5 QTL associés à l'ENDURANCE sont détectés sur 4 chromosomes (Omy3, 10, 17 et 18), dont deux sur Omy3, nommés Omy3.1 (19,87 - 21,45 Mb) et Omy3.2 (52,99 - 54,11 Mb) (Tableau 4). Les 3 QTL les moins significatifs expliquent une part infime de la variance phénotypique (entre 0,9 % et 1,1 %), les QTL Omy17 et Omy3.2 allant respectivement jusqu'à 4,3% et 7% de variance expliquée.

Pour la RESISTANCE, 9 QTL sont détectés sur 8 chromosomes, dont deux QTL sur Omy3 (suite à l'analyse 2 QTL, nommés Omy3.1 et Omy3.2), qui sont partagés avec l'ENDURANCE. Ces deux QTL Omy3.1 et Omy3.2 ont des allèles favorable d'origine opposée : A36^S est l'allèle favorable au QTL Omy3.1 et A02^R est l'allèle favorable au QTL Omy3.2 qui est nettement plus significatif. Dans cette expérience, tous les QTL d'ENDURANCE sont aussi des QTL de RESISTANCE, ce qui s'explique aisément par la très faible survie (3%) suite à l'infection (les survivants apportent très peu d'information complémentaire). En revanche, pour l'infection par balnéation, seul le QTL le plus significatif (Omy17.1) est commun à l'ENDURANCE et aux deux autres caractères (STATUT et RESISTANCE).

Tableau 4. EXP2 : QTL associés aux différents caractères de réponse à une infection expérimentale par balnéation et par injection dans la famille HD-(A02^R/A36^S)

	QTL	Position des marqueurs flanquant (Mb)	Intervalle de confiance (Mb)	LRTmax et significativité	Effet du QTL	Origine de l'allèle favorable	% variance expliquée
BALNEATION							
STATUT	Omy17.1	19,98 - 20,86	14,79 - 39,47	18,3*****	0,19	A02 ^R	5,1%
	Omy25a	17,56 - 32,42	4,49 - 39,45	8,2*	0,14	A02 ^R	2,3%
	Omy28	7,09 - 7,09	0,0 - 29,15	8,6*	0,14	A02 ^R	1,8%
ENDURANCE	Omy3	72,60 - 72,60	52,99 - 80,29	13,6**	1,3	A02 ^R	6,3%
	Omy16	0,0 - 3,78	0,0 - 11,13	19,1***	-1,7	A36 ^S	7,6%
	Omy17.1	17,32 - 17,99	15,47 - 42,39	16,9***	1,5	A02 ^R	7,2%
RESISTANCE	Omy17.1	19,98 - 20,86	15,47 - 35,11	24,2*****	0,49	A02 ^R	5,1%
	Omy18	31,10 - 32,74	9,68 - 47,99	8,5*	0,66	A02 ^R	1,8%
	Omy28	17,56 - 32,42	4,79 - 39,45	6,0*	1,47	A36 ^S	1,8%
RESILIENCE	Omy7	18,55 - 20,83	11,44 - 37,16	11,1**	0,12	A02 ^R	5,3%
	Omy12	43,36 - 47,81	25,87 - 68,79	10,5*	-0,11	A36 ^S	10,5%
	Omy17.2	38,26 - 39,47	15,47 - 71,16	10,7*	0,13	A02 ^R	2,2%
INJECTION							
ENDURANCE	Omy3.1	19,87 - 21,45	14,12 - 80,29	6,5*	-0,31	A36 ^S	1,3%
	Omy3.2	52,99 - 54,11	48,18 - 67,53	13,0**	0,41	A02 ^R	7,0%
	Omy10	57,31 - 60,13	41,23 - 60,32	11,7**	-0,38	A36 ^S	0,9%
	Omy17.1	19,98 - 20,86	8,38 - 38,26	17,4*****	0,45	A02 ^R	4,3%
	Omy18	32,74 - 32,74	9,68 - 47,99	12,8**	0,37	A02 ^R	1,1%
RESISTANCE	Omy1	61,27 - 68,06	22,32 - 77,99	6,6**	0,70	A02 ^R	NA
	Omy2	19,82 - 22,41	0,16 - 66,60	7,1**	1,40	A36 ^S	NA
	Omy3.2	59,69 - 60,01	48,18-70,77	17,5*****	0,59	A02 ^R	NA
	Omy10	60,13 - 60,32	7,61-60,32	5,6*	1,34	A36 ^S	NA
	Omy12	43,36 - 47,81	18,04 - 80,95	7,4**	0,71	A02 ^R	NA
	Omy17.1	17,32 - 17,99	15,47 - 42,39	20,1***	0,57	A02 ^R	NA
	Omy18	22,42 - 26,39	9,68 51,23-	6,5**	0,73	A02 ^R	NA
	Omy28	17,56 - 32,42	4,69 - 39,45	7,6**	1,45	A36 ^S	NA
DDM	Omy3.1	29,19 - 32,79	14,12 - 80,29	12,6**	-0,65	A36 ^S	2,6%
	Omy3.2	52,99 - 54,11	48,18-67,53	21,6*****	1,04	A02 ^R	7,0%

STATUT : survie à la fin de l'expérimentation analysé avec un modèle binaire (0 = mort ; 1 = survivants).

ENDURANCE : date de mort pour les individus sensibles uniquement, analysée avec un modèle gaussien.

RESISTANCE : analyse de survie analysée à l'aide d'un modèle de Cox.

RESILIENCE : mesurée comme DGC pendant l'infection uniquement pour les individus ayant survécu à l'infection expérimentale par balnéation, analysée avec un modèle gaussien.

DDM : uniquement pour les 28 pour les individus ayant survécu à l'infection par injection, pour la détection de 2 QTL sur Omy3, analysés avec un modèle gaussien.

Significativité au niveau du chromosome : * = P ≤ 0,05, ** = P ≤ 0,01, *** = P ≤ 0,001,

Significativité au niveau du génome : **** = P ≤ 0,05, ***** = P ≤ 0,01.

Effet du QTL mesuré comme le risque relatif pour la RESISTANCE (A36^S comme référence, risque relatif = 1), calculé comme la moitié de l'effet de substitution allélique pour le STATUT, la DDM, l'ENDURANCE et la RESILIENCE.

% de variance phénotypique expliquée par le QTL, estimée avec une régression logistique pour les caractères RES et STATUT et avec une ANOVA pour la TTD, l'ENDURANCE et la RESILIENCE.

Trois QTL associés au STATUT, à l'ENDURANCE et/ou à la RESISTANCE communs aux deux protocoles infectieux

Le QTL Omy17.1 associé aux 3 caractères de résistance (STATUT, ENDURANCE et RESISTANCE) après la balnéation est le même que le QTL sur Omy17 associé à la RESISTANCE après l'injection. Le QTL de RESISTANCE sur Omy18 après balnéation est aussi associé à la RESISTANCE et l'ENDURANCE par injection. Enfin, le QTL Omy28, associé au STATUT et à la RESISTANCE après balnéation est associé à la RESISTANCE après injection. Le QTL sur Omy3 associé à l'ENDURANCE après la balnéation semble différent des deux QTL Omy3.1 et Omy3.2 associés à l'ENDURANCE et la RESISTANCE après l'injection (positionné hors de l'IC à 95% des 2 QTL, Tableau 4, Figure 25).

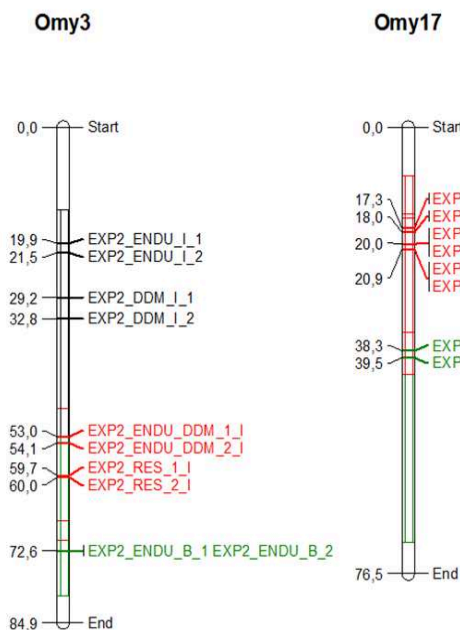


Figure 25. EXP2 : Position des différents QTL associés au STATUT, à l'ENDURANCE, à la RESISTANCE et à la RESILIENCE sur les chromosomes Omy3 et Omy17

Sur Omy3 : les marqueurs flanquants du QTL Omy3.1 sont indiqués en noir. Les marqueurs flanquants du QTL Omy3.2 sont indiqués en rouge après l'injection (I) et en vert après la balnéation (B).

Sur Omy17 : les marqueurs flanquants du QTL Omy17.1 sont indiqués en rouge, ceux du QTL Omy17.2 en vert

Les caractères associés sont indiqués par
 ENDU = ENDURANCE, RES = RESISTANCE en
 RESIL = RESILIENCE
 La méthode d'infection est indiquée par _I pour
 l'injection et _B pour la balnéation

Ainsi, 3 des 5 QTL associés au STATUT, à l'ENDURANCE et/ou à la RESISTANCE, après balnéation sont aussi détectés après l'injection. Or, la mortalité dans cette expérience après l'infection par balnéation est relativement élevée. Cette mortalité peut s'expliquer une dose infectieuse forte (de l'ordre de 10^9 cfu/mL) ainsi que par une sensibilité générale apportée par la lignée A36⁵. Cette lignée est en effet particulièrement vulnérable à la bactérie, même après une infection par balnéation (Figures 21 et 22).

Une hypothèse pouvant expliquer cette relativement grande proportion de QTL communs dans l'EXP2 serait donc que, pour cette expérience particulière, la balnéation a conduit à un niveau important de

pénétration initiale de la bactérie. Les mécanismes de défense externe des poissons, normalement sollicités par la balnéation, auraient été « dépassés » par l'infection, et le relais aurait été rapidement pris par des mécanismes plus en aval de la réponse immunitaire qui ont contribué aux différences de sensibilité. Ces mécanismes étant identiques à ceux sollicités dans le cas d'une infection par injection, nous détectons un grand nombre de QTL communs entre balnéation et injection.

Enfin, le QTL sur Omy12 associé à la RESILIENCE suite à la balnéation et le QTL associé à la RESISTANCE suite à l'injection semblent identiques (même position). Cependant, l'allèle favorable pour la RESISTANCE après l'injection provient de la lignée A02^R tandis que l'allèle favorable, qui permet aux poissons d'être résilients après infection par balnéation provient de la lignée A36^S. Cependant, il est difficile de comparer ces mécanismes puisque le QTL de RESILIENCE est détecté après la balnéation tandis que le QTL de RESISTANCE est détecté après l'injection, il pourrait d'agir de QTL différents. Enfin, par injection la mortalité étant très importante, les QTL de RESISTANCE sont surtout liés à l'endurance.

La figure 26 illustre la répartition des QTL détectés après l'infection par balnéation (bleu) ou injection (orange) pour les différents caractères de réponse à l'infection.

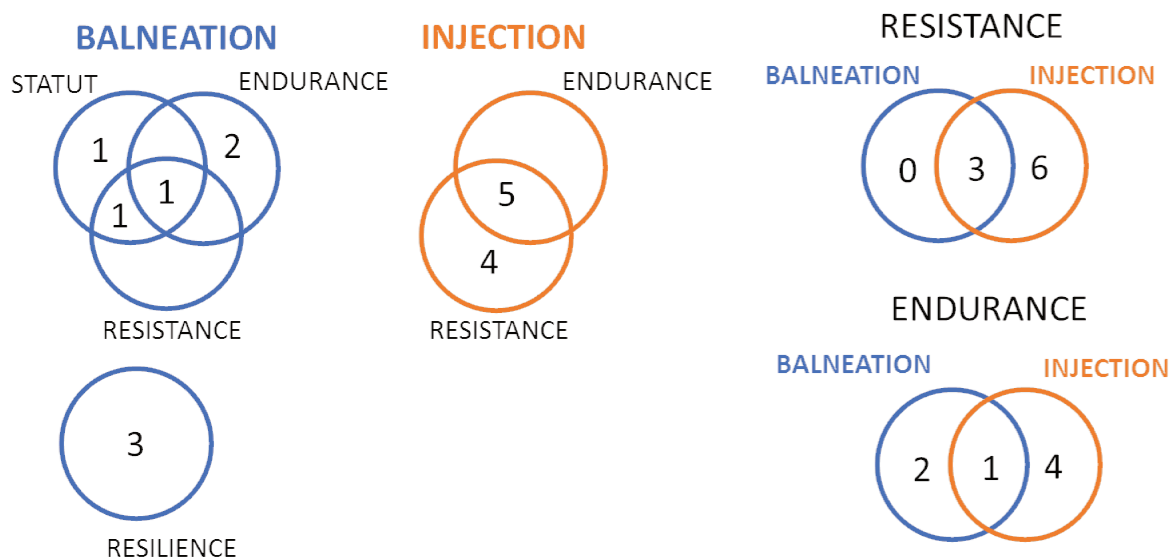


Figure 26. EXP2 : QTL associés à différents caractères de la réponse à l'infection expérimentale par balnéation ou injection de TAC par *F. psychrophilum*

Les diagrammes de Venn résument le nombre de QTL communs et/ou spécifiques à un caractère STATUT, RESISTANCE, ENDURANCE et RESILIENCE ainsi que le nombre de QTL communs et/ou spécifiques aux deux protocoles infectieux (pour l'injection, les deux QTL Omy3.1 et Omy3.2 détectés avec la DDM sont inclus dans la RESISTANCE)

Deux QTL communs entre les deux fonds génétiques

Parmi les 23 chromosomes sur lesquels nous avons positionnés des QTL associés aux composantes de la réponse dans les deux familles HD-(A02^R/A36^S) et F2-(A03^R/G17^S), 7 chromosomes sont porteurs de QTL détectés dans les deux familles. Pour cinq d'entre eux (Omy1, Omy2, Omy7, Omy10, et Omy17), les QTL dans les deux familles ont des positions très différentes, même si la taille des intervalles de confiance ne permet pas de conclure avec certitude à des QTL distincts. Enfin, les deux derniers QTL sont communs dans les deux familles.

Le QTL Omy12.2, associé au STATUT et à la RESISTANCE après l'infection par balnéation dans l'EXP1 semble identique au QTL sur Omy12 associé à la RESILIENCE après la balnéation et la RESISTANCE après l'infection dans l'EXP2 (Figure 27). Le QTL sur Omy25a, associé au STATUT, à l'ENDURANCE et à la RESISTANCE après balnéation et à l'ENDURANCE et à la RESISTANCE après injection dans l'EXP1 est identique au QTL associé au STATUT après balnéation dans l'EXP2.

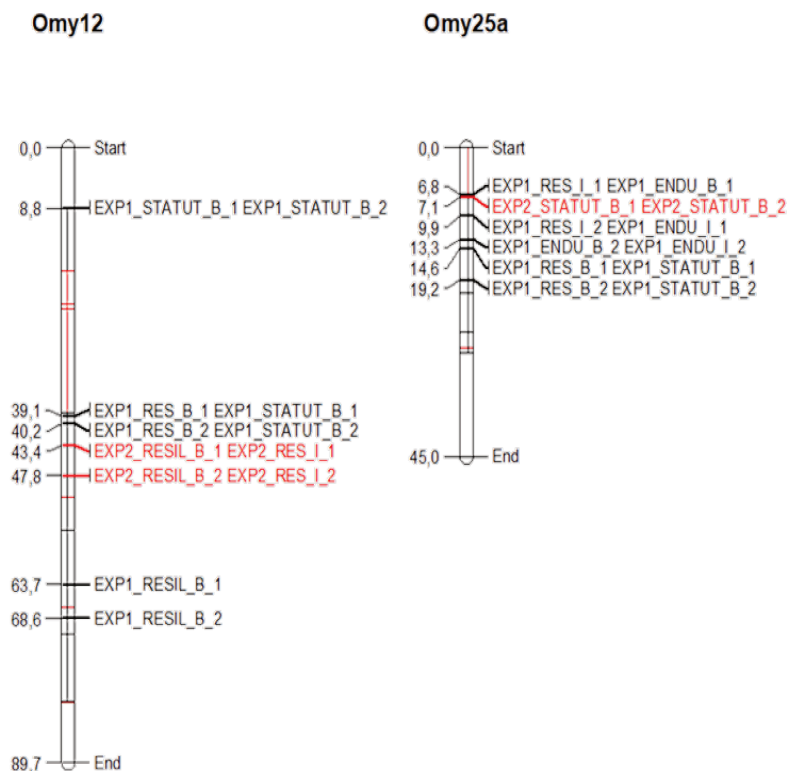


Figure 27. Positions des deux QTL commun, détectés dans les EXP1 et EXP2 sur les chromosomes 12 et 25a

Les marqueurs flanquants des QTL détectés dans l'EXP1 sont indiqués en noir, ceux dans l'EXP 2 en rouge.

Omy12.1 positionné à 8.8 Mb.

Omy12.2 positionné entre 39.1 et 47.8 Mb.

Omy12.3 positionné entre 63.7 et 68.6 Mb

Omy25a positionné entre 6.8 et 19.2 Mb.

Les intervalles de confiance sont matérialisés par les traits à l'intérieur du chromosome.

Les caractères associés sont indiqués par

ENDU = ENDURANCE, RES = RESISTANCE en RESIL = RESILIENCE

La méthode d'infection est indiquée par _I pour l'injection et _B pour la balnéation

3.1.1.3. Discussion : les différentes composantes de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum*

Les résultats obtenus à l'issue de ces deux premières expériences (EXP1 et EXP2) nous permettent de dresser une première image de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum* chez la TAC et des principaux déterminants génétiques sous-jacents.

Pour étudier la réponse des TAC à l'infection, nous avons infecté expérimentalement deux familles en utilisant deux modes d'infection expérimentale, la balnéation et l'injection. Puis, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la résistance globale que nous avons étudiée sous l'angle de la survie finale (STATUT : mort/vivant), l'ENDURANCE et enfin d'une analyse de survie permettant de combiner les deux informations (la RESISTANCE). Nous avons ensuite étudié la résilience qui permet d'étendre l'analyse de la réponse à l'infection. Enfin, nous nous sommes intéressés au portage bactérien dans la rate d'individus ayant survécu à une infection par injection.

Nous avons détecté 35 QTL, sur 23 chromosomes, associés à différentes composantes de la réponse à l'infection dont seulement 2 QTL commun dans les deux fonds génétiques.

La résilience et la résistance sont deux caractères gouvernés par des déterminants génétiques en partie distincts

Dans nos deux expériences, nous ne détectons qu'un unique QTL associé à la fois à la résilience et à la résistance. Ce QTL, sur Omy12, semble partagé entre les deux fonds génétiques, dans l'EXP1 (Omy12.2) il est associé au STATUT et à la RESISTANCE après balnéation et dans l'EXP2 il est associé à la RESISTANCE par injection et à la RESILIENCE par balnéation. Les positions sur le génome de ces deux QTL sont très proches mais les intervalles de confiance relativement larges pourraient révéler deux QTL différents (Figure 27).

Au sein de l'EXP2, pour le QTL Omy12.2, l'origine favorable de l'allèle diffère selon le caractère, ce qui révèle potentiellement des mécanismes immunitaires qui mobilisent l'ensemble des ressources pour permettre aux hôtes de survivre et donc ne les ressources sont limitées pour la croissance. Les individus résistant semblent donc avoir une faible résilience. Cette hypothèse est appuyée par différentes études mettant en évidence l'existence d'un compromis entre la résistance et la tolérance/résilience. Dans ces études, la tolérance/résilience est mesurée comme la pente de la droite de régression linéaire entre la

performance et le niveau d'infection (tolérance, Råberg et al., 2007) soit comme la différence de performance entre un individu sain et un individu infecté (résilience, Fineblum et Rausher, 1995; Yáñez et al., 2010).

Aucun autre QTL contrôlant à la fois la RESILIENCE, le STATUT, l'ENDURANCE ou la RESISTANCE n'a été détecté dans notre étude. Il est cependant possible que certains QTL communs à ces caractères et avec un effet moins important n'aient pas été détecté à cause d'une puissance de détection limitée, due notamment à une très forte mortalité par injection.

Ainsi, nos résultats semblent indiquer que la résilience et la résistance sont deux caractères distincts, majoritairement contrôlés par des déterminismes génétiques spécifiques.

Une partie des mécanismes de défense contre l'infection par *F. psychrophilum* ne sont stimulés que par un mode d'infection

Dans l'EXP1, avec seulement deux QTL associés à la RESISTANCE et/ou au STATUT communs entre les deux voies d'infection, la majorité des QTL associés à un caractère après injection n'étaient pas détectés suite à la balnéation. Dans l'EXP2, 3 QTL associés au STATUT et/ou à la RESISTANCE étaient communs entre les deux protocoles contre 2 QTL détectés uniquement après la balnéation et 4 uniquement après l'injection et tous les QTL d'ENDURANCE étaient spécifiques au mode d'infection. Dans le cas des QTL détectés uniquement après la balnéation, il peut s'agir de mécanismes immunitaires liés aux protections externes comme la peau ou le mucus. Dans le cas des QTL détectés uniquement par injection, il peut s'agir de mécanismes en aval de la cascade immunitaire, qui ne sont sollicités que quand les mécanismes immunitaires liés aux premières étapes de l'infection n'ont pas suffi à endiguer l'infection. Il peut aussi s'agir de mécanismes immunitaires qui sont déclenchés quand l'infection est trop importante et que le système immunitaire est dépassé par la charge bactérienne (par injection on infecte les individus avec une dose plus importante). Il semble donc qu'une grande partie de la réponse à l'infection soit spécifique au protocole infectieux. Cependant, des QTL communs entre les deux méthodes d'infections peuvent n'avoir pas été détectés à cause de la relativement faible puissance de nos dispositifs, notamment pour l'injection dans l'EXP2.

Le portage dans la rate

Les résultats obtenus dans l'EXP1 sur le portage ne permettent pas de tirer des conclusions très claires sur ce caractère (effectifs réduits liés à la mortalité et difficulté de mesure). Une nouvelle technique de PCR

(digital PCR) devrait permettre de raffiner les résultats. Cependant, peu d'individus survivants ont une charge bactérienne détectable, ce qui permet de penser qu'ils ont réussi à se débarrasser de la bactérie ou à fortement limiter sa prolifération en deçà du seuil de détection. Sur les trois QTL associés au portage après l'infection, seul le QTL sur *Omy2* est aussi associé à la résistance et l'endurance après l'immersion et l'injection.

Il semblerait donc que les mécanismes immunitaires permettant aux TAC de limiter la charge bactérienne pendant l'infection soient différents des mécanismes qui assurent la résistance. Cependant, comme notre dispositif de détection de QTL pour le portage est très limité, il se peut que l'on ne détecte pas un certain nombre de QTL associés à ce caractère. D'autre part, la présence de bactéries dans la rate n'a été détectée que pour 7 individus sur les 75 survivants, ainsi la majorité des survivants arrive à se débarrasser (ou presque) des bactéries. Il serait néanmoins particulièrement intéressant de s'intéresser à la cinétique de la charge bactérienne et de valider ces résultats avec un dispositif plus puissant.

3.1.1.4. Conclusion

La détection de QTL associés à différentes composantes de la réponse à une infection expérimentale l'infection par *F. psychrophilum* par injection intramusculaire ou par balnéation chez deux familles de truites arc-en-ciel différentes nous a permis de mettre en évidence que les différentes composantes de la réponse à l'infection semblent être contrôlés par des déterminismes génétiques en partie différents. Nous avons ainsi détecté potentiellement un unique QTL associé à la résistance et à la résilience (et/ou l'endurance) mais dont l'effet favorable d'un allèle pour la résilience est associé à une moins bonne survie, renforçant l'hypothèse d'un compromis pour l'allocation des ressources entre ces deux caractères. Nous avons aussi mis en évidence que deux protocoles infectieux différents semblent être à l'origine de réponses immunitaires en partie différentes dont les déterminismes génétiques sont en partie liés à l'intensité de l'infection et donc au mode d'infection.

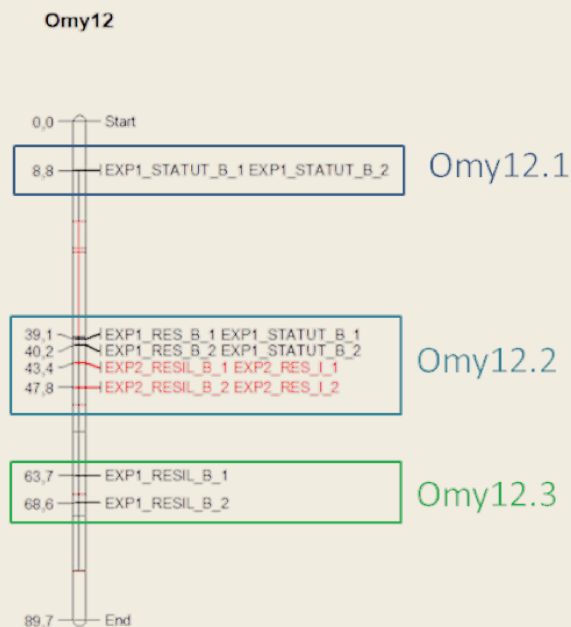
Message principal du chapitre 3.1.1.

La **réponse à l'infection** par *Flavobacterium psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel est un caractère **polygénique**

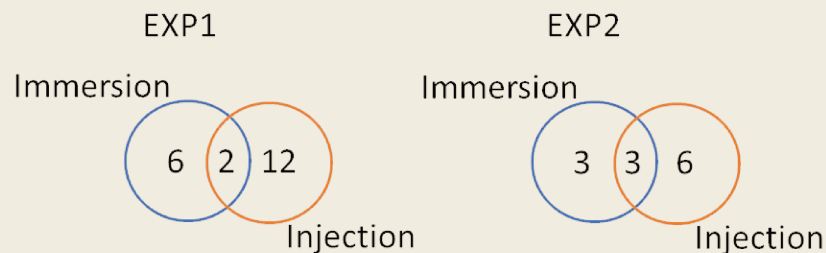
- On détecte **35 QTL** associé aux composantes de la réponse dont seulement 2 communs entre les deux croisements utilisés
 - Omy12.2 et Omy25a

La **résilience** et la **résistance**, deux composantes de la réponse à l'infection, sont gouvernées par des **déterminants génétiques en partie différents**

- Un seul QTL commun (Omy12.2) entre **résilience** et **résistance**



Intra-croisement, une grande partie des mécanismes de défense contre l'infection par *F. psychrophilum* sont **spécifiques** de la **balnéation** ou de **l'injection**



3.1.2. Analyser plus finement la résistance : l'épistasie

Dans ce second chapitre, j'ai cherché à affiner l'analyse de l'architecture génétique de la réponse à l'infection. Pour cela je me suis focalisée sur les trois caractères permettant le mieux d'appréhender la résistance : le STATUT, l'ENDURANCE et la RESISTANCE et j'ai poursuivi la détection de QTL en recherchant des QTL éventuellement masqués par les QTL les plus importants et en m'intéressant plus particulièrement aux éventuelles interactions entre QTL. Je me suis pour cela appuyée sur une nouvelle expérience, dans un fond génétique nouveau (EXP3a, croisement HD-(AP2^R/B57^S)) et j'ai tiré profit de notre dispositif, composé d'individus HD eux-mêmes issus de grands-parents HD, qui facilite la détection et l'interprétation de telles interactions.

Le croisement HD-(AP2^R/B57^S) présentait également un intérêt particulier pour comparer la réponse aux deux modes d'infection expérimentale. En effet, lors de la comparaison de la résistance de l'ensemble des lignées isogéniques après infection par injection ou balnéation, la lignée B57 a montré une résistance relative fortement améliorée lors de l'infection par bain (rang 15/15 après injection et 10/15 après balnéation) contrairement par exemple à la lignée A36 qui reste définitivement la plus sensible en toutes circonstances. Le croisement impliquant cette lignée semblait donc particulièrement favorable à la mise en évidence de facteurs contrôlant spécifiquement la résistance suite à une infection par balnéation.

Les résultats de l'EXP3a ont fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue **Genetic Selection and Evolution** (§ 3.1.2.1). J'ai enrichi l'analyse des interactions conduites dans cette expérience en ré-analysant les données de l'EXP2. Ces résultats complémentaires sont présentés dans le paragraphe 3.1.2.2.

3.1.2.1. Publication scientifique : "Quantitative trait loci for resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions"

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Quantitative trait loci for resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions

Clémence Fraslin^{1,2}, Nicolas Dechamp¹, Maria Bernard³, Francine Krieg¹, Caroline Hervet^{1,6}, René Guyomard¹, Diane Esquerré⁴, Johanna Barbieri⁴, Claire Kuchly⁴, Eric Duchaud⁵, Pierre Boudinot⁵, Tatiana Rochat⁵, Jean-François Bernardet⁵ and Edwige Quillet^{1*}

Abstract

Background: Bacterial cold-water disease, which is caused by *Flavobacterium psychrophilum*, is one of the major diseases that affect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a primary concern for trout farming. Better knowledge of the genetic basis of resistance to *F. psychrophilum* would help to implement this trait in selection schemes and to investigate the immune mechanisms associated with resistance. Various studies have revealed that skin and mucus may contribute to response to infection. However, previous quantitative trait loci (QTL) studies were conducted by using injection as the route of infection. Immersion challenge, which is assumed to mimic natural infection by *F. psychrophilum* more closely, may reveal different defence mechanisms.

Results: Two isogenic lines of rainbow trout with contrasting susceptibilities to *F. psychrophilum* were crossed to produce doubled haploid F2 progeny. Fish were infected with *F. psychrophilum* either by intramuscular injection (115 individuals) or by immersion (195 individuals), and genotyped for 9654 markers using RAD-sequencing. Fifteen QTL associated with resistance traits were detected and only three QTL were common between the injection and immersion. Using a model that accounted for epistatic interactions between QTL, two main types of interactions were revealed. A “compensation-like” effect was detected between several pairs of QTL for the two modes of infection. An “enhancing-like” interaction effect was detected between four pairs of QTL. Integration of the QTL results with results of a previous transcriptomic analysis of response to *F. psychrophilum* infection resulted in a list of potential candidate immune genes that belong to four relevant functional categories (bacterial sensors, effectors of antibacterial immunity, inflammatory factors and interferon-stimulated genes).

Conclusions: These results provide new insights into the genetic determinism of rainbow trout resistance to *F. psychrophilum* and confirm that some QTL with large effects are involved in this trait. For the first time, the role of epistatic interactions between resistance-associated QTL was evidenced. We found that the infection protocol used had an effect on the modulation of defence mechanisms and also identified relevant immune functional candidate genes.

*Correspondence: edwige.quillet@inra.fr

¹ GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a freshwater fish farmed in almost every continent, with production estimated at around 813,000 tons in 2014 (FAO). With the increase in production, resistance to diseases has become a major field of research in order to limit economic losses associated with diseases. *Flavobacterium psychrophilum* is the causative agent of bacterial cold-water disease (BCWD) also called rainbow trout fry syndrome in small fish [1, 2]. BCWD occurs worldwide and, according to [3], it is the second most important trout disease that affects French farms. It causes high mortalities (up to 70%) and deformities may occur in surviving fish [1, 2, 4], with important economic impacts. In spite of intensive research to develop efficient vaccines [5–7] and the recent commercialisation of a vaccine in some countries (ALPHA JECT[®] IPNV-Flavo 0.025 PHARMAQ), the usual way to combat the disease remains the use of antibiotic treatments, which raises environmental concerns and issues about the emergence of antibiotic resistance [8–10]. Therefore, there is a crucial need for other methods to control the disease. Selective breeding for natural genetic resistance to *F. psychrophilum* is a promising approach since previous studies have revealed the existence of genetic variation for this trait. Moderate heritabilities were estimated in European and North American domestic broodstocks [11–13], and Leeds et al. [14] demonstrated that genetic gain could be obtained in experimental conditions after two generations of selection. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance measured as time to death or survival have been detected using linkage or association studies [15–20] in which resistance to *F. psychrophilum* was assessed using injection protocols for experimental infection.

Madsen and Dalsgaard [21] and Garcia et al. [22] compared injection (intraperitoneal or intramuscular), immersion, immersion combined with stress (skin lesion or formalin treatment) and cohabitation with infected fish as infection challenge methods with *F. psychrophilum*. They concluded that the injection method was more reproducible than immersion and observed a higher mortality rate after injection challenge (70–90%), than after immersion challenge (30–55%). However, injection is a route of infection that bypasses the physical and immune barriers of skin and mucosa, and likely modifies the tissues that are targeted by the primary infection within the host. Similar differences between infection routes were also reported for other bacterial and viral pathogens that affect rainbow trout, such as *Yersinia ruckeri* [23], the infectious hematopoietic necrosis virus [24], and the viral haemorrhagic septicaemia virus [25]. Infection with *F. psychrophilum* seemed to be more efficient when fish were stressed

by formalin treatment or when the skin was damaged prior to immersion [21, 22, 26, 27], which suggests that external barriers hinder entry of the bacteria. *F. psychrophilum* has been observed in the skin mucus, in gills, and in connective tissue of the fins and operculum of salmonid fish [28, 29], but the precise sites of entry of the pathogen remain unknown. Epithelia (skin, gills, nasopharynx and gut) are considered important portals of entry of pathogens [25, 30], even if the mucus layer constitutes an efficient barrier. Mucus contains multiple antimicrobial factors, such as lysozyme, proteins of the complement system, heat shock proteins or immunoglobulins, which are involved in specific or non-specific defence mechanisms [31–34]. In fact, many bacteria, both commensal and pathogenic, are commonly found in the mucus, and adhesion to mucus is a classical virulence factor [35, 36]. Composition of the skin microbiota, which plays a protective role against infection [37, 38], is partly under genetic control, and QTL that are associated with abundance of some bacterial genera that are known to provide protection against pathogens have been identified [37].

Immersion challenge with *F. psychrophilum* probably reflects natural infection of rainbow trout better than injection. Thus, we developed a reproducible immersion challenge that does not involve preliminary stress [39] and used it to investigate the genetic variation of trout resistance to *F. psychrophilum*. Compared to injection challenge, immersion challenge may reveal QTL that drive defence mechanisms associated either with the entry of the bacterium into the host or with the host response once the pathogen has entered via the “natural” route, expanding the possibility of investigation of host antibacterial response. In this study, we took advantage of homozygous doubled haploid (DH) trout lines with contrasting susceptibilities to *F. psychrophilum* to search for resistance-associated QTL, using both routes of infection, as a first step towards a better understanding of the host response to infection and the identification of candidate (causative) genes. Investigating the resistance to *F. psychrophilum* is difficult since the establishment of reproducible experimental challenges, especially with immersion protocols, is very complicated. DH isogenic lines with contrasting resistance levels to *F. psychrophilum* represent a very useful resource to perform such experimental challenges and to identify susceptible versus resistant genetic backgrounds. Moreover, the use of DH lines allows powerful and simple genetic analyses [40, 41] with designs that are relevant to investigate interactions between QTL. Such interactions likely contribute to the variability of complex traits [42] but, to date, have been scarcely investigated.

Methods

Experimental QTL family

At INRA, we have established a collection of 16 isogenic homozygous rainbow trout lines that were derived from the INRA SY rainbow trout population after two generations of gynogenetic reproduction and further propagated by within-line single pair mating [43]. The lines have been screened for resistance to various diseases including several viruses [43–45] and more recently, for resistance to *F. psychrophilum*, using either injection or immersion as routes of infection [46, and unpublished results].

In this study, we selected two lines (B57 and AP2) with contrasting resistance to *F. psychrophilum* as F0 grandparents to produce the QTL family. Overall, line AP2 ranked among the most resistant of the 16 lines whereas B57 was consistently more susceptible (see Additional file 1: Figure S1).

One B57 female was mated to one AP2 sex-reversed male to produce a F1 isogenic family, consisting of all females that share the same genetic background and that are heterozygous at loci for which different alleles were fixed in the two F0 isogenic lines. One single F1 female was reproduced using mitotic gynogenesis in order to produce the QTL mapping family. Eggs were fertilized with UV-genetically inactivated milt and heat-shocked soon after fertilization in order to produce DH progeny by inhibition of the first embryonic mitosis [47]. Thus, the resulting offspring carried only one grandparental allelic variant at each locus. Males that were homozygous for a dominant body colour variant (golden phenotype) were used as milt donors for gynogenesis. The lack of golden fry in the progeny and of surviving fry in the haploid control (no heat-shock after fertilization with irradiated milt) served as control of the efficiency of the irradiation process.

Since DH progeny are homozygous, the power of QTL detection is increased by accurate evaluation of the effect of allelic substitution [40, 41, 48]. In the context of the recent whole-genome duplication event that occurred in the salmonid ancestor, DH individuals can also facilitate single nucleotide polymorphism (SNP) calling and genotyping in rainbow trout, and decrease the false discovery rate of paralogous sequence variants (PSV) as putative true allelic SNP variants [49].

F0 and F1 breeders were reared and spawned at the INRA PEIMA experimental farm (Sizun, France). The F2 progeny were incubated at the PEIMA farm. Eyed eggs were transported to the INRA IERP facilities (Jouy-en-Josas, France), iodine disinfected, and placed into rearing units that were supplied with recirculated, de-chlorinated tap water at a constant temperature of 10 °C. In total, 558 F2 progeny were produced, among which 372 were

used for QTL detection (genotyping and phenotyping in infectious challenge). The 186 remaining un-phenotyped progeny were added to the genotype dataset in order to construct a more precise linkage map. At about three months post-hatching, the 372 QTL progeny were anaesthetized with 2-phenoxyethanol (0.2 mL/L), individually tagged (intraperitoneal implantation of a micro chip “Biolog-Tiny ID”) and reared under standard conditions (constant 10 °C and a commercial diet) until infectious challenges.

Phenotyping for resistance to *F. psychrophilum*

Two different routes of infection, i.e. immersion and intramuscular injection, were compared. In both cases, fish were inoculated with *F. psychrophilum* FRGDSA 1882/11, a strain that was isolated in 2011 from a diseased rainbow trout during a severe outbreak in a trout farm in the South-West of France and belonging to the clonal complex CC-ST90 [50]. For both immersion and injection challenges, *F. psychrophilum* was grown at 18 °C in TYES broth on a rotatory shaker at 200 rpm until late exponential phase (OD₆₀₀ approximately 1). Broth cultures were used for infection experiments following a posteriori bacteria counting by inoculation of serial dilutions on agar and counting of visible colonies after 48 h of incubation at 18 °C.

The immersion challenge was carried out when fish were about 5 months old, with a mean body weight of 4.7 ± 1.3 g. Prior to infection, 225 fish were randomly sampled from the QTL progeny and equally distributed into three 10-L aquaria. Each fish was weighed and its individual tag was recorded. After a few days of acclimation, fish were infected by immersion for 4 h in a bacterial suspension (approximately 8.10^7 cfu/mL) in static water maintained at 10 °C with vigorous aeration. Bacteria were counted in water as above. Preliminary tests had revealed that *F. psychrophilum* strain FRGDSA 1882/11 is highly virulent when inoculated by injection and causes extremely high mortality in young fish. In order to fine-tune the level of the infectious dose and to be able to discriminate between susceptible and resistant fish for QTL detection, the injection challenge was performed when fish reached a larger size (around 8 months old with a mean body weight of 21.5 ± 6.9 g).

For the injection challenge, the broth culture was centrifuged and bacterial cells were rinsed once in saline buffer. Drops (25 µL) of serial dilutions of bacterial suspension were inoculated on agar for counting. As for immersion, 147 F2 progeny were randomly distributed into three 10-L aquaria (47–50 fish per aquarium). After a few days of acclimation, fish were anaesthetized and received an intramuscular injection of 50 µL of bacterial

suspension, corresponding to approximately 145 CFU/fish, close to the dorsal fin.

After infection (immersion or injection), fish were kept at 10 °C with adequate water flow. Two fish that died within the first 2 days after infection were discarded (one for each challenge). Mortality was monitored twice a day. Dead fish were identified individually by tag recording. When mortality reached a plateau (49 and 35 days for the immersion and injection challenge, respectively), surviving fish were sacrificed by anaesthetic overdose, weighed and identified. A piece of caudal fin was clipped from all individuals at the time of identification and stored in 100% ethanol for DNA extraction. Two fish from the immersion challenge and three fish from the injection challenge were discarded because tag recording was not possible. For each challenge, the post-challenge dataset included body weight at the time of challenge, survival status of each fish (dead or alive at the end of the challenge) and time to death (in days after infection, for dead fish only).

SNP genotyping

RAD sequencing and library preparation

In total, DNA was extracted from 555 fin samples using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) with an RNase step. Total DNA was quantified by measuring optical density at 260 nm (OD₂₆₀) with a Qubit fluorometer. DNA quality was assessed by the OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio and by visual control on gel electrophoresis. All samples were diluted to 100 ng/μL before they were sent for RAD sequencing. Samples included the two F0 grandparents (AP2 and B57), the F1 female parent (and another isogenic F1 individual as backup) and 551 F2 DH progeny, among which the 365 progeny used for QTL detection (222 for immersion and 143 for injection, respectively) and the 186 additional F2 progeny that were genotyped only to strengthen SNP calling and the linkage map. To ensure sufficient sequencing depth of breeders, samples of the F0 and F1 parents were replicated (four replicates for F0 and eight replicates for F1). DNA samples were sent to the GeT-PlaGe sequencing platform ([51], Toulouse, France,) for restriction-site-associated DNA sequencing (RADseq) according to the protocol in [52]. Each DNA sample was digested with the *SbfI* restriction enzyme and then barcoded by adding P1 adaptors, which contained a 5-bp nucleotide barcode that differed by at least three nucleotides. Twelve sequencing libraries were generated with 48 pooled samples. Libraries were subsequently cut to a size of less than 800 bp by sonication. After size selection (250 bp on average) on agarose gel, the pooled libraries were purified, ligated to a P2 adaptor, and amplified by PCR. RAD libraries were paired-end sequenced (100 bp paired-end reads)

on an Illumina HiSeq 2500 sequencer at the GeT-PlaGe sequencing platform.

Single nucleotide polymorphism discovery and genotyping

First, sequencing reads were demultiplexed and assigned to a single individual allowing no mismatch in the P1 barcode and one mismatch in the restriction site. Data from seven samples from F2 progeny that had less than one million reads were removed from the analysis. In order to facilitate detection of PSV [49], the dataset was supplemented with 20 DH individuals that were used as external controls. These DH individuals were sequenced in previous projects using the same RAD-sequencing methodology and restriction enzyme (unpublished data).

For SNP calling, sequence reads were processed through a de novo analysis using the *core* pipeline of the software Stacks version 1.19 [53, 54]. PCR duplicates were removed using the Stacks clone-filter program. Reads from replicates of the F0, F1 and F2 individuals were merged into a single sequence file per individual. In a first step, the *ustacks* program was used to identify putative loci for each sample. The minimum depth of coverage required to create a stack (group of identical reads or putative allele) was set at 3 (-m option), while the maximum distance allowed between stacks, was set at 2 nucleotides (-M option). These nucleotide differences take potential SNP and sequencing errors into account. Only primary reads were used (-N option equal to 0). The maximum number of stacks (i.e. maximum number of alleles) at a single de novo locus was set at 2 (max_locus_stacks option) in order to allow detection of putative duplicated loci. Next, the *cstacks* program was used to create a catalogue of loci by setting the number of mismatches allowed between samples to 1 (-n option). Finally, genotypes of all individuals (F0, F1, F2 and DH controls) were called using the *sstacks* program that matches individual stacks against the catalogue. The Stacks population program was used to calculate the frequency of genotypes at each locus.

Quality control of SNPs and removal of duplicated loci

Sequence data from the two F1 individuals were used to identify polymorphic and monomorphic loci. To be consistent with the pedigree of the QTL family (DH progeny of a cross between two DH homozygous grandparents), only bi-allelic loci were considered (17,460 out of 20,305 polymorphic loci identified in the Stacks catalogue).

DH control population The two F0 grandparents and the 20 external DH individuals served as controls to detect putative duplicated loci. Since all DH individuals are expected to be homozygous, a heterozygous genotype at a given locus indicates a PSV rather than a true allelic variant. Therefore, all loci that appeared heterozygous in

at least two DH control individuals were discarded (list provided in Additional file 2: Table S1).

Filtering of loci and individuals Sequence data from 37 individuals were removed because of technical problems. Filtering of loci and individuals was based on call rate and call frequency as follows: F2 individuals with genotype calls for less than 20% of genotyped loci and loci with genotype calls for less than 70% of F2 individuals were discarded. Homozygosity for each F2 individual was checked on the 11,570 remaining loci and 24 fish were found to have a heterozygosity rate higher than 1%. Previous studies performed on isogenic lines [45, 49] assumed that residual heterozygous loci may be due to unreduced ova, donor milt contamination, mutation or sequencing errors. We did not find any F2 individual that was heterozygous at loci where the two grandparents shared the same allele, so contamination by donor milt was excluded. Spontaneous retention of a second polar body is suspected to be at the origin of unreduced ova. Under this hypothesis, a number of loci will retain the heterozygosity of the mother, at a frequency that depends on recombination during meiosis [40, 55]. Since recombination rates are higher in telomeric than centromeric regions of chromosomes [56, 57], a higher residual heterozygosity level is expected in telomeric regions. For the 24 fish that had an overall heterozygous rate higher than 1% (min: 1.12%; max: 65.04%), a gradient of heterozygosity rate was observed along the chromosome arms, which was consistent with the proportion of heterozygous loci being higher in telomeric regions than around the centromere (see Additional file 3: Figure S2). This supports the hypothesis that the 24 F2 progeny that exhibited a high frequency of heterozygous loci probably originated from spontaneously unreduced ova. Those individuals were discarded from the analysis. The remaining F2 fish had a heterozygosity rate lower than 1% and were considered as true doubled haploids. The remaining heterozygous loci were considered to result from sequencing errors or mutations and were set to missing genotypes before the last filtering step based on minor allele frequency (MAF) and individual coverage. Since the F2 fish were produced by mitotic gynogenesis from a single F1 female, a 1:1 ratio was expected for the alternative F0 alleles (AP2 and B57). Therefore, the remaining loci with a MAF lower than 0.30 were filtered out. In the end, only fish with more than 90% of called genotypes were kept for further analysis.

Construction of the linkage map

The 1.2 version of the CarthaGène software [58, 59] was used to build the F2 family linkage map. The DH progeny were described as a backcross in the CarthaGène software. The group command was used, with the thresholds

for two-point distance (Haldane/Ray) and logarithm of odds (LOD) set at 0.3 and 15, respectively. Linkage groups were assigned to trout chromosomes by blasting the sequences of RAD markers on the most recent published reference trout genome, Omyk_1.0 [60].

QTL detection

QTL mapping was performed by chromosome with the QTLMap software [61] (version 0.9.8). For each chromosome, the hypothesis that one QTL (H1) versus no QTL (H0) affects the trait of interest was tested with the interval mapping method described in [62], using an approximate likelihood ratio test (LRT [63]) and scanning the chromosome in intervals of 1 cM. To take into account the fact that the F2 individuals are gynogenetic doubled haploids, they were coded as half-sib from a single sire (F1) and an unknown virtual dam that was different for each F2 fish [41]. The two challenges, injection and immersion, were analysed separately. The effects of body weight at challenge and aquarium on survival were tested with the average-to-average method (ANOVA) model on time to death and the logistic regression on the status at the end of the challenge with the R software, version 3.4.2 [64]. The effect of body weight was never significant but the aquarium effect was significant in all cases.

Using a model *M1* that included aquarium as the only fixed effect, RESISTANCE was assessed using the univariate Cox model option (calcul=7; [61]) in QTLMap. Cox model fits a survival analysis model that makes no assumption on the trait distribution and that takes time to death and censoring into account [65, 66]. Surviving fish at the end of the period of survey corresponded to 'censored' observations, *i.e.* the expected event (death) was not observed during the observation period. In this analysis, the QTL effect is calculated for each genotype (allele) as a relative risk, with the B57 line origin taken as the reference (relative risk = 1). STATUS (dead/alive) was also analysed as a trait of practical interest for breeders, using the univariate discrete distribution option of QTLMap (calcul=2; [61]) with value 1 for survivors and 0 for dead fish. Using the variable STATUS, it was also possible to refine the model to search for additional QTL that might have been masked by effects of the main QTL and/or by epistatic interactions between QTL. A new model (*M2*) was applied, in which aquarium and the QTL detected for STATUS with model *M1* were considered as fixed effects, along with interactions between the QTL used as co-factor and the newly detected QTL. To control the false discovery rate due to multiple-testing, the *P* values associated with interactions were corrected with the Benjamini–Hochberg method (BH) [67] implemented in the R software, version 3.4.2 [64] (stat package version 3.6.0, option p.adjust). Finally, ENDURANCE, which was

defined as the time until death for fish that died during the experimental period [68], was investigated as a complementary description of possible host–pathogen interaction during infection. ENDURANCE was measured in dead fish only and was analysed using the unitrait Gaussian distribution option of QTLMap with model M1.

For each chromosome, when a QTL was suspected, the empirical distribution of the LRT was obtained with QTLMap from 1000 simulations (for STATUS and ENDURANCE) or permutations (for RESISTANCE) under the null hypothesis with trait heritability fixed at 0.5 for each chromosome. Then, we estimated the type-I error rejection threshold of H_0 at the chromosome-wide level using the method described by Harrell and Davis [69]. A QTL with a chromosome-wide $P \leq 0.01$ was considered significant. For each QTL that was chromosome-wide significant at $P \leq 0.001$, the genome-wide level significance threshold was tested with 10,000 simulations/permutations under H_0 and a Bonferroni correction to adjust the type-I error for number of chromosomes. Under H_1 , the QTL effect was estimated as the allelic substitution effect in a standard F2 progeny. Because progeny were doubled haploids, this effect corresponds to half the difference between the mean values of the trait in the two alternative homozygous progeny. The 95% confidence intervals (95% CI) of the QTL were obtained using the method of Li [70], in which the distribution of QTL locations is approximated from likelihood. For each significant QTL and each trait, we identified the grandparental origin of the allele at the QTL position, and thus determined the line origin of resistance/susceptibility. For all traits and each QTL, the maximum likelihood ratio test (LRTmax) curves were inspected visually. When the LRTmax curves showed two peaks, the hypothesis of two QTL (H_2) versus one QTL (H_1) was tested. Because the test was available only for the unitrait model for the time to death, fish that survived were given a time of death at $d + 1$, with d the day of death of the last fish that died, but it never reached the chromosome-wide significance level.

The percentage of phenotypic variance explained by a QTL in the DH progeny was calculated with the R software [64], using ANOVA for ENDURANCE and logistic regression for STATUS.

Results

Average performance after immersion and injection infectious challenges

Fish from the QTL family were challenged with *E. psychrophilum* via two modes of infection: after the immersion challenge, the overall survival rate was 77% at day 48 (out of 225 infected fish) whereas after the injection challenge, it was 55% at day 34 (out of 147 infected fish)

(Fig. 1). These values were in the range of survival rates recorded in previous challenges with the *E. psychrophilum* strain FRGDSA 1882/11. Regardless of the route of infection, individual body weight at the time of infection had no significant effect on time to death or on the final survival rate (STATUS). Fish that survived and died following the immersion protocol had the same mean body weight at the time of challenge (4.6 g). Accordingly, the mean body weight at the time of infection using injection was 20.9 g and 22.6 g (not significant) for surviving and dead fish, respectively (see Additional file 2: Table S2).

Genotypes calls and linkage map

The catalogue of polymorphic loci, established with 511 individuals (507 unique F2's, 2 F1's and 2 F0's), contained 17,460 bi-allelic loci of which 2867 were discarded from further analysis since they were putative duplicated loci (i.e. they were heterozygous in at least two DH controls, see list in Additional file 2: Table S1). After removing fish with a genotype call rate lower than 20% ($n = 444$) and markers with more than 70% missing genotypes ($n = 11,570$), 24 additional individuals that exhibited a rate of heterozygous loci higher than 1% were removed before the last filtering step based on MAF (> 0.30) and marker call rate ($> 90\%$). The final dataset was composed of 9715 polymorphic loci and 427 F2 progeny (including 310 QTL progeny that were challenged with *E. psychrophilum* and 117 individuals with no phenotypic record). Of the 9715 markers, 9654 were mapped to 30 linkage groups (see Additional file 2: Table S3). The total length of the linkage map was 2645.2 cM. Linkage groups were successfully assigned to chromosomes using the genome assembly Omyk_1.0 [60]. As previously described [71, 72], chromosome 25 (Omy25) is separated into two chromosomes in the INRA SY population. In this paper, Omy25a corresponds to the short arm of Omy25 and Omy25b to its long arm. The 9654 markers accounted for 2130 distinct positions on the genetic map (see Additional file 2: Table S4). At each position, only the marker with the best call rate was kept for further QTL detection (see Additional file 2: Table S3). The final dataset for QTL detection included 310 F2 progeny, one F1 and the two F0 individuals, and 2130 markers.

QTL detected following injection challenge

Using the M1 model, survival analysis with the Cox model revealed two genome-wide significant QTL associated with RESISTANCE after the injection challenge ($P \leq 0.005$ at the genome-wide level) on Omy3 and Omy29 (named Omy3-QTL and Omy29-QTL, respectively). Two other QTL were chromosome-wide significant ($P \leq 0.01$) on Omy10 and Omy26. For all QTL, the risk ratio was less than 1 (0.22–0.38, Table 1),

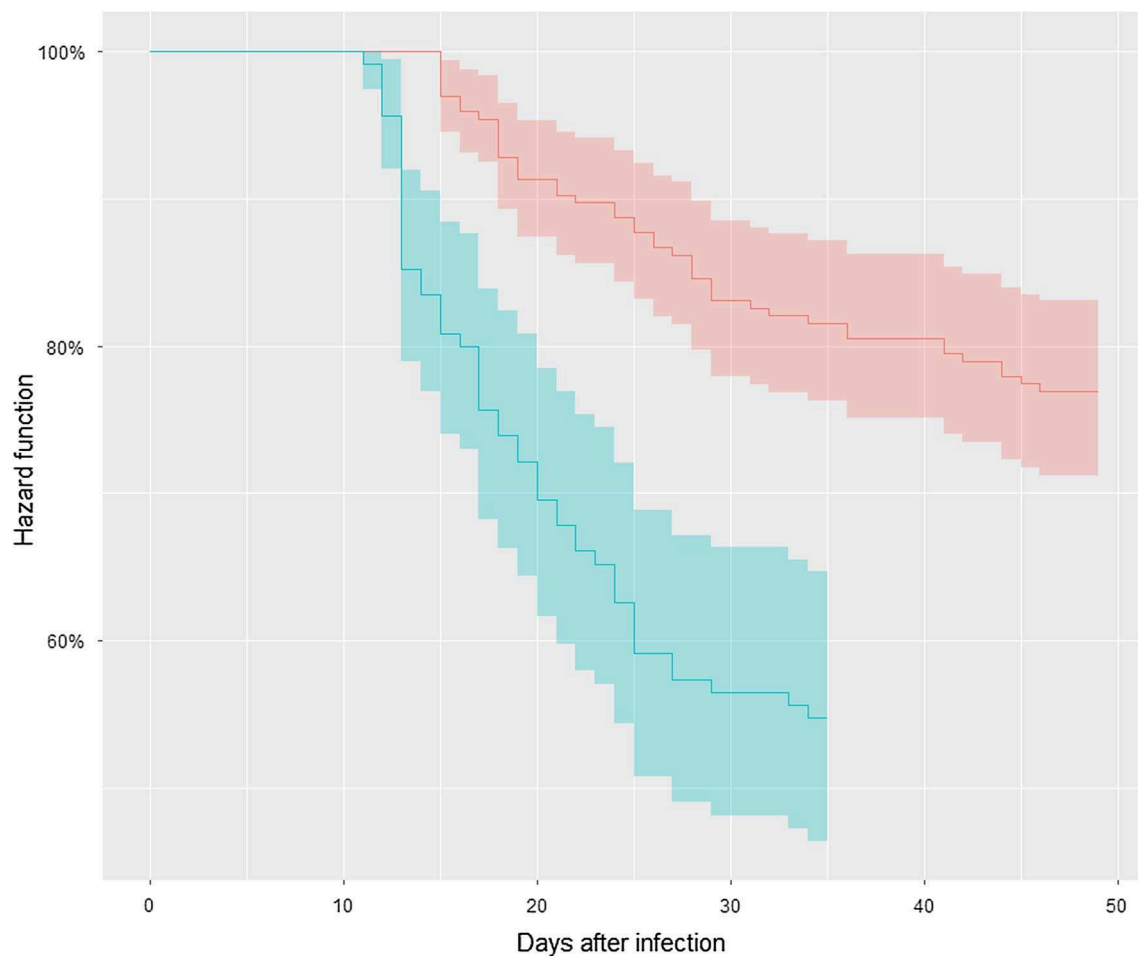


Fig. 1 Survival curves after *Flavobacterium psychrophilum* infection of DH fish used for QTL detection. Kaplan–Meier estimation of survival functions after infectious challenges for the QTL family. The pink curve corresponds to the hazard function of DH progeny challenged by immersion (225 fish, 3 aquaria, 49 days) and the blue curve corresponds to the Hazard function of DH progeny challenge by intramuscular injection (147 fish, 3 aquaria, 35 days)

which indicates that the allele for resistance originated from the AP2 (resistant) grandparent. The final survival rate ranged from 67 to 76% for individuals that were homozygous for the resistance (AP2) allele at all four QTL versus 34 to 50% for individuals that were homozygous for the susceptibility (B57) allele. Omy3-QTL and Omy29-QTL had the strongest effects (see Table 1). For STATUS (analysed as a binary trait), one chromosome-wide significant QTL was found on Omy25a and two genome-wide significant QTL on Omy3 and Omy29. These two QTL were the same as those detected for RESISTANCE (same location, same favourable (resistance) allele transmitted by AP2). They explained 14 and 12% of the phenotypic variation of the trait in the DH progeny, respectively, whereas Omy25a-QTL explained 7% of the phenotypic variation. Strikingly for this QTL, the susceptible grandparent (B57)

transmitted the favourable allele. Likelihood ratio thresholds and flanking markers at each QTL are in Table S5 (see Additional file 2: Table S5). Figure S3 (see Additional file 4: Figure S3) presents the likelihood ratio profiles for each chromosome (1 cM interval) for the two resistance traits after the two types of infectious challenges.

For ENDURANCE, which was measured as time to death (hence, using only fish that died), two chromosome-wide significant QTL were detected on Omy15 and Omy29. Omy29-QTL explained 11% of the phenotypic variance of the trait in the DH progeny. Omy15-QTL is a new QTL, whereas Omy29-QTL is likely the same as that detected for RESISTANCE (close location, overlapping 95% confidence intervals, one flanking marker in common). For both QTL, the favourable allele originated from the resistant grandparent (AP2), and fish that

Table 1 Results of QTL analyses for resistance traits after an injection challenge with *F. psychrophilum*

Trait	QTL	LRTmax	Position (cM)	CI (95%)	QTL effect	Resistance origin	Survival rate (%) according to allele origin at the QTL		% of phenotypic variance explained in DH progeny
							AP2	B57	
RESISTANCE	Omy3	21.24**	89	67–97	0.25	AP2	76	34	–
	Omy10	10.31*	23	4–93	0.35	AP2	67	50	–
	Omy26	9.49*	21	1–41	0.38	AP2	73	40	–
	Omy29	23.94***	48	26–49	0.22	AP2	76	38	–
STATUS	Omy3	21.28***	89	68–95	+ 0.29	AP2	76	34	14%
	Omy25a	11.06*	14	0–27	– 0.21	B57	49	60	7%
	Omy29	19.06***	48	25–49	+ 0.27	AP2	76	38	12%
ENDURANCE	Omy15	10.99*	11	0–78	+ 2.63	AP2	–	–	nc
	Omy29	9.90*	43	18–49	+ 2.63	AP2	–	–	11%

RESISTANCE: overall resistance, analysed with a Cox model survival analysis that takes failure, time to death and final survival (censored observations) into account; STATUS: (dead/surviving) phenotype at the end of the challenge, analysed as a binary trait; ENDURANCE: time to death in days after infection for dead fish only, analysed as a Gaussian trait; LRTmax = maximum of likelihood ratio test; Position in the genetic map in centimorgans (cM); CI = confidence interval; Chromosome-wide significant at $*P \leq 0.01$; Genome-wide significant at $**P \leq 0.05$ or $***P \leq 0.01$; The QTL effect was measured as the relative risk for RESISTANCE (B57 as the reference, risk = 1), as half the difference between the mean values of the two classes of homozygous progeny (individual values fixed as 1 for survivors and 0 for dead fish) for STATUS and as half the difference (in days) between the mean date of death of the two classes of homozygous progeny for ENDURANCE

carried the favourable allele at both QTL died on average 5 days later than fish with the unfavourable allele.

QTL detected following immersion challenge

For the immersion challenge and with model *M1*, survival analysis with the Cox model revealed three QTL associated with RESISTANCE (Table 2). Two new chromosome-wide significant QTL located on Omy2 and Omy21, respectively. One genome-wide significant QTL on Omy3 matched the QTL that was detected in the

injection challenge analysis (similar position, *i.e.* 88 and 89 cM for the immersion and injection challenge analyses, respectively, and resistance transmitted by AP2 in both cases). The risk ratios of the two newly detected QTL (3.73 for Omy2-QTL and 3.08 for Omy21-QTL, respectively) indicated that the favourable (resistance) allele originated from the susceptible grandparent (B57). Omy3-QTL had the largest effect, with 94 versus 53% survival for individuals that were homozygous for the AP2 and B57 allele, respectively. For Omy2-QTL and

Table 2 Results of QTL analyses for resistance traits after an immersion challenge with *F. psychrophilum*

Trait	QTL	LRTmax	Position (cM)	CI (95%)	QTL effect	Resistance origin	Survival rate (%) according to allele origin at the QTL		% phenotypic variance explained in DH progeny
							AP2	B57	
RESISTANCE	Omy2	14.04*	14	3–32	3.73	B57	69	89	–
	Omy3	39.87***	88	82–93	0.09	AP2	94	53	–
	Omy21	12.65*	99	64–103	3.08	B57	66	87	–
STATUS	Omy2	13.17*	14	2–36	– 0.19	B57	69	89	6%
	Omy3	39.47***	88	81–93	+ 0.33	AP2	94	53	18%
	Omy21	12.36*	99	63–104	– 0.18	B57	66	87	7%
ENDURANCE	Omy20	12.54*	28	5–37	+ 4.93	B57	–	–	nc
	Omy27	13.56*	26	10–47	+ 5.65	B57	–	–	nc

RESISTANCE: overall resistance, analysed with a Cox model survival analysis that takes failure time to death and final survival (censored observations) into account; STATUS: (dead/surviving) phenotype at the end of the challenge, analysed as a binary trait; ENDURANCE: time to death in days after infection for dead fish only, analysed as a Gaussian trait; LRTmax = maximum of likelihood ratio test; Position in the genetic map in centimorgans (cM); CI = confidence interval; Chromosome-wide significant at $*P \leq 0.01$; Genome-wide significant at $***P \leq 0.01$; The QTL effect was measured as the relative risk for RESISTANCE (B57 as the reference, risk = 1), as half the difference between the mean values of the two classes of homozygous progeny (individual values fixed as 1 for survivors and 0 for dead fish) for STATUS and as half the difference (in days) between the mean date of death of the two classes of homozygous progeny for ENDURANCE

Omy21-QTL, the absolute difference in survival between alternative homozygotes was around 20% (Table 2). The QTL detected for STATUS (binary trait) provided results that are fully consistent with the results obtained for RESISTANCE. Omy3-QTL had the largest effect (explaining 18% of phenotypic variance in DH progeny), whereas Omy2-QTL and Omy21-QTL had the smallest effects (6 and 7% of phenotypic variance in DH progeny, respectively).

For ENDURANCE after the immersion challenge, two new chromosome-wide significant QTL were detected on Omy20 and Omy27. Fish that carried the B57 allele at the two ENDURANCE QTL survived longer (about 10–11 days more) than those that carried the AP2 allele. The immersion or injection challenge had no common QTL associated with ENDURANCE.

Detection of additional QTL based on co-factor analyses

Since QTL may have been masked by the major QTL described above and/or by possible epistatic interactions between them, analyses were refined using STATUS as the resistance trait. Model M2 was used, in which QTL detection was computed with the effect of

each chromosome-wide and genome-wide significant QTL detected for STATUS with model M1 being fixed as co-factors alternatively. As shown in Table 3, use of model M2 revealed five additional chromosome-wide or genome-wide significant QTL (absolute effects of QTL on survival rates are in Additional file 5: Figure S4).

In the analysis of the injection challenge, including the effect of Omy3-QTL as co-factor in model M2 allowed identification of an additional QTL on Omy29 (named Omy29.2_{Omy3}-QTL). This Omy29.2_{Omy3}-QTL was located at 23 cM, just at the limit of the confidence interval of the first QTL on Omy29 detected for RESISTANCE and STATUS with model M1 (see Table 1) for the injection challenge. The hypothesis that there were two QTL for STATUS was tested by fitting both Omy3-QTL and Omy29-QTL in the model; Omy29.2_{Omy3}-QTL remained chromosome-wide significant ($P < 0.01$), which supports the existence of two different QTL on Omy29. Including Omy29-QTL in the model allowed the role of Omy26-QTL to be extended to STATUS (previously chromosome-wide significant for RESISTANCE only). Finally, new QTL were detected on Omy17 by fitting Omy25a-QTL or Omy29-QTL, respectively. Because

Table 3 Results of QTL analysis using the model M2 for resistance trait following injection or immersion challenges

Infection route	QTL	LRTmax	Position (cM)	CI (95%)	Increase in survival rate		Resistance origin		P value fixed effect	P value interaction
					Fixed_R (%)	Fixed_S (%)	Fixed_R	Fixed_S		
IMMERSION	Omy17 _{Omy3}	13.97*	61	0–92	38	7	AP2	AP2	***	NS
	Omy25a _{Omy3}	10.41*	4	0–35	10	18	B57	B57	***	NS
<i>Type 1 interaction</i>										
INJECTION	^a Omy3 _{Omy29}	15.27**	89	46–105	16	47	AP2	AP2	***	***
IMMERSION	^b Omy2 _{Omy3}	15.35**	97	63–104	4	39	B57	B57	***	***
	^b Omy3 _{Omy21}	40.73***	87	82–93	20	55	AP2	AP2	***	***
	^c Omy3 _{Omy2}	35.66***	87	81–94	17	44	AP2	AP2	***	***
INJECTION	^a Omy29.2 _{Omy3}	14.85*	23	8–49	5	48	B57	AP2	***	*
	Omy17 _{Omy25a}	15.85**	73	53–79	11	53	AP2	B57	***	***
IMMERSION	Omy7.2 _{Omy21}	11.48*	7	0–103	5	31	AP2	B57	***	***
<i>Type 2 interaction</i>										
INJECTION	^d Omy25a _{Omy3}	25.49***	14	10–18	53	16	B57	B57	***	*
	^d Omy3 _{Omy25a}	35.35***	89	86–92	59	22	AP2	AP2	***	***
	Omy26 _{Omy29}	11.75*	18	0–34	30	26	AP2	AP2	***	***
INJECTION	Omy17 _{Omy29}	18.29***	74	58–92	47	11	AP2	B57	***	***
IMMERSION	Omy24 _{Omy2}	12.71*	4	0–19	20	1	B57	AP2	***	***
<i>Type 3 interaction</i>										
IMMERSION	Omy7.1 _{Omy2}	16.42**	61	32–87	19	19	B57	AP2	***	***

The table presents chromosome-wide or genome-wide significant QTL detected for STATUS using model M2; Reciprocal interactions could be tested only for QTL detected in the first STATUS analysis (model M1); LRTmax = maximum of likelihood ratio test; Position in the genetic map in centimorgans (cM); CI = confidence interval; Chromosome-wide significant = * $P \leq 0.01$; Genome-wide significant = ** $P \leq 0.05$ or *** $P \leq 0.01$; P values for fixed effect and interaction corrected with Benjamini–Hochberg method: Non-significant = NS; * P value ≤ 0.05 ; *** P value ≤ 0.001

^a The reciprocal interaction could not be tested as a new QTL (Omy29.2_{Omy3}-QTL) was detected with the reciprocal model

^{b,d} Reciprocal models for QTL pairs

^c The QTL in the reciprocal model (Omy2_{Omy3}-QTL) was only suggestive ($P \leq 0.05$) at the chromosome wide level

Omy17_{Omy25a}-QTL and Omy17_{Omy29}-QTL were very close to each other, they were considered as a single QTL.

For the immersion challenge, fitting the effect of the Omy2-QTL revealed two new QTL (Omy7.1_{Omy2}-QTL and Omy24_{Omy2}-QTL). Fitting the effect of Omy3-QTL revealed a new QTL on Omy17 (Omy17_{Omy3}-QTL) and a QTL on Omy25a (Omy25a_{Omy3}-QTL). Interestingly these two QTL were detected on the same two chromosomes in the injection challenge analysis. Although their positions in each challenge were distinct, confidence intervals overlapped largely. Hence, we favour the hypothesis of a single QTL on each of these chromosomes. Taken together, these results support the idea that the functions encoded by the genes represented by the QTL on Omy17 and Omy25a could play a role in resistance regardless of the route of infection. Finally, fitting Omy21-QTL revealed another QTL on Omy7 (Omy7.2_{Omy21}-QTL). This QTL was considered as distinct from Omy7.1_{Omy2}-QTL since it was located far away (7 vs. 61 cM) and outside its confidence interval.

Evidence for interactions between resistance-associated QTL

Most of the newly detected QTL defined above were detected only after the interactions between QTL were taken into account in the analysis with model *M2*. As shown in Table 3, interactions were suggestive ($P \leq 0.05$) for two pairs of QTL and highly significant ($P \leq 0.001$) for 11 other pairs of QTL. Since both grandparents (AP2 and B57) can transmit the allele for resistance depending on the QTL, the resistance/susceptibility alleles at QTL will be referred to as the R/S allele for the discussion of interactions between QTL, irrespective of their AP2 or B57 origin. The detected interactions could be classified into two main types and a third type that contained only one pair of epistatic QTL, as described in the following.

Type1 interaction: interacting QTL alternatively contribute to resistance

The first type of interaction, which was recorded for six pairs of QTL, was associated with a larger effect of one QTL when the other QTL was fixed at the S allele (see Table 3 for details). For these six pairs of epistatic QTL, the survival rate was significantly lower when both QTL carried the S allele than when at least one QTL carried the R allele (see Additional file 5: Figure S4). Therefore, each QTL alternatively contributes to resistance, depending on the allelic status at the other QTL. A typical case for such interaction is the Omy21_{Omy3} QTL pair in the immersion challenge. Indeed, when one QTL was fixed at the S allele and the other QTL changed from S to R, the survival rate increased by 39 and 55%, respectively for Omy21_{Omy3_S}-QTL and Omy3_{Omy21_S}-QTL. In contrast,

when one QTL was fixed at R allele, changing the allele of the other QTL from S to R resulted in an increase in survival of only of 4 and 20%, respectively. An intriguing feature was that for three epistatic QTL, Omy29.2_{Omy3}-QTL and Omy17_{Omy25a}-QTL in the injection challenge and Omy7.2_{Omy21}-QTL in the immersion challenge, the origin of the favourable allele changed depending on the allele fixed for the QTL used as co-factor. For instance, origin of the favourable allele at Omy7.2_{Omy21}-QTL was AP2 or B57, depending on the allele at the QTL on Omy21 (R or S).

Type 2 interaction: resistance at one QTL enhances the effect of the other QTL

The second type of interaction, detected for four pairs of QTL, resulted in a larger increase in survival rate when one of the two QTL was fixed at the R allele (see Table 3 for details). This interaction can be illustrated by the significantly greater survival rate when both QTL of a pair carried the R allele compared to any other combination of alleles (see Additional file 5: Figure S4).

The Omy3_{Omy25a} QTL pair in the injection challenge is an example of such an interaction, with an absolute increase in survival rate by 53 and 59%, respectively, when Omy25a_{Omy3_R}-QTL and Omy3_{Omy25a_R}-QTL changed from S to R. For Omy17_{Omy29}-QTL in the injection challenge and Omy24_{Omy2}-QTL in the immersion challenge, the large increase in survival rate was combined with an inversion of the origin of the favourable allele at the QTL when the QTL fitted in the model *M2* carried the R versus the S allele.

Type 3 interaction: inversion of origin of the favourable allele

In the immersion challenge, the absolute effect of Omy7.1_{Omy2}-QTL on survival did not depend on the allele at Omy2-QTL (+19%) but the origin of the favourable allele changed from B57 to AP2 depending on the R/S allele at Omy2-QTL.

Key immune genes induced by *F. psychrophilum* infection co-located with resistance-associated QTL

In a previous study [46], we analysed the transcriptome response to *F. psychrophilum* in the pronephros of two trout isogenic lines (B57 and A3) with contrasting susceptibilities to *F. psychrophilum*, using micro-arrays. A list of 571 differentially-expressed genes after *F. psychrophilum* injection in at least one of these lines was generated ([46] and supplementary material in [73, 74]). All probes corresponding to these genes were mapped on the rainbow trout genome [60], to test whether the differentially-expressed genes are located close to a QTL. Probe positions were compared to the rainbow trout annotation [75] to name the corresponding proteins. Sixty-four

probes (corresponding to 49 genes) were located within or close to the 95% confidence intervals of the QTL detected in the current study (see Additional file 2: Tables S5 and S6). Among these 49 genes, 14 had functions that suggest that they may be involved in the resistance controlled by the respective QTL. These genes can be classified into four functional categories: (1) bacterial sensors and damage associated molecular pattern (DAMP) molecules (*cd209* and other *c-type Lectin-4*, *tlr2*; and *hmgb3*); (2) inflammatory factors (*steap4*; *il1r2*; and *drtp1*); (3) effectors killing bacteria (*c3*; *hamp*) or affecting the host (*collagenase/mmp13*); and (4) interferon stimulated genes (ISG) (*vig2*, *ifi44*, and *ifitm*). A detailed description of these genes and their function is in Additional file 6.

Discussion

In this study, we investigated the genetic architecture of resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout using a cross between two isogenic grandparental lines with contrasting susceptibilities to the bacterium. Two different infection modes, immersion and injection were used to detect QTL that were in segregation in the two grandparent isogenic lines. Although injection is commonly used in protocols of experimental infection with *F. psychrophilum*, immersion is more relevant since it likely mimics the natural infection more closely. However, reliable and reproducible immersion challenges are more difficult to establish than injection challenges, especially if a large number of fish are to be infected. Using

a DH QTL family produced from isogenic lines with well-established susceptibility was a unique way to facilitate the genetic analysis. Interestingly, QTL detected in both infection models overlapped partly, which supports the hypothesis that a core set of immune mechanisms is recruited, while others can be specific to the infection route. This study also provides the first evidence of epistasis among QTL associated with resistance to *F. psychrophilum*. Finally, we also investigated endurance of the fish (*i.e.*, time to death after infection) and detected four QTL associated with this trait. It should be noted that only one endurance QTL was also defined as a resistance QTL (Omy29-QTL), which indicates that these two traits are partly driven by different mechanisms.

Altogether, we detected 12 QTL associated with resistance to *F. psychrophilum* (see Table 4 for a summary). Three QTL were common to both routes of infection (Omy3-QTL, Omy17-QTL and Omy25a-QTL), four were detected after injection only (Omy10-QTL, Omy26-QTL, Omy29-QTL and Omy29.2-QTL) and five after immersion only (Omy2-QTL, Omy7.1-QTL, Omy7.2-QTL, Omy21-QTL and Omy24-QTL). Three of these QTL (Omy21-QTL, Omy29-QTL and Omy29.2-QTL) had not been detected in previously published studies [16, 18, 19, 49]. Some QTL could be detected only after taking the effect of—or the interaction with—another QTL with strong effect into account. Among the QTL that govern resistance for both types of challenge, Omy3-QTL was the most significant and explained 14 and 18% of the

Table 4 Summary of all QTL associated with resistance and endurance

QTL	Injection		Immersion		QTL found on the same chromosome in
	Resistance	Endurance	Resistance	Endurance	
Omy2			M1		[16, 18]
Omy3	M1		M1		[20]
Omy7.1			M2		[16, 19]
Omy7.2			M2		[20]
Omy10	M1				[20]
Omy15		M1			[18]
Omy17	M2		M2 ^a		[16]
Omy20				M1	[16]
Omy21			M1		
Omy24			M2		[16]
Omy25a	M1		M2 ^a		[20]
Omy26	M1				[18]
Omy27				M1	
Omy29	M1	M1			
Omy29.2	M2				

In this table, the term “Resistance” combines the QTL detected for STATUS and/or RESISTANCE traits

M1: QTL detected using the M1 model, M2: QTL detected using the M2 model with fixed effect and interactions, M2^a interaction non-significant or suggestive (5%)

phenotypic variation in survival rate of the DH progeny following injection and immersion, respectively.

We identified several QTL that seem specific to a given route of infection. One cannot exclude that these QTL contribute to resistance regardless of the mode of infection but that they were not detected in one challenge because of lack of power of the experiment. However, the observation of QTL specific to the route of infection is consistent with our unpublished results, that show a moderate genetic correlation between the survival of standard trout families after immersion or injection challenge. The five QTL that were detected only after immersion could drive protective mechanisms that are related to entry of the bacterium into the host at the skin or mucosa level, or mechanisms that would be triggered significantly only when the bacterium has entered the host after an immersion challenge. For example, resident phagocytes that are located close to the «natural» entry sites could mediate such mechanisms. These cells can sense the pathogens, become activated, mediate a local innate response and/or migrate to the spleen or to other sites where the immune responses take place. In contrast, QTL detected only after injection could correspond to resistance mechanisms that become more critical when the first line of natural defence has been by-passed.

Age of the fish at the time of immersion and injection challenges may also have influenced the relative effect of the QTL. Because the *F. psychrophilum* strain used is highly virulent, it can induce very high mortality rates when injected to small fish even at low doses, which may prevent detection of QTL. Hence, we chose to carry out the injection challenge on 8-month-old fish, while the immersion challenge was performed on younger fish (5-month-old, to better simulate the natural infection at early stages), having a potentially more immature immune system. Importantly, 5-month-old fish already have a rather mature immune system. For example, they already have B and T lymphocytes, and can mount adaptive immune responses [76]. The same study showed that a strong transcriptional response to bacterial infection can be detected since the eyed egg stage. While drastic changes of this response were observed before the first feeding stage, fewer changes occur from first feeding and 3 weeks later. Thus, age-dependent changes in immune response that take place in trout after several months of independent feeding life correspond to maturation of an established immune system, rather than to a dramatic change, and we do not expect drastic differences in immune responses for 5- versus 8-month-old fish. Moreover, our experience with isogenic lines indicates that lines that are highly susceptible to *F. psychrophilum* infection remain susceptible during their first year of life and often throughout life (unpublished). Along the same line,

the general conclusion of comparisons of susceptible versus resistant lines across a range of sizes is that lines rank consistently regarding susceptibility to *F. psychrophilum* ([46] and unpublished results), supporting the hypothesis that maturation of the immune system does not lead to drastic changes in the susceptibility/resistance status of the fish in this study. However, some pathways that are critical at young stages may become less critical as adaptive defence mechanisms get more effective at later ages.

To get further insight into the mechanisms involved in host response, we combined the positional information obtained from QTL mapping with results of our previous functional study. This pointed to several key genes involved in antibacterial immunity, which are induced in the pronephros of fish injected with *F. psychrophilum*, and are located in the vicinity of the resistance QTL. These genes are potentially interesting for the validation of a repertoire of candidate genes in more restricted QTL regions.

Few studies have addressed interactions between QTL, although it has been shown that epistasis may play an important role in the genetic variation of complex traits [42, 77] and that taking epistasis into account allows more QTL to be detected [42, 78, 79]. In the current study, five of 15 QTL were detected only after epistasis was taken into account, which provides further insights into the genetic architecture of resistance to *F. psychrophilum* and the complexity of the underlying mechanisms.

Two major types of interactions were identified. In the first type, the effect of each QTL was present or enhanced only when the other QTL was fixed at the susceptibility allele. Consequently, each QTL alternatively contributes to the resistance (“compensation-like” effect). This phenomenon occurred between the three most significant immersion QTL and between two of the most significant QTL that were identified following injection. In particular, “compensation-like” interaction was detected between Omy2-QTL and Omy3-QTL that carry candidate genes coding for anti (*steap4*) and pro (*il1r2*) inflammatory factors. The second type of interaction results in an “enhancing-like” effect of the resistance allele of one QTL on the effect of other QTL, resulting in a gain in resistance only when both QTL carry their resistance allele. Therefore, mechanisms associated with the R alleles at the two QTL may be synergetic or, alternatively, the presence of the S allele at one QTL may hinder the efficiency of the resistance mechanisms encoded at the other. This interaction was detected between Omy29-QTL and two other QTL (Omy26-QTL and Omy17-QTL). In other cases, as for the Omy2_Omy7.1 pair of QTL or in some cases among type 1 and 2 interactions, there was what may be called a “counter-acting interaction” with an inversion of the favourable allele

at one QTL when switching the allele at the alternative QTL. Such a type of interaction was described in studies on lung [80] or colon [81] cancer in recombinant congenic strains of mouse for which QTL were expected to be important components of tumour susceptibility. Further investigations are needed in order to better understand the underlying immune pathways, which might correspond to negative feedback loops.

Several QTL associated with resistance to *F. psychrophilum* had a strong effect on resistance in the QTL family used in this study. Among those, the QTL on Omy3 is of particular interest because it controls resistance following both routes of infection. This QTL has also been detected in two American trout populations [20] and might be relevant in other populations. Our study also confirms the role of several other QTL that were previously detected in American trout populations in response to infection with a different strain of *F. psychrophilum* (CSF-259-93) [16, 18–20]. Hence, these QTL are not specific to a particular strain of *F. psychrophilum* nor to a particular host population, which strengthens their potential interest for breeding purposes. It is noteworthy that the FRGDSA 1882/11 and CSF-259-93 strains both belong to the same mPCR type 2, which is one of the major types identified in *F. psychrophilum* isolates from worldwide origins [50, 82].

Our results also suggested that a given type of infection challenge (route of infection and/or age of fish) may select for specific resistance mechanisms that may not be as relevant in other contexts. The challenge model used to select candidates may result in gene-environment interactions with less genetic progress than expected in the context of natural infection in farms. However, choosing the ‘best’ infection challenge for a selection programme should take into account not only genetic, but also practical and economic issues. From a practical point of view, an encouraging result of this study is that, within the range of fish size we investigated, individual body weight at the time of challenge had no or little effect on resistance, meaning that individual tagging to record fish weight may not be necessary when implementing an infection challenge.

Conclusions

In this paper, we confirmed the complex genetic determinism of resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout. Some QTL that drive a significant part of the phenotypic variance in different infectious contexts were detected and deserve further confirmation in standard trout families. Several genes involved in response to *F. psychrophilum* infection were associated with the detected QTL, providing a preliminary list of relevant candidate genes. Finally, this study highlighted the role of

epistatic interactions between resistance QTL (and thus between the underlying mechanisms) and for the first time, evidenced the effect of the type of infection protocol with *F. psychrophilum* on the balance between different resistance mechanisms.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Cumulative survival curves of fish from AP2 and B57 grandparental isogenic lines infected with *Flavobacterium psychrophilum*. Description: Fish were infected with the *F. psychrophilum* FRGDSA 1882/11 strain and mortality was recorded for 29 days post-infection. For injection protocol (—), 100 fish (average weight of 10.3 g for AP2 and 12.2 g for B57) were infected with (a): 450 CFU/mL (replicate of 50 fish) or (b): 300–550 CFU/mL (replicate of 50 fish). For the immersion protocol (---), 100 fish (average weight of 1.1 g for AP2 fish and 1.0 g for B57 fish) were infected by immersion for 4 h in a bacterial suspension (approximately 3.10^7 CFU/mL) in static water maintained at 10 °C with vigorous aeration, in two replicates of 50 fish each (a) and (b).

Additional file 2: Table S1. List of putative duplicated loci: heterozygous RAD SNPs detected in at least two doubled haploid control individuals (DH controls), each from different rainbow trout isogenic lines. **Table S2.** Overall survival and weight of fish of the QTL family at the end of the immersion and injection infectious challenges. Description: Data were recorded for 49 and 35 days for the immersion and injection challenges, respectively. **Table S3.** Genetic linkage map constructed with the F2 progeny. Description: The marker at one position used in the QTL detection is shown in red bold. **Tables S4.** SNP allele and position for the 2130 markers used in the QTL detection. Description: SNP position is given in bp from the first bp of the read. **Table S5.** All significant ($P \leq 0.01$ at the chromosome wide level) detected QTL, error-1 rejection threshold at chromosome and genome-wide levels calculated for each QTL, flanking markers at each QTL, with name and position on the linkage map (cM). **Table S6.** List of 49 up- and down-regulated genes after *F. psychrophilum* infection in two rainbow trout isogenic lines in [46] located in the QTL associated with resistance traits identified in this study. **Table S7.** Reads of the 9654 polymorphic loci used in the linkage map and QTL detection.

Additional file 3: Figure S2. Evolution of the rate of heterozygosity along chromosomes (mean values for the 24 individuals with an overall rate of heterozygosity higher than 1%). Description: Metacentric chromosomes (a): under the hypothesis of spontaneous retention of the second polar body during meiosis, the rate of heterozygosity is expected to be lower around the centromere (—) than in telomeric regions (---). Acrocentric chromosomes (b): under the hypothesis of spontaneous retention of the second polar body during meiosis, the rate of heterozygosity is expected to increase along the chromosome from the centromeric region to the telomere. Data are illustrated for 15 chromosomes.

Additional file 4: Figure S3. Graphical compilation of likelihood ratio profiles calculated for each chromosome (1-cM interval) for the two resistance traits after the two modes of infection challenges. Description: (a) RESISTANCE and (b) STATUS after injection challenge, (c) RESISTANCE and (d) STATUS after immersion challenge. For each chromosome, horizontal bars indicate the corresponding significance thresholds (green: $P \leq 0.01$ at the chromosome-wide level; red: $P \leq 0.05$ at the genome-wide level).

Additional file 5: Figure S4. Final survival rate according to the allele origin at pairs of epistatic QTL for resistance to infection with *F. psychrophilum*. Description: For each figure, abscissa corresponds to the combination of favourable (R) and unfavourable (S) alleles with the grandparent origin in colour (green for B57 and red for AP2) for each pair of epistatic QTL OmyA_OmyB. Survival rates (in ordinate) with similar letters are not significantly different (Fisher exact test $P \leq 0.05$ and Benjamini–Hochberg correction for multiple testing of stat package from R software).

Additional file 6. Details on the immune genes induced by *F. psychrophilum* infection that map within resistance-associated QTL.

Authors' contributions

EQ conceived the study and supervised research. ND, CH, TR, JFB and EQ designed and carried out the experiments. DE, JB and CK performed the RAD sequencing. CF, ND, MB, FK, RG, TR, JFB, ED, PB, and EQ analysed the data. CF, PB, and EQ as major contributors wrote the paper, all other authors were involved in drafting and revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. ² SYSAF Section Aquacole, Campus de Beaulieu, 35000 Rennes, France. ³ GABI, SIGENAE, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. ⁴ GeT-PlaGe, Genotoul, INRA US1426, 31320 Castanet-Tolosan Cedex, France. ⁵ Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. ⁶ Present Address: BIOEPAR, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, 44307 Nantes, France.

Acknowledgements

Authors are thankful to the staff of PEIMA and IERP INRA fish facilities for their help in fish production, rearing and management of infectious challenges, to M. Boussaha (INRA) for his help with the CarthaGène software, to P. Le Roy (INRA) for her helpful advice in using the QTLMap software, to T. Callet and D. Lallias (INRA) for their help with the candidate gene detection. Authors are also thankful to P. Haffray and S. Brard-Fudulea (SYSAF) for their welcome at SYSAF and for helpful discussions, and to P. Daniel (Laboratoires des Pyrénées et des Landes, Mont-de-Marsan, France) for kindly providing the *Flavobacterium psychrophilum* strain used in this study. We are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrénées for providing help, computing and storage resources. Keygene N.V. owns patents and patent applications protecting its Sequence Based Genotyping technologies.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The raw datasets used during this study are available from the corresponding author on request. Reads of the 9654 polymorphic loci used in the linkage map and QTL detection are available in Table S7 (see Additional file 2: Table S7).

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All animals were handled in strict accordance with good animal practices as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and by Cometha, the Regional Paris South Ethics committee. Challenge experiments were carried out in INRA fish facilities (IERP, Jouy-en-Josas, France) according to authorizations n° 12/051 and 12/053.

Funding

This project is part of the RE-SIST project "Improvement of disease resistance of farmed fish by selective breeding" selected at the 15th "Fonds Unique Interministériel". This project was labelled by the competitiveness clusters AQUIMER, Agrimp Innovation, Mer Méditerranée and Mer Bretagne, and funded by the French Government BPI France, by the Bretagne, Languedoc-Roussillon and Aquitaine regional authorities, and by the Landes and Pyrénées Atlantiques regional councils. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant agreement No. 262336 (AQUAEXCEL). This work was performed in collaboration with the GeT core facility, Toulouse, France (<http://get.genotoul.fr>), and was supported by France Génomique national infrastructure, funded as part of "Investissement d'avenir" program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). C. Frasin was granted a CIFRE scholarship (convention ANRT-SYSAF no 2015/0778).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 21 March 2018 Accepted: 6 November 2018

Published online: 16 November 2018

References

- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F. *Flavobacterium psychrophilum* infection in salmonid fish. *J Fish Dis*. 2003;26:563–74.
- Starliper CE. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *J Adv Res*. 2011;2:97–108.
- Guichard B. Principaux résultats de l'enquête « Pathologie de poissons 2004 ». *Bull Epidemiol*. 2004;15:5–6.
- Lorenzen E, Dalsgaard I, Bernardet JF. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with cold water disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Dis Aquat Org*. 1997;31:197–208.
- Fredriksen BN, Olsen RH, Furevik A, Souhoka RA, Gauthier D, Brudeseth B. Efficacy of a divalent and a multivalent water-in-oil formulated vaccine against a highly virulent strain of *Flavobacterium psychrophilum* after intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*. 2013;31:1994–8.
- Plant KP, LaPatra SE, Cain KD. Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *J Fish Dis*. 2009;32:521–34.
- Plant KP, LaPatra SE, Call DR, Cain KD. Attempts at validating a recombinant *Flavobacterium psychrophilum* gliding motility protein N as a vaccine candidate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against bacterial cold-water disease. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;358:14–20.
- Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:4908–15.
- Muziasaria WI, Pärnänen K, Johnson TA, Lyra C, Karkman A, Stedtfeld RD, et al. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92:fw052.
- Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukcekiz AS, Sahinturk P. Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Dis Aquat Org*. 2017;125:31–44.
- Henryon M, Jokumsen A, Berg P, Lund I, Pedersen PB, Olesen NJ, et al. Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*. 2002;209:59–76.
- 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 (*Oncorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome and viral hemorrhagic septicemia. *Aquaculture*. 2005;250:621–36.
- Silverstein JT, Vallejo RL, Palti Y, Leeds TD, Rexroad CE 3rd, Welch TJ, et al. Rainbow trout resistance to bacterial coldwater disease is moderately heritable and is not adversely correlated with growth. *J Anim Sci*. 2009;87:860–7.
- Leeds TD, Silverstein JT, Weber GM, Vallejo RL, Palti Y, Rexroad CE 3rd, et al. Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *J Anim Sci*. 2010;88:1936–46.
- Campbell NR, LaPatra SE, Overturf K, Townner R, Narum SR. Association mapping of disease resistance traits in Rainbow trout using restriction site associated DNA sequencing. G3 (Bethesda). 2014;4:2473–81.
- Vallejo RL, Palti Y, Liu S, Evenhuis JP, Gao G, Rexroad CE 3rd, et al. Detection of QTL in Rainbow trout affecting survival when challenged with *Flavobacterium psychrophilum*. *Mar Biotechnol* (NY). 2014;16:349–60.
- Vallejo RL, Palti Y, Liu S, Marancik DP, Wiens GD. Validation of linked QTL for bacterial cold water disease resistance and spleen size on rainbow trout chromosome Omy19. *Aquaculture*. 2014;432:139–43.

18. Wiens GD, Vallejo RL, Leeds TD, Palti Y, Hadidi S, Liu S, et al. Assessment of genetic correlation between bacterial cold water disease resistance and spleen index in a domesticated population of rainbow trout: identification of QTL on chromosome Omy19. *PLoS One*. 2013;8:e75749.
19. Palti Y, Vallejo RL, Gao G, Liu S, Hernandez AG, Rexroad CE III, et al. Detection and validation of QTL affecting bacterial cold water disease resistance in rainbow trout using restriction-site associated DNA sequencing. *PLoS One*. 2015;10:e0138435.
20. Vallejo RL, Liu S, Gao G, Fragomeni BO, Hernandez AG, Leeds TD, et al. Similar genetic architecture with shared and unique quantitative trait loci for bacterial cold water disease resistance in two rainbow trout breeding populations. *Front Genet*. 2017;8:156.
21. Madsen L, Dalsgaard I. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org*. 1999;36:169–76.
22. Garcia C, Pozet F, Michel C. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis Aquat Org*. 2000;42:191–7.
23. Monte M, Urquhart K, Secombes CJ, Collet B. Individual monitoring of immune responses in rainbow trout after cohabitation and intraperitoneal injection challenge with *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;55:469–78.
24. Wargo AR, Kell AM, Scott RJ, Thorgaard GH, Kurath G. Analysis of host genetic diversity and viral entry as sources of between-host variation in viral load. *Virus Res*. 2012;165:71–80.
25. Kim SJ, Kim JO, Kim WS, Oh MJ. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infectivity dynamics in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with injection and immersion challenge routes. *Aquaculture*. 2016;465:7–12.
26. Madejota J, Nyman P, Wiklund T. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org*. 2000;43:27–38.
27. Liu H, Izumi S, Wakabayashi H. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in various organs of Ayu *Plecoglossus altivelis* by in situ hybridization. *Fish Pathol*. 2001;36:7–11.
28. Amita K, Hoshino M, Honma T, Wakabayashi H. An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa River. *Fish Pathol*. 2000;35:193–7.
29. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org*. 2003;55:101–7.
30. Munang'andu HM, Evensen Ø. A review of intra and extracellular antigen delivery systems for virus vaccines of finfish. *J Immunol Res*. 2015;2015:960859.
31. Xu Z, Parra D, Gómez D, Salinas I, Zhang YA, von Gersdorff Jørgensen L, et al. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:13097–102.
32. Salinas I. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*. 2015;4:525–39.
33. Jia R, Liu BL, Feng WR, Han C, Huang B, Lei JL. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;55:131–9.
34. Cordero H, Brinckmann MF, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Proteomics*. 2015;15:4007–20.
35. Benhamed S, Guardiola FA, Mars M, Esteban MA. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Vet Microbiol*. 2014;171:1–12.
36. Lazado CC, Caipang CM. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;39:78–89.
37. Boutin S, Sauvage C, Bernatchez L, Audet C, Derome N. Inter individual variation of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS One*. 2014;9:e102649.
38. Guardiola FA, Cuesta A, Abellán E, Meseguer J, Esteban MA. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;40:24–31.
39. Pérez-Pascual D, Rochat T, Kerouault B, Gómez E, Neulat-Ripoll F, Henry C, et al. More than gliding: involvement of GldD and GldG in the virulence of *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Microbiol*. 2017;8:2168.
40. Komen H, Thorgaard GH. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*. 2007;269:150–73.
41. Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, Pang A, et al. Rapid creation of *Arabidopsis* doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:4227–32.
42. Carlborg Ö, Haley CS. Epistasis: too often neglected in complex traits studies? *Nat Rev Genet*. 2004;5:618–25.
43. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*. 2007;22:510–9.
44. Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Bremont M, Quillet E, et al. Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis*. 2007;30:631–6.
45. Verrier ER, Genet C, Laloë D, Jaffrezic F, Rau A, Esquerre D, et al. Genetic and transcriptomic analyses provide new insights on the early antiviral response to VHSV in resistant and susceptible rainbow trout. *BMC Genomics*. 2018;19:482.
46. Langevin C, Blanco M, Martin SAM, Jouneau L, Bernardet JF, Houel A, et al. Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One*. 2012;7:e39126.
47. Diter A, Quillet E, Chourrout D. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J Fish Biol*. 1993;42:777–86.
48. Lynch M, Walsh B. Genetics and analysis of quantitative trait. Sunderland: Sinauer Associates incorporated; 1997.
49. Palti Y, Gao G, Miller MR, Vallejo RL, Wheeler PA, Quillet E, et al. A resource of single-nucleotide polymorphisms for rainbow trout generated by restriction-site associated DNA sequencing of doubled haploids. *Mol Ecol Resour*. 2014;14:588–96.
50. Duchaud E, Rochat T, Habib C, Barbier P, Loux V, Guérin C, et al. Genomic diversity and evolution of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Microbiol*. 2018;9:138.
51. Genotoul. <http://get.genotoul.fr>. Accessed 28 Jan. 2016.
52. Baird NA, Etter PD, Atwood TS, et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequences RAD marker. *PLoS One*. 2008;3:e3376.
53. Stacks. <http://catchenlab.life.illinois.edu/stacks/>. Accessed 09 June 2016.
54. Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A, Cresko W. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol*. 2013;22:3124–40.
55. Oral M. Insights into isogenic clonal fish line development using high-throughput sequencing technologies. University of Stirling. PhD thesis. 2016; <http://hdl.handle.net/1893/24909>.
56. Sakamoto T, Danzmann RG, Gharbi K, Howard P, Ozaki A, Khoo SK, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*. 2000;155:1331–45.
57. Anderson JL, Rodriguez Mari A, Braasch I, Amores A, Hohenlohe P, Batzel P, et al. Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. *PLoS One*. 2012;7:e40701.
58. CarthaGene. <http://www7.inra.fr/mia/T/CarthaGene/>. Accessed on 02 Dec. 2016.
59. de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T. CARTHA GENE: multi-population integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*. 2005;21:1703–4.
60. Omyk_1.0. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002163495.1/. Accessed on 15 Sept 2017.
61. Filangi O, Moreno C, Gilbert H, Legarra A, Le Roy P, Elsen JM. QTLMap, a software for QTL detection in outbred populations. In: Proceedings of the 9th world congress on genetics applied to livestock production, 1–6 Aug 2010, Leipzig; 2010.
62. Elsen JM, Mangin B, Goffinet B, Boichard D, Le Roy P. Alternative models for QTL detection in livestock. I. General Introduction. *Genet Sel Evol*. 1999;31:213–24.
63. Le Roy P, Elsen JM, Boichard D, Mangin B, Bidanel JP, Goffinet B. An algorithm for QTL detection in mixture of full and half-sib families. In: Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock productions, 11–16 Jan 1998, Armidale; 1998.
64. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN. 2013. <https://www.r-project.org/>. Accessed 11 Jan. 2017.

65. Moreno CR, Elsen JM, Le Roy P, Ducrocq V. Interval mapping methods for detecting QTL affecting survival and time-to-event phenotypes. *Genet Res.* 2005;85:139–49.
66. Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol.* 1972;34:187–220.
67. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol.* 1995;57:289–300.
68. Kauser A, Ødegard J. The genetic analysis of tolerance to infections: a review. *Front Genet.* 2012;3:262.
69. Harrell FE, Davis CE. A new distribution-free quantile estimator. *Biometrika.* 1982;69:635–40.
70. Li H. A quick method to calculate QTL confidence interval. *J Genet.* 2011;90(2):355–60.
71. Phillips RB, Nichols KM, DeKoning JJ, Morasch MR, Keatley KA, Rexroad C, et al. Assignment of rainbow trout linkage groups to specific chromosomes. *Genetics.* 2006;174:1661–70.
72. Guyomard R, Boussaha M, Krieg F, Hervet C, Quillet E. A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC Genet.* 2012;13:15.
73. Suppl Langevin C. Figure 1. This excel file contains the complete list of up- and down-regulated genes in rainbow trout clonal lines B57_s and A3_r following *F. psychrophilum* JIP 02/86 infection. *PLoS One.* 2012;7(e39126):s001.
74. Langevin C. Suppl. Figure 2. This table contains the list of probes for which up- or down-regulation was significant in only one of the two fish clonal lines, while a high adj. *p* value in the other line indicated a large variation of the expression level. *PLoS One.* 2012;7(e39126):s002.
75. NCBI *Oncorhynchus mykiss* Annotation Release 100. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Oncorhynchus_mykiss/100/. Accessed 12 Dec 2017.
76. Castro R, Jouneau L, Tacchi L, Macqueen DJ, Alzaid A, Secombes CJ, Martin SAM, Boudinot P. Disparate developmental patterns of immune responses to bacterial and viral infections in fish. *Sci Rep.* 2015;5:15458.
77. Flint J, Mott R. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet.* 2001;2:437–45.
78. Carlborg Ö, Brockmann GA, Haley CS. Simultaneous mapping of epistatic QTL in Du6i x DBA/2 mice. *Mamm Genome.* 2005;16:481–94.
79. Carlborg Ö, Kerje S, Schütz K, Jacobsson L, Jensen P, Andersson L. A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. *Genome Res.* 2003;13:413–21.
80. Fijneman RJ, de Vries SS, Jansen RC, Demant P. Complex interactions of new quantitative trait loci, Sluc1, Sluc2, Sluc3, and Sluc4, that influence the susceptibility to lung cancer in the mouse. *Nat Genet.* 1996;14:465–7.
81. van Wezel T, Stassen AP, Moen CJ, Hart AA, van der Valk MA, Demant P. Gene interaction and single gene effects in colon tumour susceptibility in mice. *Nat Genet.* 1996;14:468–70.
82. Rochat T, Fujiwara-Nagata E, Calvez S, Dalsgaard I, Madsen L, Calteau A, et al. Genomic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* serotypes and development of a multiplex PCR-based serotyping scheme. *Front Microbiol.* 2017;8:1752.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Voir Annexe 4 pour les « Additional files » de l'article

Correction de la table 3 de l'article : ligne 4 Omy21_{Omy3} au lieu de Omy2_{Omy3}

Table 3 Results of QTL analysis using the model M2 for resistance trait following injection or immersion challenges

Infection route	QTL	LRTmax	Position (cM)	CI (95%)	Increase in survival rate		in Resistance origin		P-value fixed effect	P-value interaction
					Fixed_R	Fixed_S	Fixed_R	Fixed_S		
IMMERSION	Omy17 _{Omy3}	13.97*	61	0-92	38%	7%	AP2	AP2	***	NS
	Omy25a _{Omy3}	10.41*	4	0-35	10%	18%	B57	B57	***	NS
Type 1 interaction										
INJECTION	^a Omy3 _{Omy29}	15.27**	89	46-105	16%	47%	AP2	AP2	***	***
IMMERSION	^b Omy21 _{Omy3}	15.35**	97	63-104	4%	39%	B57	B57	***	***
	^b Omy3 _{Omy21}	40.73***	87	82-93	20%	55%	AP2	AP2	***	***
INJECTION	^c Omy3 _{Omy2}	35.66***	87	81-94	17%	44%	AP2	AP2	***	***
	^a Omy29.2 _{Omy3}	14.85*	23	8-49	5%	48%	B57	AP2	***	*
	Omy17 _{Omy25a}	15.85**	73	53-79	11%	53%	AP2	B57	***	***
IMMERSION	Omy7.2 _{Omy21}	11.48*	7	0-103	5%	31%	AP2	B57	***	***
Type 2 interaction										
INJECTION	^d Omy25a _{Omy3}	25.49***	14	10-18	53%	16%	B57	B57	***	*
	^d Omy3 _{Omy25a}	35.35***	89	86-92	59%	22%	AP2	AP2	***	***
	Omy26 _{Omy29}	11.75*	18	0-34	30%	26%	AP2	AP2	***	***
INJECTION	Omy17 _{Omy29}	18.29***	74	58-92	47%	11%	AP2	B57	***	***
IMMERSION	Omy24 _{Omy2}	12.71*	4	0-19	20%	1%	B57	AP2	***	***
Type 3 interaction										
IMMERSION	Omy7.1 _{Omy2}	16.42**	61	32-87	19%	19%	B57	AP2	***	***

The table presents chromosome-wide or genome-wide significant QTL detected for STATUS using model M2. Reciprocal interactions could be tested only for QTL detected in the first STATUS analysis (model M1).

LRTmax = maximum of likelihood ratio test

Position in the genetic map in centimorgans (cM)

CI = confidence interval

^a the reciprocal interaction could not be tested as a new QTL (Omy29.2_{Omy3}-QTL) was detected with the reciprocal model.

^{b, d} reciprocal models for QTL pairs

^c the QTL in the reciprocal model (Omy2_{Omy3}-QTL) was only suggestive ($P \leq 0.05$) at the chromosome wide level
Chromosome-wide significant = * $P \leq 0.01$

Genome-wide significant = ** $P \leq 0.05$ or *** $P \leq 0.01$

P-values for fixed effect and interaction corrected with Benjamini-Hochberg method: Non-significant = NS; * P -value ≤ 0.05 ; *** P -value ≤ 0.001

Messages principaux de la publication : La résistance à *F. psychrophilum* est un caractère complexe gouverné par de nombreux QTL d'effet modeste

Dans cet article on s'intéresse aux principaux déterminants génétiques de la résistance globale à *F. psychrophilum* :

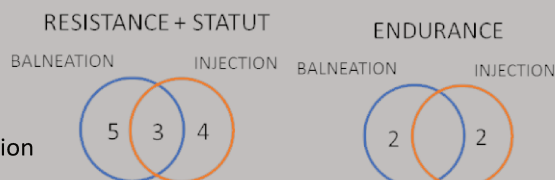
La résistance globale est décomposée en :

- **STATUT** (survie : mort/vivant)
- **ENDURANCE** (date de mort des individus sensibles)
- **RESISTANCE** (analyse de survie, combinant cinétique de mortalité et taux de survie)

On détecte :

12 QTL associés à la **résistance** :

- Une majorité de QTL spécifique au mode d'infection
- 3 nouveaux QTL jamais mis en évidence
- 1 QTL sur Omy3 explique **18%** et **14%** de la variance phénotypique de la survie dans la famille HD après **balnéation** et **injection**, respectivement



– 4 QTL associés à l'**ENDURANCE** :

- Les 4 QTL sont tous spécifiques de l'une des deux méthodes d'infection
- 1 QTL détecté uniquement après **la balnéation** (Omy27-QTL) n'a jamais été mis en évidence avant
- 1 QTL est commun avec la résistance après **l'injection** (Omy29-QTL) mis en évidence pour la première fois

Les QTL détectés uniquement après **la balnéation** peuvent être liés à des **mécanismes de défense externe**, contrôlant l'entrée de la bactérie au niveau externe ou les **premières lignes de défenses internes** une fois la bactérie entrée.

Les QTL détectés uniquement après **l'injection** peuvent être liés à des **mécanismes internes** qui prennent le relais quand les **premières lignées de défense** ont été court-circuitées, ou encore à des **mécanismes immunitaires** liés à une charge bactérienne instantanée importante.

Enfin les QTL communs, détectés après l'injection et la balnéation peuvent être liés à des mécanismes de défenses internes, cruciaux dans la réponse antibactérienne de la TAC

On identifie 2 principales catégories d'interactions entre QTL:

- 6 couples de QTL sont en interaction de type "**compensatrice**" : l'effet d'un des deux QTL n'est significatif que quand l'autre QTL est fixé pour l'allèle de sensibilité, ils se compensent
- 4 couples de QTL sont en interaction de type "**amplificatrice**" : les effets de chaque QTL sont significativement amplifiés lorsque l'autre est fixé pour l'allèle de résistance

Dans certains cas, pour un QTL, un allèle donné peut avoir un effet favorable ou défavorable sur le caractère, selon l'allèle présent sur l'autre QTL. On parle d'inversion de l'origine favorable de l'allèle.

Plusieurs gènes candidats fonctionnels sont positionnés au sein des QTL de résistance :

- 49 gènes candidats fonctionnels dont l'expression est modulée différemment par l'injection dans deux lignées isogéniques différentes sont positionnés au sein de plusieurs QTL de résistance. 14 de ces gènes ont des fonctions impliquées dans la résistance :
(i) détection des agents pathogènes, (ii) effecteurs de l'immunité antibactérienne, (iii) facteurs de la réponse inflammatoire et (iv) gènes dont l'expression est stimulée par des interférons

Pour la première fois, nous avons mis en évidence, l'importance des relations d'épistasie entre QTL de la réponse immunitaire antibactérienne ainsi que les effets du protocole infectieux sur les mécanismes de résistance.

3.1.2.2. L'existence d'interactions entre QTL confirmées avec la famille HD-(A02^R/A36^S) (EXP2)

Afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les QTL dans l'EXP2, le principal QTL associé au STATUT après infection par balnéation (§ 3.1.1.2) a été fixé dans un modèle M2 selon le même principe que dans l'EXP3 (§ 3.1.2.1). Il s'agit d'Omy17.1-QTL. Pour l'infection par injection, le taux de mortalité ne permettant pas de réaliser une détection de QTL pour le caractère STATUT l'épistasie n'a pas été testée.

Trois nouveaux QTL associés à la résistance après une infection expérimentale par balnéation ont été mis en évidence après avoir fixé le QTL principal.

Trois nouveaux QTL ont été mis en évidence sur les chromosomes 8, 20 et 25b. Les QTL Omy8 et Omy25b sont seulement suggestifs (5% au niveau du chromosome) tandis que le QTL Omy20 est très significatif (0,1% au niveau du chromosome). Le QTL sur Omy28 qui n'était que suggestif dans la première analyse se trouve confirmé au niveau du génome (5%). Le QTL sur Omy18 qui n'était détecté que pour la RESISTANCE est cette fois-ci détecté pour le STATUT (5% au niveau du chromosome). Trois QTL sont en interaction avec le QTL Omy17.1, les interactions Omy8_Omy17.1 et Omy28_Omy17.1 sont suggestives tandis que l'interaction (Omy20_Omy17.1) est fortement significative (Tableau 5).

Tableau 5. EXP2 : Interactions entre les Omy17.1 et les nouveaux QTL associés au STATUT détectés après une infection expérimentale par balnéation

QTL	Position des marqueurs flanquant (Mb)	Intervalle de confiance 95% (Mb)	LRTmax à (significativité)	Effet du QTL quand allèle fixé à A02 ^R	Effet du QTL quand allèle fixé à A36 ^S	Origine de l'allèle favorable	Significativité de l'interaction avec Omy17.1
Omy8Omy17.1	72,18 – 73,83	42,54 – 81,73	13,5**	-0,20	0,07	A36 ^S /A02 ^R	*
Omy18Omy17.1	31,10 – 32,74	5,73 – 51,23	8,9*	0,14	0,11	A02 ^R	NS
Omy20Omy17.1	5,53 – 8,65	6,18 – 21,61	12,7***	0,11	-0,25	A02 ^R / A36 ^S	***
Omy25aOmy17.1	9,91 – 11,73	6,79 – 31,29	7,6*	0,15	0,07	A02 ^R	NS
Omy25bOmy17.1	70,93 – 76,31	60,90 – 80,55	8,6*	-0,16	-0,06	A36 ^S	NS
Omy28Omy17.1	17,56 – 32,42	4,49 – 39,45	13,5****	-0,23	0,01	A36 ^S /A02 ^R	*

Effet du QTL mesuré comme la moitié de l'effet de substitution allélique. L'allèle favorable à Omy17 provient de la lignée A02^R

LRTmax : maximum du test du ratio des vraisemblances (Likelihood ratio test)

Significativité au niveau du chromosome : * = P < 0,05 ; *** = P < 0,001

Significativité au niveau du génome : **** = P < 0,05

Significativité de l'interaction (correction « BH » pour test multiples) : NS = non significatif ; * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$

Les deux types d'interactions mises en évidence dans l'EXP3a sont retrouvées dans l'EXP2. Les interactions entre le QTL Omy17.1 et les QTL sur Omy8 et Omy28 sont toutes les deux de type « amplificatrice », l'effet du nouveau QTL étant plus marqué quand Omy17.1 est fixé pour l'allèle A02^R. L'interaction avec le QTL sur Omy20 est de type « compensatrice » avec un effet plus important du nouveau QTL quand Omy 17 est fixé à A36^S (Tableau 5, Figure 28).

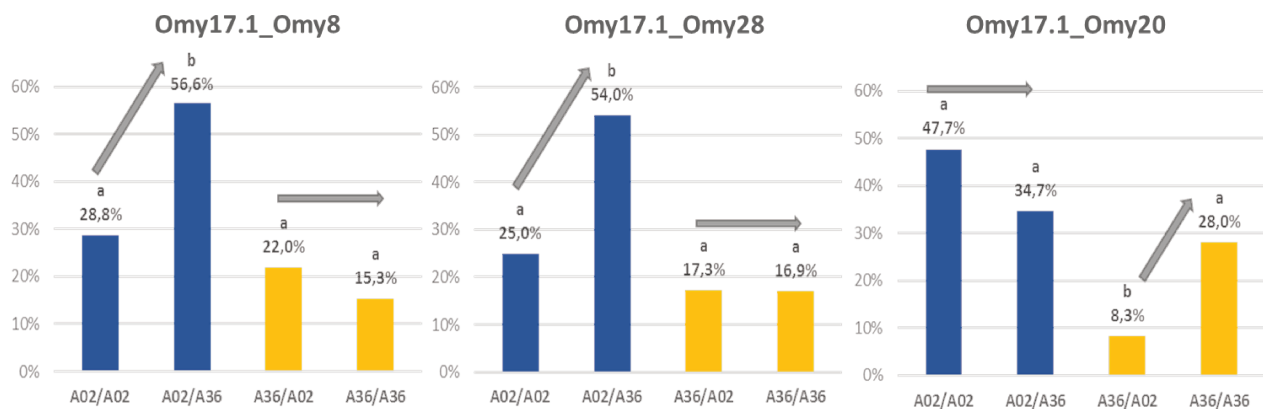


Figure 28. EXP2 : Taux de survie des individus selon l'origine des allèles portés par les deux QTL en interaction.

Interaction de type « amplificatrice » entre le QTL Omy17.1 et le QTL sur Omy8 et entre Omy17.1 et le QTL sur Omy28 et interaction de type « compensatrice » entre Omy17.1 et le QTL sur Omy20

Les combinaisons d'allèles correspondent aux combinaisons d'homozygotes avec, en bleu, Omy17.1 fixé à son allèle favorable (A02^R) et l'allèle au second QTL qui varie et en jaune, Omy17.1 fixé à son allèle défavorable (A36^S) et l'allèle au second QTL qui varie

Les taux de survie (%) sont significativement différents quand les lettres (a/b) sont différentes.

Pour la paire de QTL Omy17.1_Omy20, l'interaction s'accompagne d'une inversion de l'origine de l'allèle favorable au QTL sur Omy20 selon l'allèle fixé au QTL sur Omy17.1 (Tableau 5). Lorsque l'on regarde en pratique l'effet des allèles sur la survie (Figure 28), l'inversion est moins visible puisque l'effet du QTL Omy20 sur la survie est faible quand le QTL Omy17.1 est porteur de l'allèle favorable (A02^R). Cependant, l'allèle A36^S de Omy20 a un effet protecteur (survie améliorée de 8.3% à 28%, en orange) si Omy17.1 est également fixé pour l'allèle A36^S, et un effet légèrement délétère si Omy17 est fixé pour l'allèle A02^R (en bleu, ns).

Dans le cas des QTL sur Omy8 et Omy28, l'effet du second QTL est très faible (proche de 0) quand Omy17.1 est fixé à A36^S (Tableau 5).

3.1.2.3. Discussion et conclusion : la résistance un caractère complexe (EXP3a et EXP2)

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a permis d'approfondir l'étude de l'architecture génétique de la résistance à *F. psychrophilum* et d'étudier plus précisément l'effet du protocole infectieux sur la résistance. Nous avons aussi mis en évidence deux types d'interactions entre des QTL associés au STATUT, une interaction de type "amplificatrice" et une interaction de type "compensatrice".

La résistance à différentes méthodes d'infection en partie contrôlée par des déterminismes génétiques distincts

Dans l'EXP3a, seuls 3 QTL associés à la RESISTANCE et/ou au STATUT sont partagés entre l'injection et la balnéation. Si on cumule les QTL détectés dans les deux fonds génétiques HD-(A02^R/A36^S) et HD-(AP2^R/B57^S), le QTL de résistance Omy2 détecté uniquement par balnéation dans l'EXP3a et par injection dans l'EXP2 n'est cette fois-ci plus spécifique du mode d'infection. Cependant, avec au total 4 QTL de résistance détectés après la balnéation, 10 QTL de résistance détectés après l'injection et 6 QTL communs, ces résultats confirment l'hypothèse d'un déterminisme génétique en partie spécifique du mode d'infection mis en évidence dans la partie 3.1.1.

Il est toutefois possible qu'une partie des QTL qui semble spécifiques soit en réalité partagés entre la balnéation et l'injection et que la puissance de notre dispositif ne permette pas de les détecter. Dans l'EXP3a, cette hypothèse est en partie confirmée par l'utilisation du modèle M2 qui nous permet de détecter par balnéation le QTL sur Omy25a qui n'était détecté que par injection.

Une partie des mécanismes de résistance associés aux QTL détectés uniquement après la balnéation sont certainement lié à des mécanismes de protection externe qui ne sont pas stimulés par l'injection. Cette hypothèse est confortée par le fait que, dans l'EXP3a, l'origine de l'allèle favorable de la majorité des QTL associés uniquement à la résistance par balnéation provienne de la lignée B57^S, cela reste vrai pour les QTL additionnels détectés après prise en compte de l'effet des QTL principaux. Or, la lignée B57^S, qui est parmi les lignées les plus sensibles à l'infection par injection se reclasse après une infection par balnéation à laquelle elle résiste relativement mieux que d'autres lignées comme A36^S (Figure 22). Les individus issus de la lignée B57^S possèdent donc vraisemblablement des mécanismes de défense spécifiquement activés lors des étapes précoces d'entrée de la bactérie dans l'organisme.

La résistance à *F. psychrophilum*, un caractère contrôlé par de nombreux QTL en interaction

Dans ce chapitre, nous détectons de nombreux QTL associés à la résistance après l'infection. Ces QTL expliquent tous une proportion relativement modérée de la variance phénotypique de la résistance dans nos croisements expérimentaux. Ces résultats semblent donc mettre en évidence que la résistance à *F. psychrophilum* est un caractère polygénique. De plus, dans ce chapitre, nous avons mis en évidence, pour la première fois chez la TAC, des relations d'épistasie entre les QTL gouvernant la résistance à l'infection. Deux principaux types d'interactions sont mis en évidence :

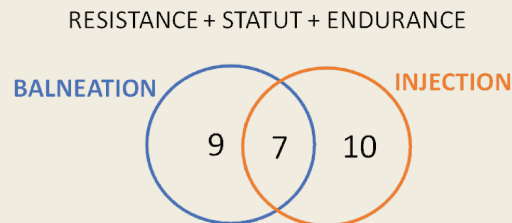
- Une interaction de type **compensatrice** avec un QTL dont l'effet sur la résistance est significatif uniquement quand l'autre QTL est porteur de l'allèle de sensibilité. Dans ce cas, il semble que les mécanismes génétiques de ces deux QTL se relaient pour assurer la résistance.
- Une interaction de type **amplificatrice** avec un QTL dont l'effet sur la résistance n'est significatif que si l'autre QTL est porteur de l'allèle de résistance. La survie est maximale pour les individus porteurs des allèles de résistance aux deux QTL tandis que si l'un des deux QTL est porteur de l'allèle de sensibilité, l'autre QTL n'a pas d'effet sur la survie.

Certaines de ces interactions, s'accompagnent d'une inversion de l'origine de l'allèle favorable, en fonction de l'allèle fixé à l'autre QTL de la paire. Ce type d'interaction contre intuitive, a été mis en évidence dans des lignées consanguines de souris pour la résistance à des cancers du poumon (Fijneman et al., 1996) ou du colon (van Wezel et al., 1996), et pourrait correspondre à des boucles de rétrocontrôle négatifs dans la cascade immunitaire. Une analyse plus fine des gènes contenus dans ces QTL permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de cette épistasie. Cependant, la grande taille des intervalles de confiance limite fortement l'intérêt, actuel, de ce type d'analyse.

Message principal du chapitre 3.1.2.

Avec **26 QTL** associés aux différents caractères de la résistance (STATUT, ENDURANCE, RESISTANCE) dans les deux EXP2 et EXP3a, on confirme que la résistance à *Flavobacterium psychrophilum* est un caractère **polygénique** chez la truite arc-en-ciel

La résistance à la **balnéation** et à **l'injection** fait intervenir des mécanismes immunitaires différents, en partie contrôlés par des déterminants spécifiques de la méthode d'infection



La résistance à *Flavobacterium psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel est un **caractère complexe**
On détecte au total **14 paires de QTL en interactions**

- 11 paires de QTL épistatiques dans l'EXP3a
- 3 paires de QTL épistatiques dans l'EXP2

Deux types d'interactions, « **amplificatrice** » et « **compensatrices** » sont détectées dans les deux fonds génétiques différents

3.1.3. L'effet de la souche de *F. psychrophilum* utilisée (EXP3a et EXP3b)

Comme indiqué dans l'introduction générale, la bactérie *F. psychrophilum* présente une grande variété de complexes clonaux et de sérotypes, y compris dans des zones géographiques restreintes (Figure 15). La question se pose donc de savoir dans quelle mesure la résistance à un isolat bactérien donné confère une résistance à d'autres isolats. Sur un plan appliqué, l'existence d'interactions (génotype de l'hôte) x (génotype bactérien) fortes serait en effet un handicap pour la diffusion de cheptels sélectionnés. Sur un plan plus fondamental, l'analyse fine des mécanismes liés à ces interactions, si elles existent, pourrait être une clé pour mieux comprendre à la fois les facteurs de virulence de la bactérie et les mécanismes de défense mis en jeu par l'hôte.

Pour aborder cette question, j'ai ré-exploité une expérience antérieure (EXP3b) dans laquelle le croisement HD-(AP2^R/B57^S) utilisé dans l'EXP3a avait été infecté par injection intramusculaire avec une autre souche de *F. psychrophilum*, la souche JIP02/86. La souche FRGDSA 1882/11, isolée dans une pisciculture du Sud-Ouest de la France, appartient au complexe clonal CC-ST90, l'un des plus représenté sur le territoire français (Duchaud et al., 2018) et au sérotype 2 (Rochat et al., 2017). La souche JIP02/86 est beaucoup moins virulente et appartient au complexe clonal CC-ST20 et au sérotype 1 (Rochat et al., 2017).

3.1.3.1. L'EXP3b : résumé du matériel et méthode

Un lot de 257 poissons (poids moyen : 6,3 g) de la famille HD-(AP2^R/B57^S) a été infecté par injection intramusculaire avec la souche JIP02/86. Dans cette expérience, les individus n'ont pas été marqués individuellement avant l'épreuve, et le génotypage a été réalisé avec un jeu de 246 marqueurs microsatellites et 50 SNP. La détection de QTL a également été réalisée avec le logiciel QTLMap pour le caractère RESISTANCE et un modèle d'analyse de survie.

Les QTL détectés dans cette analyse ont été positionnés sur le nouvel assemblage du génome (Omyk_1.0) à partir de la position des marqueurs microsatellites flanquants, de façon à pouvoir comparer ces QTL avec ceux détectés dans l'EXP3a et rechercher d'éventuels gènes candidats à proximité des QTL.

3.1.3.2. L'EXP3b : principaux résultats

La mortalité dans l'EXP3b s'est étalée sur 36 jours et la survie en fin d'expérience était de 42%.

Au total, 6 QTL associés à la RESISTANCE ont été détectés (Tableau 6). Les trois QTL les plus significatifs (5% au niveau du génome) sont localisés sur Omy3, Omy7 et Omy17 et l'allèle favorable est transmis par le grand-parent résistant, AP2^R. En revanche, l'allèle favorable des deux QTL sur Omy1 et Omy2 est transmis par le grand-parent issu de la lignée sensible B57^S.

Tableau 6. EXP3b : QTL associés à la résistance à *F. psychrophilum* détectés dans la famille HD-(AP2^R/B57^S) après une infection expérimentale par injection avec la souche JIP02/86

QTL	Position des marqueurs flanquant (Mb)	Intervalle de confiance à 95% (Mb)	LRTmax (significativité)	Effet du QTL	Origine de l'allèle favorable
Omy1	67,48 – 72,89	15,79 – 83 81	7,3*	1,59	B57 ^S
Omy2	4,0 - 4,0	4,0 - 32,9	8,7*	1,63	B57 ^S
Omy3	61,4 – 63,1	54,7 – 71,1	35,8****	0,36	AP2 ^R
Omy7	19,8 – 22,5	19,8 – 39,3	22,0****	0,46	AP2 ^R
Omy15	4,1 - 11,2	5,4 - 61,7	9,5*	0,60	AP2 ^R
Omy17	17,6 - 21,1	17,6 - 56,9	35,9****	0,34	AP2 ^R

RESISTANCE analyse de survie analysée à l'aide d'un modèle de Cox

Effet du QTL mesuré comme le risque relatif (B57^S comme référence, risque relatif = 1)

LRTmax : maximum du test du ratio des vraisemblances (Likelihood ratio test)

Significativité au niveau du chromosome : * : P < 0,05

Significativité au niveau du génome : **** : P < 0,05

3.1.3.3. Comparaison des résultats avec l'EXP3a : l'effet de la souche de *F. psychrophilum* sur la résistance

Dans le cas de **l'injection**, respectivement 8 et 6 QTL associés à des caractères de résistance sont détectés dans les EXP3a (souche FRGDSA 1882/11) et 3b (souche JIP02/86) (Tableau 7). Seuls deux QTL de RESISTANCE, sur Omy3 et Omy17, sont partagés entre les deux expériences pour ce mode d'infection. En effet, leurs positions sont proches, les intervalles de confiance se chevauchent et l'origine grand-parentale de l'allèle favorable est la même (AP2^R).

Tableau 7. QTL associés aux différents caractères de résistance dans après une infection par **injection et/ou **balnéation** l'EXP3a et après infection par **injection** l'EXP3b**

	EXP3a - FRGDSA 1882/11		EXP3b - JIP 02/86
	Balnéation	Injection	Injection
Omy1			RESISTANCE
Omy2	RESISTANCE - STATUT		RESISTANCE
Omy3	RESISTANCE - STATUT	RESISTANCE - STATUT	RESISTANCE
Omy7.1	STATUT		
Omy7.2	STATUT		
Omy7.3 ?			RESISTANCE
Omy10		RESISTANCE	
Omy15		ENDURANCE	RESISTANCE
Omy17	STATUT	STATUT	RESISTANCE
Omy20	ENDURANCE		
Omy21	RESISTANCE - STATUT		
Omy24	STATUT		
Omy25a	STATUT	STATUT	
Omy26		RESISTANCE - STATUT	
Omy27	ENDURANCE		
Omy29.1		STATUT	
Omy29.2		RESISTANCE – STATUT - ENDURANCE	

Les QTL en bleu sont détectés uniquement par **balnéation**, les QTL en orange sont détectés uniquement par **injection** et les QTL en noirs sont communs à l'**injection** et la balnéation

Le QTL sur Omy3 est l'un des plus significatifs dans les deux expériences, il permet à 80% des individus porteurs de l'allèle AP2^R de survivre contre 38% des individus porteurs de l'allèle B57^S dans l'EXP3a. Dans l'EXP3b, la survie est de 60% pour les individus porteurs de l'allèle AP2^R et de 22% pour les individus porteurs de l'allèle B57^S. Le QTL sur Omy17, très significatif dans l'analyse avec la souche JIP02/86, n'est détecté qu'une fois l'effet du QTL sur Omy3 fixé dans l'analyse avec la souche FRGDSA 1882/11.

Il est intéressant de noter que certains QTL associés à la RESISTANCE suite à l'**injection** avec la souche JIP02/86 sont aussi associés à l'ENDURANCE ou à la RESISTANCE avec la souche FRGDSA 1882/11 dans d'autres situations. Par exemple, le QTL sur Omy2 qui, dans l'EXP3a, est associé à la RESISTANCE après une infection par **balnéation** est associé à la RESISTANCE par **injection** dans le cas de l'EXP3b. Ou encore le QTL sur Omy15, associé à l'ENDURANCE après une infection par injection dans l'EXP3a. Pour ce QTL, avec la souche la plus virulente, les individus porteurs de l'allèle de résistance (AP2^R) survivent en moyenne 5 jours de plus que les individus porteurs de l'allèle B57^S mais finissent par mourir (§ 3.1.2.1. Table 1). Avec la souche la moins virulente, les individus porteurs du même allèle favorable AP2^R ont une meilleure chance de survie (+ 2,6 jours).

3.1.3.4. Discussion et conclusion : effet des souches bactériennes

L'image générale qui se dégage après la comparaison entre EPX3a et EXP3b est donc plutôt celle de déterminismes génétiques de la réponse à l'infection partagés quelle que soit la souche bactérienne utilisée. En effet, seul deux QTL associés à la résistance après une infection par la souche JIOP 02/86 ne sont pas détectés après une infection par la souche FRGDSA 1882/11. Les 4 autres QTL, communs entre les deux souches, sont les principaux QTL modulant des caractères de résistance (les plus significatifs et avec le plus fort effet).

Ces résultats permettent aussi de nuancer la spécificité de certains QTL détectés uniquement après une méthode d'infection. En effet, le QTL sur Omy2 associé à la RESISTANCE après balnéation est aussi détecté après une injection avec la souche JIP02/86. Comme la souche JIP02/86 est bien moins virulente que la souche FRGDSA 1882/11, on peut faire l'hypothèse que le QTL sur Omy2 est plutôt associé à des mécanismes de défense qui seraient stimulés par une infection plus faible et qui sont dépassés en cas d'infection massive. Une partie des mécanismes de résistance seraient donc spécifique à l'intensité de l'infection. Cependant, deux QTL détectés uniquement après l'infection par balnéation dans l'EXP3a (Omy21 et Omy24) ne sont pas détectés l'EXP3b. Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle ces QTL seraient associés spécifiquement à des mécanismes de défenses stimulés uniquement par la balnéation, possiblement liés aux barrières externes comme le mucus ou la peau. Ils n'ont, par ailleurs, jamais été mis en évidence dans d'autres expériences utilisant l'injection comme protocole infectieux.

Message principal du chapitre 3.1.3.

Après une infection par **INJECTION** on détecte :

- **6 QTL** associés à la résistance avec la souche **JIP02/86**
- **8 QTL** associés à la résistance avec la souche **FRGDSA 1882/11**
- **3 QTL communs** entre les souches JIP02/86 et FRGDSA 1882/11 dont

On détecte en plus un QTL sur **Omy2**, associé à la résistance par :

Balnéation avec la souche **FRGDSA 1882/11**

Injection avec la souche **JIP02/86**

Deux souches différentes de *Flavobacterium psychrophilum* stimulent des mécanismes immunitaires communs

3.1.4. La réponse précoce à l'infection dans la rate : charge bactérienne précoce et expression de gènes codant pour la protéine C3 du système du complément

La capacité d'un poisson à contrôler précocement l'invasion par l'agent pathogène est vraisemblablement déterminante pour la survie ultérieure. Une étude antérieure conduite au laboratoire avait notamment montré que les poissons issus d'une lignée résistante à *F. psychrophilum* présentaient à 5 jours une charge bactérienne dans le pronéphros inférieure à celle de poissons issus d'une lignée sensible (Langevin et al., 2012). Dans un premier temps, nous avons donc cherché d'éventuels facteurs génétiques associés, d'une part à l'augmentation de la taille de la rate (rapport spléno-somatique), symptôme classique suite à une infection bactérienne, et d'autre part à la charge bactérienne précoce dans la rate afin d'évaluer dans quelle mesure le poisson contrôle ou non la multiplication de l'agent pathogène dans les phases précoces de l'infection.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de deux gènes codant pour la protéine C3 du système du complément, *c3* et *c3-3*. Le système du complément est un élément important de la réponse immunitaire innée à une infection bactérienne et son fonctionnement s'organise principalement autour de la protéine C3. Or le gène *c3* est placé à proximité du QTL de résistance détecté sur Omy2 dans les EXP3a et EXP3b. Le gène *c3-3* est lui positionné dans l'intervalle de confiance du QTL sur Omy17 détecté dans les deux mêmes expériences. De plus, dans la publication de Langevin et al., (2012), l'infection induisait plus fortement l'expression du gène *c3* dans le rein antérieur des poissons issus de la lignée résistance (A03^R) que pour les poissons issus de la lignée sensible (B57^S).

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus dans l'EXP3b, sur des individus issus du croisement HD-(AP2^R/B57^S), infectés par injection intramusculaire avec la souche JIP02/86. Une partie des résultats a été obtenue avant le début de ma thèse (recueil des phénotypes, quantification de la charge bactérienne, mesure d'expression des gènes). J'ai réalisé le génotypage par RADseq des individus (inclus dans l'EXP3a) et les analyses de détection de QTL pour la charge bactérienne et de eQTL pour l'expression des deux gènes *c3* et *c3-3*. La carte génétique utilisée dans cette expérience est celle construite dans l'EXP3a (§ 3.1.2.1).

3.1.4.1. Méthodologie

Afin de pouvoir récupérer des rates de taille suffisante, une partie des individus issus de la famille HD-(AP2^R/B57^S) de l'EXP3b ont été conservés naïfs jusqu'à un poids moyen de 90 g puis infectés par injection intramusculaire avec la souche JIP02/86. Ils ont ensuite été sacrifiés à quatre temps après l'infection, T1 = 8h30, T2 = 22h, T3 = 46h, T4 = 76h (T0 = individus naïfs contrôles). La rate de chaque individu a été prélevée, pesée et utilisée pour quantifier d'une part la charge bactérienne et d'autre part l'expression des deux gènes *c3* et *c3-3*.

Les résultats associés à la charge bactérienne seront présentés dans le paragraphe 3.1.4.2, les résultats d'expression des deux gènes *c3* et *c3-3* seront présentés dans le paragraphe 3.1.4.3.

3.1.4.2. Rapport spléno-somatique et charge bactérienne précoce dans la rate

Résultats préliminaires

Comme attendu, une augmentation du rapport spléno-somatique (RSS) a été observée dans les heures suivant l'infection (significative dès 22h post-infection), témoin d'une progression de l'infection (Figure 29).

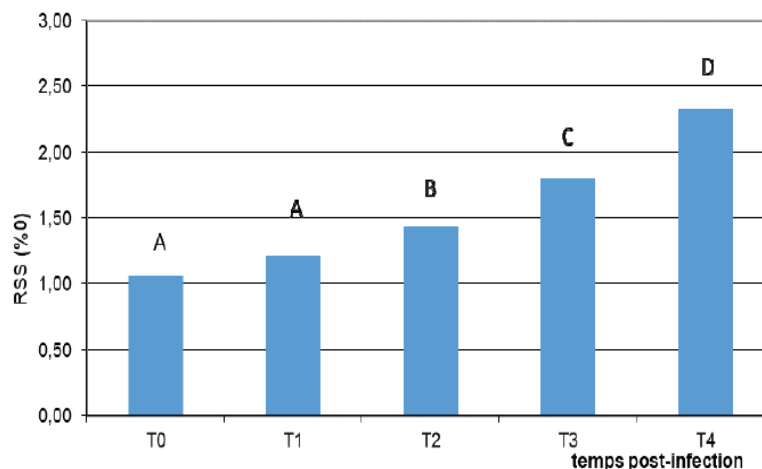


Figure 29. EXP3b : Evolution du rapport spléno-somatique dans la famille HD-(AP2^R/B57^S) après une infection par injection avec la souche JIP02/86

RRS : rapport spléno-somatique (poids de la rate/poids corporel, en pour mille).
n= 37 à T0, entre 71 et 75 pour les autres temps

La mesure de la charge bactérienne par qPCR a été effectuée sur les échantillons prélevés 76h après infection. La qPCR n’a fonctionné que sur 65 des 75 échantillons disponibles (problème de témoin interne). La distribution des concentrations en ADN bactérien (de 0 à 94 copies de génome bactérien par ng d’ADN total) est présentée en figure 30. Pour la suite des analyses, la charge bactérienne a été analysée comme une variable discrète, avec 3 classes : neg, individus pour lesquels la qPCR est négative (absence de bactérie, ou concentration inférieure au seuil de détection) ; pos : individus dont la charge bactérienne mesurée est inférieure ou égale à 5 copies/ng d’ADN total ; pos+ : individus dont la charge bactérienne est supérieure à 5 copies/ng d’ADN total.

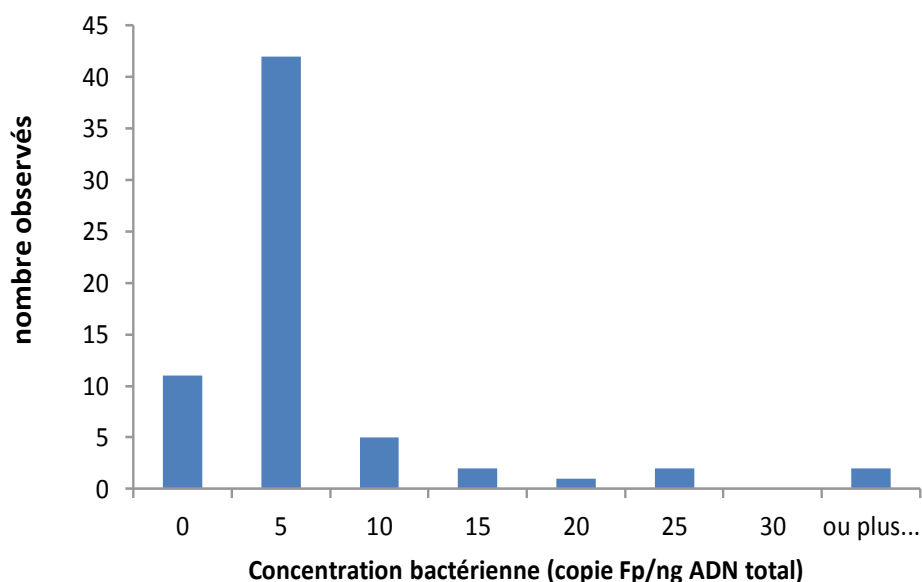


Figure 30. EXP3b : Distribution des valeurs individuelles de charge bactérienne dans la rate de poissons issu de la famille HD-(AP2^R/B57^S) 76h après une injection avec la souche JIP02/86

Le tableau 8 montre que la charge bactérienne et l’indice spléno-somatique, deux marqueurs de la progression de l’infection, évoluent de façon conjointe. En effet, le RSS le plus élevé est observé dans le groupe (pos+) ($P < 0.5$). La différence de RSS entre les groupes (neg) et (pos) n’est pas significative.

Tableau 8. EXP3b: Valeur moyenne du rapport spléno-somatique en fonction de la charge bactérienne dans la rate 76h après l'injection avec la souche JIP02/86

Charge bactérienne dans la rate	Rapport spléno-somatique (10 ³ mg/g)
neg	1,88 ± 0,53 sd ^a
pos	2,09 ± 0,97 sd ^a
pos+	2,85 ± 1,38 sd ^b

Détection de QTL

Les individus prélevés à 76 heures ont été génotypés par RADseq (voir § 3.1.2.1), en même temps que les animaux de l'EXP3a. Seuls 51 individus, génotypés pour 9 654 marqueurs de la carte construite dans l'EXP3a, ont pu être exploités au final pour la détection de QTL.

Aucun QTL significatif associé au rapport spléno-somatique n'a été mis en évidence.

Deux QTL associés à la charge bactérienne précoce dans la rate ont été mis en évidence sur les chromosomes 3 et 13 (Tableau 9). Ces deux QTL sont très significatifs et la lignée résistance AP2^R est à l'origine de la charge bactérienne la plus faible dans la rate.

Tableau 9. EXP3b : QTL associés à la charge bactérienne dans la rate de poissons HD-(AP2^R/B57^S) 76h après une infection par injection intramusculaire à l'aide de la souche JIP02/86

QTL	Position des marqueurs flanquants (Mb)	Intervalle de confiance (Mb)	LRTmax (significativité)	Origine de l'allèle favorable
Omy3	56,5-57,4	56,5 - 63,2	16,8****	AP2 ^R
Omy13	31,6-32,7	19,5 - 40,0	14,7***	AP2 ^R

LRTmax : maximum du test du ratio des vraisemblances (Likelihood ratio test)

Significativité : *** P < 0.001 au niveau du chromosome, **** p < 0.05 au niveau du génome

Le QTL sur Omy3 est identique au QTL de résistance identifié dans l'EXP3a et l'EXP3b (même allèle favorable AP2^R, position similaire) tandis que le QTL sur Omy13 n'a jamais été mis en évidence dans les expériences précédentes.

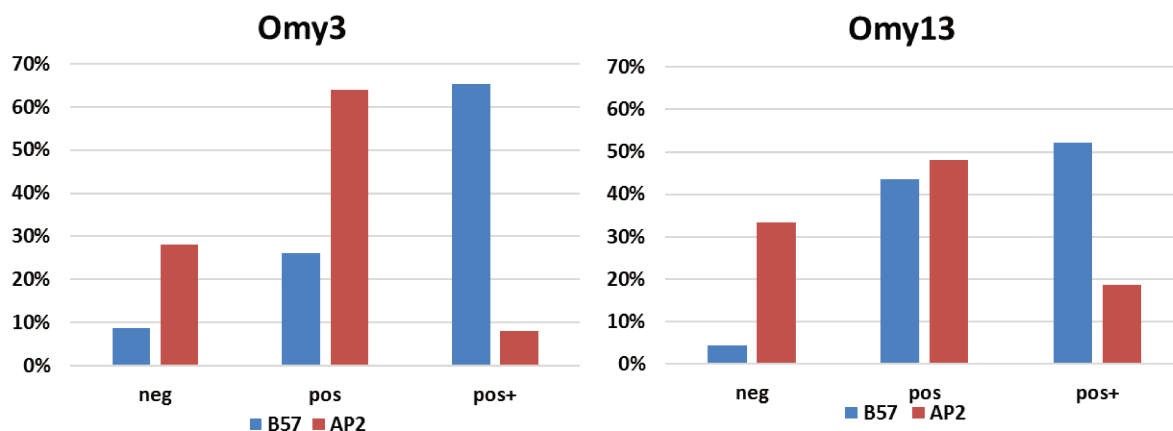


Figure 31. EXP3b : Répartition des individus en fonction de l'origine (AP2^R ou B57^S) de l'allèle à Omy3 et Omy13 dans les trois catégories de charge bactérienne dans la rate mesurée 76h après infection par injection avec la souche JIP02/86 de *F. psychrophilum*

La figure 31 présente la proportion d'individus dans chacune des trois classes de charge bactérienne selon l'allèle aux deux QTL identifiés. Pour les deux QTL, les individus porteurs de l'allèle de résistance (AP2^R) sont largement surreprésentés parmi les individus ayant une charge bactérienne nulle. Cette proportion s'inverse pour les individus ayant une charge bactérienne élevée. En effet, sur Omy3, 65% des individus porteurs de l'allèle B57^S au QTL sont classés pos+ et 9% ont une charge nulle (neg) tandis que seulement 8% des individus porteurs de l'allèle AP2^R ont une charge bactérienne très importante (pos+). Pour le QTL sur Omy13, 52% des homozygotes B57^S sont classés pos+ et seulement 4% une charge nulle (neg).

3.1.4.3. Expression des gènes *c3* et *c3-3* dans la rate 76h après l'infection

La figure 32 montre l'évolution de l'expression des deux gènes *c3* et *c3-3* dans la rate d'individus HD- (AP2^R/B57^S) aux différentes dates après l'injection avec la souche JIP02/86.

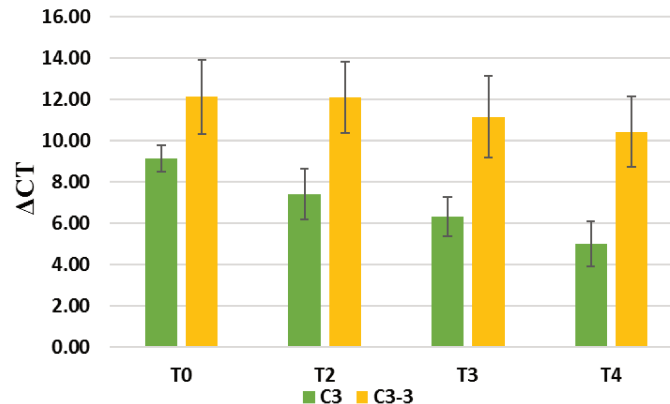


Figure 32. EXP3b : Evolution de l'expression (Δ CT) des deux gènes *c3-3* (Omy17) et *c3* (Omy2) dans la rate après une infection expérimentale par injection avec *F. psychrophilum*

CT = Cycle threshold.

Le Δ CT mesure la différence entre le CT du gène étudié et le CT du ou des gènes de normalisation utilisés

T0 mesure l'expression dans les poissons naïfs, T2 = 22h post infection, T3 = 46h post infection, T4 = 76h post infection (moyenne $\pm$ écart-type)

L'infection induit une augmentation de l'expression des deux gènes dès 22h (T2) après l'infection pour le gène *c3* et à partir de 46h (T3) après l'infection pour le gène *c3-3* (Figure 32). L'induction est plus marquée pour le gène *c3* que pour le gène *c3-3*.

Nous avons détecté 5 eQTL associés à l'expression de ces deux gènes. Deux eQTL sur Omy3 et Omy19 gouvernent l'expression du gène *c3-3*. Trois eQTL sur Omy 15, Omy17 et Omy19 contrôlent l'expression du gène *c3* (Tableau 10).

Tableau 10. EXP3b : QTL associé à l'expression dans la rate 76h après une infection expérimentale par injection avec la souche JIP02/86 de *F. psychrophilum* de deux gènes *c3-3* et *c3* codant pour les protéines C3-3 et C3 du système complément

Gène	QTL	Position des marqueurs flanquants(Mb)	Intervalle de confiance (Mb)	LRTmax (significativité)	Allèle associé à une expression élevée	% variance phénotypique expliquée
<i>c3-3</i>	Omy3	79,4	10,8 - 79,4	10,3*	B57 ^S	20,44%
<i>c3-3</i>	Omy19	16,1 - 20,7	7,8 - 25,0	11,4*	AP2 ^R	21,97%
<i>c3</i>	Omy15	13,0 - 13,7	5,7 - 26,3	12,0**	B57 ^S	22,91%
<i>c3</i>	Omy17	20,2 - 20,5	14,0 - 40,3	11,1**	B57 ^S	21,20%
<i>c3</i>	Omy19	24,6 - 24,7	7,8 - 55,2	7,4*	AP2 ^R	14,13%

Le gène *c3-3* est positionné sur le chromosome 17 et le gène *c3* est positionné sur le chromosome 2

LRTmax : maximum du test du ratio des vraisemblances (Likelihood ratio test)

Significativité au niveau du chromosome : * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$

Expression quantifiée comme la différence d'expression entre le niveau mesuré dans la rate d'individus sains et le niveau mesuré dans la rate 76h après infection

L'expression d'aucun des deux gènes n'est régulée par un eQTL situé sur le même chromosome que le gène (régulation TRANS). Ces résultats incitent donc à conclure que ce n'est pas un polymorphisme du/des gène(s) *c3* ou *c3-3* ou des régions promotrices qui sont à l'origine des variations du niveau d'expression, et qu'il s'agit plutôt d'une régulation en lien avec les différentes voies d'activations du système du complément, avec néanmoins un eQTL (sur Omy19) commun aux deux gènes étudiés. Ce QTL ne correspond à aucun des QTL détectés dans les analyses précédentes pour d'autres caractères dans ce même croisement HD-(AP2^R/B57^S).

Une certaine prudence est de mise pour discuter les résultats obtenus, compte tenu de la puissance modeste du dispositif étudié. Cependant trois de ces eQTL sont probablement identiques aux QTL associés à la résistance dans l'EXP3a ou l'EXP3b.

Les deux eQTL détectés sur Omy15 et Omy17, sont probablement identiques aux QTL détectés comme associés à la résistance avec la souche JIP02/86 (EXP3b) mais aussi à l'endurance (Omy15) et la résistance (Omy17) avec la souche FRGDSA 1882/11 (EXP3a). En effet, leurs positions sont très proches, les intervalles de confiance chevauchant et pour Omy17 il y a un marqueur flanquant en commun avec l'EXP3a. En revanche, l'eQTL sur Omy3 est à une position distante du QTL de résistance détecté dans EXP3a et EXP3b (entre 56,5 et 63,1 Mb) et de charge bactérienne précoce dans EXP3b. Il semble donc qu'il s'agisse de deux QTL différents, même si les intervalles de confiance se chevauchent largement, on ne peut pas exclure que ces deux QTL soient identiques.

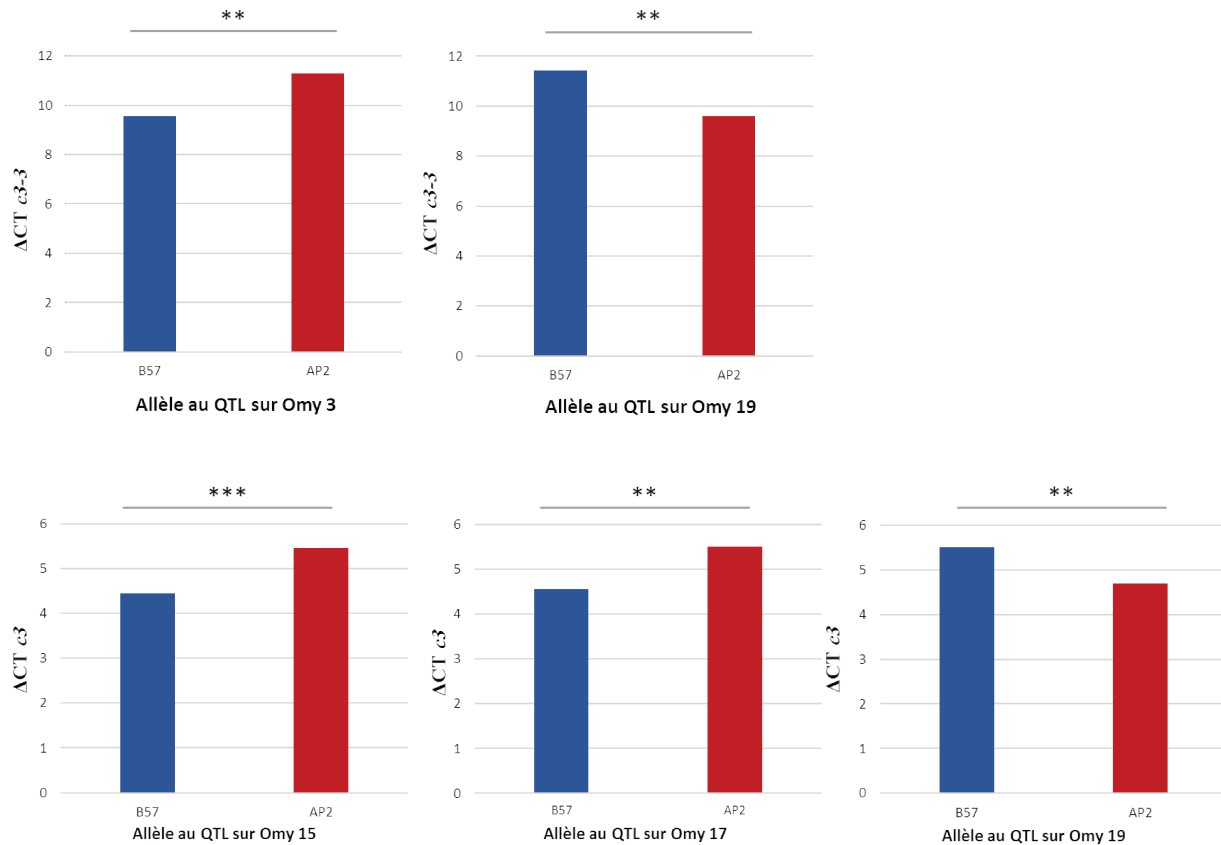


Figure 33. EXP3b : Niveau d’expression des gènes *c3-3* (haut de la figure) et *c3* (bas de la figure) dans la rate d’individus abattus 76h après une infection par injection avec *F. psychrophilum*, en fonction de leur allèle aux différents eQTL

ΔCT = différence entre le CT du gène étudié et le CT du ou des gènes de normalisations utilisés

La différence d’expression entre les deux allèles a été testée par un t-test, p-valeur du t-test < 0.001 : ***, p-valeur du t-test < 0.01 : **

L’effet des allèles au eQTL (Figure 33) sur Omy19 est conforme à l’effet attendu, les individus possédant l’allèle issu de la lignée isogénique la plus sensible (B57^S) ayant un niveau d’expression plus faible que les individus possédant l’allèle issu de la lignée AP2^R.

Les observations sont plus difficiles à interpréter pour les trois autres eQTL car l’expression des gènes est plus faible pour les individus porteurs de l’allèle issu de la lignée résistante AP2^R. De plus, pour les deux QTL sur Omy15 et Omy17, qui sont aussi des QTL de résistance, l’allèle qui améliore la résistance provient de la lignée AP2^R (Tableau 6). Ce résultat contraste avec l’effet relatif des allèles B57 et AP2 à ces eQTL sur l’expression des gènes *c3* et *c3-3* : en effet, l’allèle de la lignée résistante AP2^R semble associé à une plus faible expression du gène au moins à ce stade de l’infection.

3.1.4.4. Discussion et conclusion

Malgré le faible nombre d'individus, plusieurs QTL significatifs au niveau du chromosome ou du génome sont détectés, sans doute grâce à l'utilisation d'animaux HD.

Les différents résultats présentés ici ont été obtenus 76h après l'infection, soit bien avant le début de la mortalité, qui débute généralement une semaine à 10 jours après l'infection. Cependant, le QTL sur Omy3 associé à la charge bactérienne dans la rate gouverne aussi la survie en fin d'épisode infectieux (environ 1 mois après l'infection). L'issue de l'infection semble donc se jouer au moins en partie dans les étapes très précoces du processus infectieux.

Nous avons détecté cinq eQTL associés à l'expression de deux gènes, *c3* et *c3-3*, dans la rate après l'infection, deux gènes candidats positionnels pour les QTL de résistance sur Omy2 et Omy17 dans le cas de l'infection par injection et balnéation dans EXP3a et EXP3b. Parmi les 5 eQTL détectés, deux (Omy15 et Omy17) sont aussi associés à la résistance et l'endurance. Curieusement, si l'allèle favorable à la résistance pour ces QTL provient de la lignée AP2^R, cet allèle est associé au plus faible niveau d'expression des deux gènes. Il est cependant difficile d'émettre des hypothèses liant le niveau d'expression de gènes codant pour les protéines C3 et C3-3 dans la rate et la résistance.

Les résultats obtenus ici mettent en évidence que la régulation de l'expression de ces deux gènes n'est pas gouvernée par un polymorphisme à proximité (CIS) mais par un polymorphisme TRANS. Au vue des connaissances sur les différentes voies d'activation du système du complément, ce résultat n'est pas surprenant. Il serait néanmoins intéressant de continuer à étudier l'importance du complément C3 dans la résistance à l'infection à l'aide de méthodes de protéomique permettant de suivre la cinétique de production de la protéine C3, rouage essentiel dans l'immunité antibactérienne.

Les résultats de ce chapitre mettent en évidence qu'une partie des mécanismes immunitaires impliqués dans la régulation précoce de la charge bactérienne dans un organe cible de *F. psychrophilum* contribuent à la survie à l'infection.

Message principal du chapitre 3.1.4. :

Le contrôle précoce de la prolifération bactérienne dans la rate semble être un des déterminants de la résistance (un QTL commun entre les deux caractères sur Omy3)

Les variations d'expression de 2 gènes candidats codant pour les protéines C3 et C3-3 du système du complément ne sont pas régulées par des polymorphismes dans ou à proximité de ces gènes.

3.2. La résistance à la flavobactériose en condition d'élevage

Cette seconde partie de ma thèse s'inscrit dans le projet 57K-Truite (FranceAgriMer, n° SIVAL 2015-0638). L'objectif de ce projet est la caractérisation génétique des populations françaises de truite arc-en-ciel à l'aide de la première puce 57 000 SNP (57K) et les premières applications en élevage du génotype HD. Il s'agit d'un projet commun entre le SYSSAF et l'INRA, le premier à utiliser la puce de génotypage Axiom™ Trout Genotyping Array (Affymetrix) en France avec comme perspective l'implémentation de la sélection génomique chez les éleveurs de truites français. Une première phase de ce projet consistait à évaluer l'informativité de la puce sur différentes populations de TAC françaises. J'ai travaillé sur la deuxième phase du projet dont l'objectif était l'utilisation de la puce pour identifier des QTL de résistance à *F. psychrophilum* dans une population commerciale (Les Aquaculteurs Bretons) après un épisode naturel de mortalité qui avait été suivi dans le cadre du projet FUI Re-sist.

En 2014, une infection spontanée par *F. psychrophilum* a été suivie sur un lot de 2 400 alevins dans les installations de l'entreprise de sélection Les Aquaculteurs Bretons. Les poissons n'ont reçu aucun traitement, les individus morts ont été collectés deux fois par jours et stockés individuellement dans l'alcool pour la suite du projet. Plusieurs contrôles vétérinaires ont été réalisés à différents moments pendant l'épisode infectieux pour vérifier la présence de l'agent pathogène dans les poissons morts. Dans le cadre du projet Re-sist, le pedigree de 1 733 alevins a pu être reconstruit en utilisant des marqueurs microsatellites pour estimer l'héritabilité des caractères de résistance. Le projet 57K-Truite prévoyait l'utilisation d'une seule puce de génotypage (384 individus), la baisse des coûts a permis de génotyper finalement 720 individus.

Dans l'EXP4, j'ai échantillonné ces 720 individus parmi les 1 733 assignés afin de représenter au mieux la structure de la population tout en minimisant l'apparement moyen entre les individus, et d'avoir les deux phénotypes (mort/vivant) en proportion équivalente (environ 50%). J'ai aussi choisi les individus de manière à représenter l'ensemble de la courbe de mortalité en évitant les mortalités précoces (avant le 5e jour) possiblement dues à d'autres facteurs que la maladie, et les mortalités tardives (après le 45e jour) possiblement dues à une surinfection. J'ai ensuite analysé les génotypes obtenus et effectué une détection de QTL avec deux méthodes de GWAS (Genome Wide Association Study). Les principaux résultats obtenus ont fait l'objet d'une communication courte publiée dans la revue **Animal Genetics** qui fait l'objet de la partie 3.2.1. Les résultats complémentaires, non inclus dans cette communication sont présentés dans la partie 3.2.2 avant une courte conclusion.

3.2.1. Publication scientifique : "La résistance des truites arc-en-ciel à la flavobactériose d'eau froide : identification de deux nouveaux QTL après un épisode de mortalité naturel dans une pisciculture française"

Rainbow trout resistance to bacterial cold water disease: two new quantitative trait loci identified after a natural disease outbreak on a French farm

C. Frasin^{*†} , S. Brard-Fudulea^{*}, J. D'Ambrosio^{*†}, A. Bestin^{*}, M. Charles[†], P. Haffray^{*}, E. Quillet[†] and F. Phocas[†]

^{*}SYSAAF Section Aquacole, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, France. [†]GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Summary

In rainbow trout farming, *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial cold water disease, is responsible for important economic losses. Resistance to *F. psychrophilum* is heritable, and several quantitative trait loci (QTL) with moderate effects have been detected, opening up promising perspectives for the genetic improvement of resistance. In most studies however, resistance to *F. psychrophilum* was assessed in experimental infectious challenges using injection as the infection route, which is not representative of natural infection. Indeed, injection bypasses external barriers, such as mucus and skin, that likely play a protective role against the infection. In this study, we aimed at describing the genetic architecture of the resistance to *F. psychrophilum* after a natural disease outbreak. In a 2000-fish cohort, reared on a French farm, 720 fish were sampled and genotyped using the medium-throughput Axiom™ Trout Genotyping Array. Overall mortality at the end of the outbreak was 25%. Genome-wide association studies were performed under two different models for time to death measured on 706 fish with validated genotypes for 30 060 SNPs. This study confirms the polygenic inheritance of resistance to *F. psychrophilum* with a few QTL with moderate effects and a large polygenic background, the heritability of the trait being estimated at 0.34. Two new chromosome-wide significant QTL and three suggestive QTL were detected, each of them explaining between 1% and 4% of genetic variance.

Keywords aquaculture, *Flavobacterium psychrophilum*, genome-wide association study, heritability

Health management is a major issue for sustainable aquaculture. Bacterial cold water disease (BCWD) caused by *Flavobacterium psychrophilum* is one of the major diseases affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) worldwide. Resistance to *F. psychrophilum* is heritable, and several quantitative trait loci (QTL) with moderate effects have been described. In most studies, resistance was assessed after an experimental infectious challenge using intramuscular or intraperitoneal injection as the route of infection. However, injection is not representative of natural infection, as it bypasses external barriers (e.g. skin, mucus) that likely play

a protective role against infection (Boutin *et al.* 2014; Guardiola *et al.* 2014). In this study, we took advantage of a natural BCWD outbreak on a farm to characterize the genetic bases of resistance in a French rainbow trout population using the medium-throughput Axiom™ Trout Genotyping Array (57 501 SNP markers; Palti *et al.* 2015a).

The fish belonged to a trout line that was selected at the breeding company Les Aquaculteurs Bretons (Brittany, France) for five generations by combined mass selection for growth and external morphology as a proxy of gutted yield (Haffray *et al.* 2013). The samples used in this study were collected in a previous project (RE-SIST project, 15th FUI, France), during a natural BCWD outbreak that occurred in an all-female group of 2000 fish (progeny from 69 dams and 97 sires in total, mated according to a 10-partial-factorial design with an average of 17.8 half-sibs per sire and 25.1 half-sibs per dam). The

Address for correspondence

F. Phocas, GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France.
E-mail: florence.phocas@inra.fr

Accepted for publication 13 January 2019

	A G E	12777	WILEY	Dispatch: 13.2.19	CE: Saranya R
	Journal Code	Manuscript No.		No. of pages: 5	PE: Prasanna Venkatesan

outbreak started in January 2014 in fish with an average weight of 0.3 g. Dead fish were collected daily. Veterinary controls were performed on dead fish at five different time points to assess the presence of *F. psychrophilum* as the source of mortality. Bacterial isolates were later characterized using multi-locus sequence type data belonging to the clonal complex CC-ST90 known to infect rainbow trout in France (Duchaud *et al.* 2018). Fish that died before the first positive control for *F. psychrophilum* ($n = 30$) were not included in the dataset to be sure that mortality was due to BCWD. Mortality was recorded for 94 days, and surviving fish were euthanized on day 95. All collected fish were individually stored in absolute ethanol. Mortality reached a plateau at day 60 (25% survival; Fig. S1), and *F. psychrophilum* was no longer detected at this date. Therefore, fish that died after day 60 were considered to be resistant, and fish that died between days 5 and 60 were considered to be susceptible (Fig. S1). To increase the probability that death was due to BCWD, fish that died between the last positive and the first negative control for *F. psychrophilum* ($n = 88$) were not sampled (Fig. S1). Among the initial cohort of 2000 individuals, 1733 fish had previously been correctly assigned to a single mating pair (unpublished data) using microsatellite genotyping (Labogena DNA; <http://www.labogena.fr/en>). For SNP genotyping, this pedigree information was used to sample 720 fish (290 resistant and 430 dead fish) that best represented the family structure of the population while minimizing the mean kinship between individuals. All 97 sires and 69 dams were represented in the genotyped progeny sample (see Table S1) with an average of 7.4 paternal half-sibs and 10.4 maternal half-sibs per family.

DNA extraction from the 720 fish samples followed standard procedures. Genotyping was performed with the 57K SNP array at the Gentyane genotyping platform (INRA, UMR GDEC; <http://gentyane.clermont.inra.fr/>). To solve issues due to the pseudo-tetraploid nature of the rainbow trout genome, as false discovery of paralogous sequence variants (Berthelot *et al.* 2014; Palti *et al.* 2014), all probes were positioned with a BLASTN[®] procedure on the new genome assembly (Omyk_1.0, USDA/ARS, NCBI 2017; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002163495.1/) and only 50 820 SNPs with a unique position were kept. Quality controls were performed as described by D'Ambrosio, Phocas, Haffray, Bestin, Brard-Fudulea, Quillet, Dechamp, Fraslin, Charles & Dupont-Nivet (in preparation) using AXIOM ANALYSIS SUITE software (version 2.0.0.35; Affymetrix 2016) and a homemade bioinformatics pipeline using PLINK software (version 1.09; Chang *et al.* 2015). SNPs that had a call rate lower than 97% and a minor allele frequency lower than 5% and that departed from Hardy-Weinberg equilibrium (P -value < 0.0001) were discarded. A total of 706 fish and 30 060 SNP genotypes were retained after quality controls.

Resistance to BCWD was measured as time to death (TTD), defined as the number of days between the start of mortality recording and the day the fish succumbed to the disease. A value of 61 days was assigned to any resistant fish. Pedigree-based heritability was estimated along with the genetic, phenotypic and environmental variances using the AIREML algorithm of BLUPF90 software (Miszta *et al.* 2002) and considering records for the 1733 phenotyped fish with a five-generation pedigree.

A first genome-wide association study (GWAS) was performed on the 706 genotyped and phenotyped fish using GENOME-WIDE COMPLEX TRAIT ANALYSIS (GCTA) software with the leave-one-chromosome-out (MLMA-LOCO) option (Yang *et al.* 2011, 2014). GCTA is a marker-by-marker analysis under a mixed linear model, considering a correction for data structure based on a genomic relationship matrix. The model fits jointly the fixed effect of the candidate SNP (to be tested for association) and the random polygenic effect of other SNPs. With the MLMA-LOCO option, markers on a given chromosome are tested using the genomic relationship matrix built from remaining chromosomes so candidate markers are not double-fitted in the model. This first GWAS was used to calculate chromosome-wide significance thresholds with a Bonferroni correction and approximate confidence intervals (CIs) for the QTL. The drop-off method [1.5 unit of $-\log_{10}(P\text{-value})$, as described by Li (2011)] was used to define a conservative CI with a maximum distance of 1.5 Mb between two successive SNPs over the drop-off limit starting from the peak SNP. A Manhattan plot was created using the QQMAN R package (Turner 2014; Fig. 1).

To quantify the effect of QTL detected with GCTA, another GWAS was performed (Fig. S2) using the single-step GBLUP (ssGBLUP) method implemented in BLUPF90 software (Miszta *et al.* 2002, 2015). This method combines the SNP information for the 706 genotyped fish and the phenotype and pedigree data for the 1733 phenotyped individuals in a single analysis under a mixed linear model (Wang *et al.* 2012). The POSTGSF90 program implemented in BLUPF90 software (Aguilar *et al.* 2014) was used to derive SNP effects from estimated breeding values. Using the windows_variance_mbp option, 1-Mb exclusive windows were created to better quantify the effect of a QTL and to estimate the proportion of genetic variance explained by the 1-Mb region in ssGBLUP. Then we cumulated the 1-Mb windows corresponding to the GCTA approximate CI of the QTL to estimate the proportion of the TTD genetic variance explained by the QTL. Some SNPs that corresponded to suggestive QTL regions after the GCTA analysis (just below the chromosome-wide significance threshold) were considered in the analysis only if the cumulative 1-Mb windows that matched the approximate CI explained more than 1% of the genetic variance. Lastly, due to the small size of our dataset, we performed a weighted ssGBLUP (wssGBLUP) analysis (Wang *et al.* 2012) to get better estimates of the QTL effects. As in Vallejo *et al.* (2017b), we re-ran a second

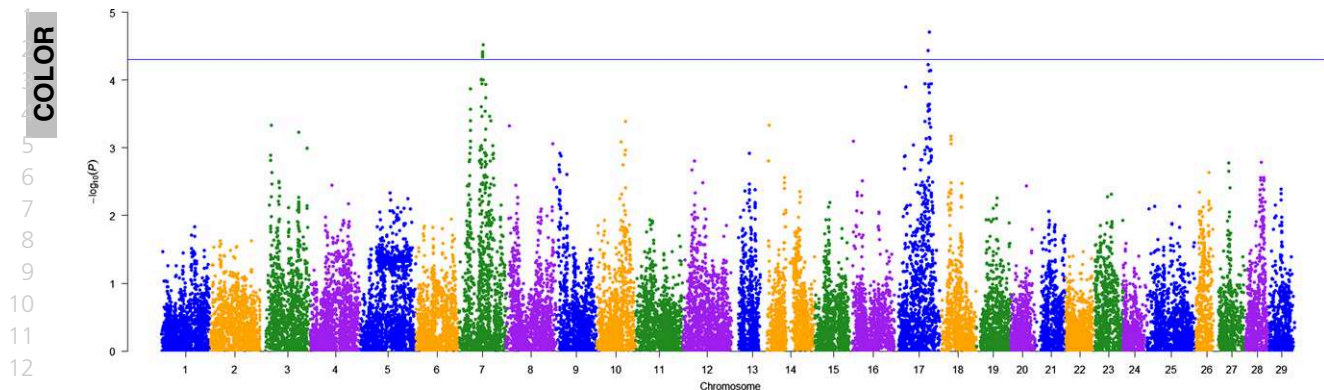


Figure 1 Manhattan plot showing associations between SNPs and resistance to bacterial cold water disease (measured as time to death) detected with GCTA. The blue line represents the 5% chromosome-wide Bonferroni significance thresholds.

iteration of ssGBLUP considering individual SNP variances (derived from SNP effects estimated in the first iteration) as weights.

Moderate heritability of 0.34 was estimated for TTD, which is in the range of previous results (Leeds *et al.* 2010; Vallejo *et al.* 2017b) and confirms that resistance to BCWD can be improved through selection.

In total, five QTL associated with TTD were detected on four different chromosomes with two QTL on chromosome 7 (Table 1). Two chromosome-wide significant QTL were detected, at 41.61 Mb on Omy7 and at 59.33 Mb on Omy17. Based on ssGBLUP results, they explained 1.0% and 2.1% of genetic variance respectively. The corresponding proportions of variance explained under wssGBLUP were 2.1% and 3.9% for the QTL on Omy7 and Omy17 respectively. In addition, three suggestive QTL were detected on Omy3, on Omy7 at 19.34 Mb and on Omy10. They explained between 1.2% and 1.6% of the genetic variance. Although the five main peak SNPs were not the same between the two GWAS analyses, the two significant QTL (at 41.61 Mb on Omy7 and on Omy17) from the GCTA analysis corresponded to the two cumulative 5-Mb windows that explained the largest proportion of the TTD genetic variance in the ssGBLUP analysis. In addition, two of the three suggestive QTL (at 41.61 Mb on Omy7 and on Omy3)

were the fourth and the fifth highest ranked cumulative 5-Mb windows respectively in the ssGBLUP analysis. Finally the QTL on Omy10 corresponds to the 19e cumulative 5-Mb window. Using the wssGBLUP approach, the proportion of genetic variance explained by the QTL was approximately doubled for each of the five QTL regions; however, the proportion remained moderate, ranging between 2.1% and 3.9%.

To the best of our knowledge the QTL at 41.61 Mb on Omy7 and at 59.33 on Omy17 have never been identified in previous studies using injection as infection protocol. QTL on Omy3 and Omy10 were detected in previous studies using injection as the experimental route of infection (Campbell *et al.* 2014; Vallejo *et al.* 2017b). The suggestive QTL at 19.34 Mb on Omy7 was probably already described by Palti *et al.* (2015b) even if the position differs slightly between the two studies (15.99–16.37 Mb in Palti *et al.* 2015b).

Our work is the first to use the 57K SNP array to investigate the genetic architecture of resistance to *F. psychrophilum* after a natural outbreak of BCWD. This allowed us to investigate the whole set of resistance mechanisms involved in host response, including those that might not be triggered after a challenge using injection to inoculate the pathogen. The two new QTL (at 41.61 Mb

Table 1 Summary of genome-wide association study results: QTL positions (GCTA analysis) and proportions of genetic variance of time to death explained (ssGBLUP and wssGBLUP analysis).

Chromosome	Peak SNP	SNP peak position (Mb)	Significance [$-\log_{10}(P\text{-value})$]	Confidence interval (CI) (Mb)	% Of variance explained by the CI window	
					ssGBLUP	wssGBLUP
Omy3	AX-89967826	64.97	3.2	62.46–65.84	1.6	2.9
Omy7	AX-89937283	19.34	3.9	16.13–20.09	1.3	3.1
Omy7	AX-89941977	41.61	4.5 ¹	37.86–41.72	1.0	2.1
Omy10	AX-89966252	49.88	3.4	41.42–49.89	1.2	2.4
Omy17	AX-89938324	59.33	4.7 ¹	56.41–60.99	2.1	3.9

¹Chromosome-wide significance (5%) thresholds calculated with a Bonferroni correction considering 1000 SNP in average per chromosome.

on Omy7 and on Omy17) that were not detected in previous studies using injection challenges may be specific to the genetic background of the line used in the study or related to defence mechanisms triggered by the natural entry of the pathogen into the fish. Interestingly, this new QTL at 41.61 Mb on Omy7 QTL was recently detected after a *F. psychrophilum* experimental waterborne challenge in a doubled haploid progeny from another trout population (Fraslin *et al.* 2018), supporting the hypothesis that it corresponds to defence mechanisms specifically triggered after external route of infection (in contrast to injection). Altogether, we detected only five QTL. The limited number of fish used here can be responsible for a loss of power in QTL detection and can partially explain this result. Nevertheless, those QTL had moderate effects, confirming the polygenic inheritance of resistance to *F. psychrophilum*. Taken together, our results and the high gain in accuracy expected for genomic selection compared to pedigree-based selection (Vallejo *et al.* 2017a) pave the way toward the implementation of genomic selection for resistance against *F. psychrophilum* in rainbow trout.

In conclusion, we extended the interest of some QTL that have been detected in trout populations from different genetic origins and infected with different protocols (injection vs natural infection; different bacterial isolates). Two newly detected QTL may be specific to mechanisms associated with the natural entry of the bacteria. Further investigation into the relative share of such mechanisms in trout resistance to *F. psychrophilum* are needed and could guide the choice of the most efficient protocol of infection (injection, waterborne experimental or natural infection) to be used if resistance to *F. psychrophilum* is to be implemented in breeding programs.

Acknowledgements

This work was funded by the French Government and the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF) via FranceAgriMer the national public authority for agriculture and sea products (no. 2015-0638). We gratefully acknowledge E. Belmonte and C. Poncet from the Gentyane genotyping platform (UMR GDEC 1095, INRA) for the genotyping. This study re-used fin clips collected previously at SARL les Aquaculteurs Bretons (Milin Nevez, France). As part of a commercial breeding program, their use was not subjected to oversight by an institutional ethic committee. The handling of fish during the observation period after the natural outbreak occurred had been conducted under the supervision of an official veterinary and included specific measures to limit suffering (maintenance of water quality, daily feeding, minimization of handling and removing fish near death). Restrictions apply to the datasets: The datasets for this manuscript are not publicly available because data belong to a private company. The data can be made available for reproduction of the results on request via a material transfer

agreement (contact Alexandre Desgranges, keryas@bretagne-truite.fr).

References

- Affymetrix (2016) *Axiom™ Analysis Suite 2.0 UserGuide*. https://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/axiom_analysis_suite_user_guide.pdf
- Aguilar I., Misztal I., Tsuruta S., Legarra A. & Wang H. (2014) PREGSF90 – POSTGSF90: Computational tools for the implementation of single-step genomic selection and genome-wide association with ungenotyped individuals in BLUPF90 programs. In: *Proceedings of 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Presented at the 10 World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Vancouver, Canada.
- Berthelot C., Brunet F., Chalopin D. *et al.* (2014) The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications* **5**, 3657.
- Boutin S., Sauvage C., Bernatchez L., Audet C. & Derome N. (2014) Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS One* **9**, e102649.
- Campbell N.R., LaPatra S.E., Overturf K., Towner R. & Narum S.R. (2014) Association mapping of disease resistance traits in rainbow trout using restriction site associated DNA sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **4**, 2473–81.
- Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C., Vattikuti S., Purcell S.M. & Lee J.J. (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* **4**, 7.
- Duchaud E., Rochat T., Habib C. *et al.* (2018) Genomic diversity and evolution of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Frontiers in Microbiology* **9**, 138.
- Fraslin C., Dechamp N., Bernard M. *et al.* (2018) Quantitative trait loci for resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions. *Genetics Selection Evolution* **50**, 60.
- Guardiola F.A., Cuesta A., Abellán E., Meseguer J. & Esteban M.A. (2014) Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* **40**, 24–31.
- Haffray P., Bugeon J., Rivard Q., Quittet B., Puyo S., Allamelou J.M., Vandeputte M. & Dupont-Nivet M. (2013) Genetic parameters of *in-vivo* prediction of carcass, head and fillet yields by internal ultrasound and 2D external imagery in large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **410–411**, 236–44.
- Leeds T.D., Silverstein J.T., Weber G.M., Vallejo R.L., Palti Y., Rexroad C.E., Evenhuis J., Hadidi S., Welch T.J. & Wiens G.D. (2010) Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *Journal of Animal Science* **88**, 1936–46.
- Li H. (2011) A quick method to calculate QTL confidence interval. *Journal of Genetics* **90**, 355–60.
- Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T. & Lee D.H. (2002) *BLUPF90 and related programs (BGF90)*. Presented at the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, p. 2.
- Misztal I., Tsuruta S., Lourenco D., Aguilar I., Legarra A. & Vitezica Z. (2015) *Manual for BLUPF90 Family of Programs*. University of Georgia, Athens, GA.

- Palti Y., Gao G., Miller M.R., Vallejo R.L., Wheeler P.A., Quillet E., Yao J., Thorgaard G.H., Salem M. & Rexroad C.E. (2014) A resource of single-nucleotide polymorphisms for rainbow trout generated by restriction-site associated DNA sequencing of doubled haploids. *Molecular Ecology Resources* **14**, 588–96.
- Palti Y., Gao G., Liu S., Kent M.P., Lien S., Miller M.R., Rexroad C.E. & Moen T. (2015a) The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources* **15**, 662–72.
- Palti Y., Vallejo R.L., Gao G., Liu S., Hernandez A.G., Rexroad C.E. & Wiens G.D. (2015b) Detection and validation of QTL affecting bacterial cold water disease resistance in rainbow trout using restriction-site associated DNA sequencing. *PLoS One* **10**, e0138435.
- Turner S.D. (2014) QQMAN: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. *Journal of Open Source Software* **3**, 731.
- Vallejo R.L., Leeds T.D., Gao G., Parsons J.E., Martin K.E., Evenhuis J.P., Fragomeni B.O., Wiens G.D. & Palti Y. (2017a) Genomic selection models double the accuracy of predicted breeding values for bacterial cold water disease resistance compared to a traditional pedigree-based model in rainbow trout aquaculture. *Genetics Selection Evolution* **49**, 17.
- Vallejo R.L., Liu S., Gao G. *et al.* (2017b) Similar genetic architecture with shared and unique quantitative trait loci for bacterial

cold water disease resistance in two rainbow trout breeding populations. *Frontiers in Genetics* **8**, 156.

Wang H., Misztal I., Aguilar I., Legarra A. & Muir W.M. (2012) Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genetics Research* **94**, 73–83.

Yang J., Lee S.H., Goddard M.E. & Visscher P.M. (2011) GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics* **88**, 76–82.

Yang J., Zaitlen N.A., Goddard M.E., Visscher P.M. & Price A.L. (2014) Advantages and pitfalls in the application of mixed model association methods. *Nature Genetics* **46**, 100–6.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the supporting information section at the end of the article.

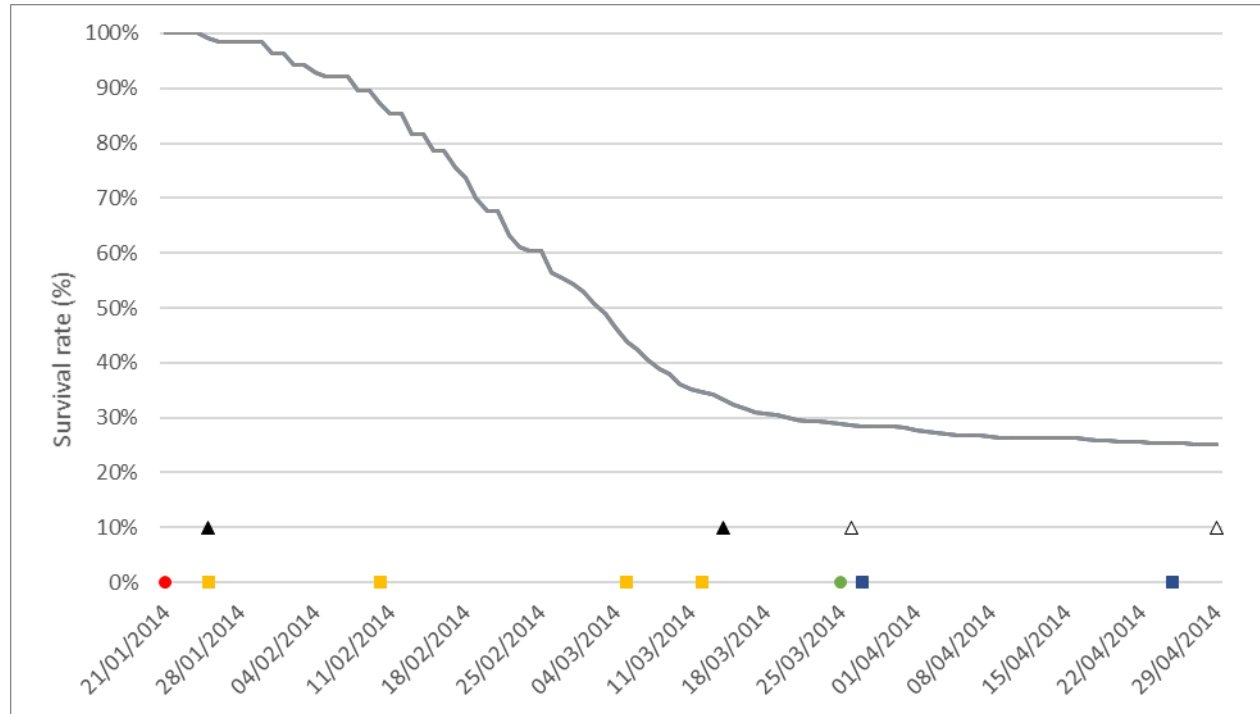
Figure S1 Cumulated survival rate for all 2000 phenotyped fish after a natural outbreak of BCWD on a farm.

Figure S2 Manhattan plot showing the percentage of genetic variance of resistance explained by SNPs estimated with ssGBLUP after a natural disease outbreak.

Table S1 Summary of phenotyped and genotyped fish used in the GWAS.

Supporting information

Figure S1. Cumulated survival rate for all 2 000 phenotyped fish after a natural outbreak of BCWD in a farm.

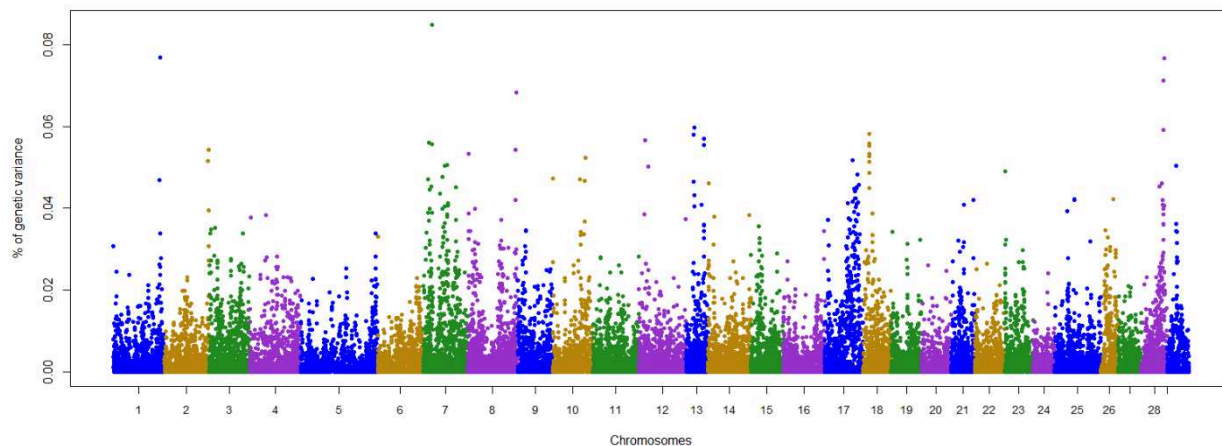


Red dot correspond to the first day of mortality. Green dot correspond to the last day of mortality recording. Yellow and blue squares correspond to positive and negative testing of the presence of *Flavobacterium psychrophilum* in dead fish, respectively. The two full black triangles point the first sampling and last sampling dates of susceptible fish and the two light black triangle point the first and last sampling dates of resistant fish.

Table S1. Summary of phenotyped and genotyped fish used in the GWAS

		Total number of progeny	Sire		Dam	
			Number represented	Average number of half- sib progeny ($\pm$ sd)	Number represented	Average number of half-sib progeny ($\pm$ sd)
Number phenotyped individuals	of	1,733	97	17.9 $\pm$ 9.33	69	25.1 $\pm$ 11.84
Number genotyped and phenotyped individuals	of	706	97	7.4 $\pm$ 2.79	69	10.4 $\pm$ 4.20

Figure S2. Manhattan plot showing the percentage of genetic variance of resistance explained by SNP estimated with ssGBLUP after a natural disease outbreak.



Resistance to *Flavobacterium psychrophilum* measured as time to death; proportion of genetic variance explained by every SNP estimated with the PostGF90 option of BLUPF90 software.

3.2.2. Résultats complémentaires : GWAS sur le caractère STATUT (mort/vivant)

Pour compléter l'analyse sur la date de mort (DDM) j'ai analysé le caractère STATUT (binaire : mort = 0 vs. vivant = 1) à l'aide des deux mêmes modèles statistiques. Comme les QTL détectés avec cette méthode ne sont pas significatifs, ils n'ont pas été inclus dans le projet de manuscrit ci-dessus.

L'héritabilité du caractère STATUT a été estimée à $0,27 (\pm 0,049)$, la variance phénotypique à $0,21 (\pm 0,008)$ et la variance génétique à $0,06 (\pm 0,012)$. L'héritabilité est cohérente avec les valeurs estimées dans des études précédentes (Robinson et al., 2017) et, bien que modérée, confirme que la résistance à *F. Psychrophilum* peut être améliorée grâce à la sélection.

Dans la figure 34, on observe de nombreux pics correspondant à autant de QTL potentiels, avec deux QTL dont les SNP les plus significatifs sont juste sous le seuil de significativité au niveau du chromosome.

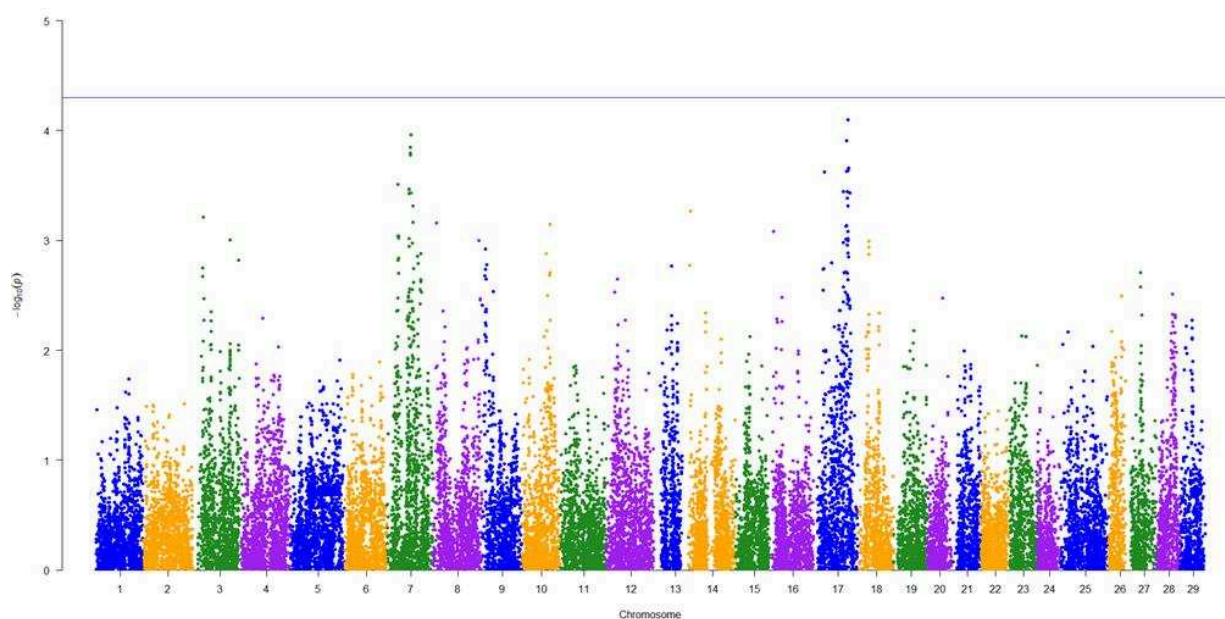


Figure 34. EXP4 : Manhattan plot représentant l'association entre les SNP et la résistance à *F. psychrophilum* mesurée par le caractère STATUT détecté à l'aide du logiciel GCTA

La ligne bleue correspond au seuil de significativité à 5% au niveau du chromosome, calculé à l'aide d'une correction de Bonferroni en considérant 1 000 SNP en moyenne par chromosomes. Chaque groupe de couleur correspond à l'ensemble des SNP sur un chromosome.

Tableau 11. EXP4 : Résumé de la détection de QTL associés au STATUT

Chromosome	Top SNP	Position du top SNP (Mb)	Significativité $-\log_{10}(p_valeur)$	Confidence interval (Mb)	% of variance explained by cumulative windows matching the CI
Omy7	AX-89931665	40,23	4.1 ^{NS}	34,89 – 41,91	1,9 %
Omy7	AX-89927063	45,14	4.1 ^{NS}	43,91 – 47,44	1,0 %
Omy10	AX-89975265	42,32	3.2 ^{NS}	39,69 – 46,35	0,9 %
Omy17	AX-89930846	57,19	4.1 ^{NS}	56,41 – 64,59	2,8 %

La position du QTL provient de l'analyse GCTA, la proportion de variance génétique expliquée par le SNP le plus significatif et par l'intervalle de confiance ont été obtenues avec l'analyse ssGBLUP. Aucun QTL n'est significatif : ^{NS}.

On détecte 4 QTL associés avec le caractère STATUT (Tableau 11), seul le QTL à 45,14 Mb sur Omy7 n'est associé qu'au caractère STATUT. Les trois autres QTL ont en effet été aussi identifiés dans l'analyse sur le caractère DDM (voir § 3.2.1. Figure 1). Quels que soient les QTL, la part de variance génétique expliquée reste modeste, allant de 0,9% pour Omy10 à 2,8% pour Omy17.

Les QTL détectés avec le STATUT ne sont pas significatif mais le fait de détecter 3 QTL communs avec la DDM renforce leur intérêt et permet d'accorder une certaine confiance à ces QTL détectés avec un dispositif peu puissant.

3.2.3. Bilan de l'approche sur une lignée standard

Au total, en prenant en compte les analyses réalisées sur les deux caractères DDM et STATUT, nous détectons 6 QTL associés à la résistance à *F. psychrophilum* dans cette population de TAC, dont seulement 2 QTL significatifs au niveau du chromosome. La moitié des QTL détectés, dont celui à 40,23 Mb sur Omy7 et celui sur Omy17 qui sont les seuls significatifs et qui expliquent la part la plus élevée de variance génétique, est détectée dans les deux analyses, ce qui conforte l'existence de ces QTL. En vue d'une éventuelle introduction de la résistance à *F. psychrophilum* dans les objectifs des schémas de sélection truiticole français, il est tout à fait envisageable de ne mesurer qu'un seul de ces deux caractères pour limiter les coûts, dans ce cas, le caractère STATUT est le plus facile à mesurer et est aussi le caractère qui est directement intéressant pour les éleveurs, dont l'objectif est de diminuer la mortalité.

Parmi les 6 QTL associés à la résistance détectés dans cette étude, le deuxième QTL sur Omy7 semble n'avoir jamais été détecté dans les études précédentes. Les 5 autres correspondent à des QTL identifiés dans les croisements expérimentaux étudiés pendant cette thèse (Figure 35). D'autre part, les QTL sur Omy3, Omy10 et Omy17 et les deux premiers QTL sur Omy (Omy7.1 et Omy7.2) ont aussi été mis en évidence dans deux études sur des populations américaines (Vallejo et al., 2017 ; Campbell et al., 2014).

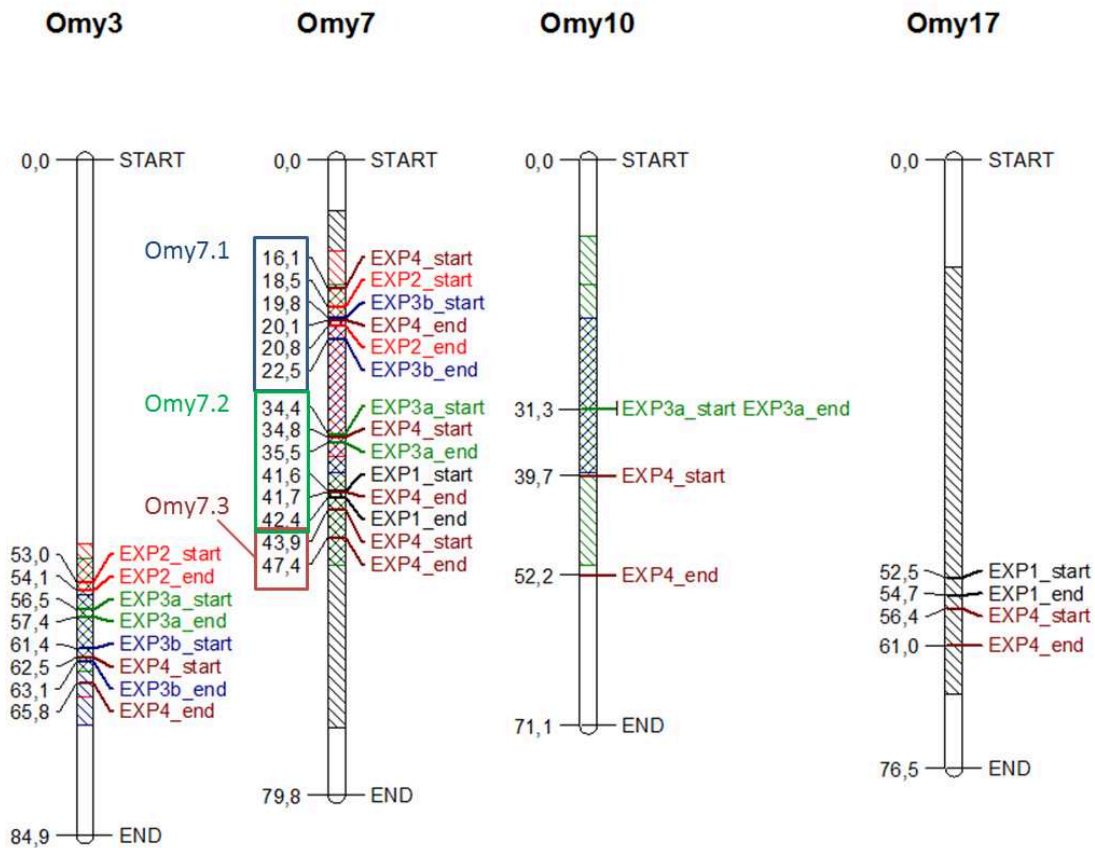


Figure 35. Résumé des différents QTL associés à la DDM et/ou au STATUT détectés dans l'EXP4 et déjà identifiés dans les croisements expérimentaux

Les QTL sont placés sur les chromosomes selon la position sur le génome de leurs 2 marqueurs flanquants pour les QTL identifiés dans les EXP 1 à 3b et en fonction de l'intervalle de confiance à 95% pour les QTL identifiés dans l'EXP4. Les intervalles de confiances de QTL identifiés dans les EXP1 à 3b sont matérialisés par des zones hachées.

Il est intéressant de noter que les QTL sur Omy10 et Omy17 détectés ici après une infection naturelle, ont aussi été mis en évidence dans les croisements issus de lignées isogéniques après des infections par injection. Ces deux QTL ne semblent donc pas spécifiques de la voie d'infection.

Le deuxième QTL sur Omy7 n'a été détecté dans l'EXP1 et l'EXP3a qu'après une infection par balnéation. Enfin sur la base de la position des marqueurs flanquants et des intervalles de confiance, il est difficile de dire si le troisième QTL sur Omy7 est un QTL nouveau, ou le même que le QTL détecté après une infection par balnéation dans l'EXP1 et l'EXP3a (Figure 35). Quoiqu'il en soit, ce/ces QTL serai(en)t donc plutôt lié(s) à des mécanismes de défense stimulés par l'entrée de la bactérie dans l'hôte.

Le petit nombre de QTL significatifs détectés par rapport à des études précédentes est certainement lié au manque de puissance du dispositif (703 individus). Initiée à un moment où le prix de la puce était encore élevé, le nombre de poissons inclus dans le dispositif était limité. De plus, l'étude de diversité génétique réalisée par d'Ambrosio et al. (in prep.) a depuis mis en évidence une diversité génétique relativement modérée dans la population étudiée, avec un déséquilibre de liaison important ce qui limite la précision de la détection du QTL (intervalles de confiance larges de 3 à 7 Mb).

Malgré ce petit nombre de QTL détectés, les héritabilités modérées et les faibles proportions de variance génétique expliquées (7,6 et 6,6% pour la DDM et le STATUT, au total) on peut raisonnablement qualifier la résistance à *F. psychrophilum* de polygénique, dans cette population.

Cette étude confirme aussi l'intérêt d'utiliser la sélection génomique plutôt que la sélection assistée par marqueurs pour implémenter la résistance à *F. psychrophilum* dans les schémas de sélection truiticoles français.

Message principal du chapitre 3.2 :

Cette étude est la première réalisée dans une **lignée commerciale** après un **épisode de mortalité spontané**:

- Nous avons mis en évidence un nouveau QTL de résistance, possiblement spécifique de la voie d'infection ou du fond génétique
- Nous avons détecté 6 QTL de résistance avec des effets modérés (expliquant jusque 2% de la variance génétique)
- 5 QTL ont par ailleurs été mis en évidence dans les croisements expérimentaux
- Le troisième QTL sur Omy7, seulement identifié dans cette étude, est possiblement associés à des mécanismes immunitaires spécifiquement stimulés par l'infection naturelle

La **résistance** à *Flavobacterium psychrophilum* est **polygénique** :

- Héritabilité modérée de la DDM (0,34) et du STATUT (0,27)
- Proportion totale modérée de variance génétique expliquée par l'ensemble des QTL (moins de 8%)

Cette étude est une première étape vers la mise en place de la sélection génomique pour la résistance à la flavobactériose dans les populations de truites françaises

4. DISCUSSION GENERALE

Sommaire de la Discussion générale

4.1.	INTERETS ET LIMITES DE L'ETUDE	221
4.1.1.	<i>Les ressources génétiques utilisées</i>	221
4.1.2.	<i>Les outils de génotypage.....</i>	223
4.1.3.	<i>Phénotyper la réponse à <i>Flavobacterium psychrophilum</i></i>	224
4.2.	DIVERSITE DES DETERMINISMES GENETIQUES CHEZ LES TRUITES ARC-EN-CIEL POUR REpondre A L'INFECTION PAR <i>F. PSYCHROPHILUM</i>	228
4.2.1.	<i>Différentes composantes de la réponse à l'infection, en partie contrôlées par des déterminismes génétiques spécifiques.....</i>	228
4.2.2.	<i>La résistance à <i>F. psychrophilum</i>, un caractère polygénique dont le déterminisme est complexe</i>	230
4.2.3.	<i>L'effet du protocole infectieux sur les déterminismes génétiques de la résistance.....</i>	233
4.2.4.	<i>Un noyau de QTL associés à la résistance, quel que soit le caractère et le protocole infectieux</i>	236
4.3.	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES : L'AMELIORATION GENETIQUE DE LA RESISTANCE A <i>FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM</i>	239
4.3.1.	<i>Quels caractères faut-il améliorer ?.....</i>	239
4.3.2.	<i>Avec quelle méthode d'infection ?</i>	241
4.3.3.	<i>Avec quelle méthode de sélection?</i>	242

En production piscicole, comme dans les autres filières de production animale, la santé des cheptels et la maîtrise des maladies est un enjeu majeur de compétitivité et de durabilité des filières. Les maladies d'origine bactérienne sont responsables de pertes économiques importantes. Elles sont assez systématiquement combattues à l'aide de traitements antibiotiques alors que la réduction de l'antibiothérapie en production animale constitue une priorité nationale soutenue par le Plan Antibiorésistance (EcoAntibio 2012-2017, Ministère de l'Agriculture). *Flavobacterium psychrophilum* est l'une des bactéries pathogènes les plus importantes dans toutes les zones de production de salmonidés. En France, elle touche majoritairement la truite arc-en-ciel (TAC) qui est la principale espèce piscicole produite. En l'absence de vaccin commercial efficace, l'introduction rapide de la résistance à *F. psychrophilum* dans les objectifs de sélection est une priorité pour maintenir la compétitivité des entreprises françaises. Les estimations d'héritabilité réalisées dans différentes populations de TAC varient entre 0,07 et 0,56 (Henryon et al., 2005 ; Silverstein et al., 2009). Des simulations ont montré que ces valeurs d'héritabilité devraient permettre l'obtention de progrès génétique dans les conditions technico-économiques des entreprises de sélection truitières en France (Chapuis et al., 2012). Le développement des outils de génotypage à haut débit permet d'envisager l'identification et l'utilisation en sélection de marqueurs génétiques associés à la résistance individuelle des TAC afin de tirer profit de la variabilité génétique individuelle pour améliorer l'efficacité de la sélection.

Dans ce contexte, ma thèse avait pour objet l'analyse de l'architecture génétique de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum* chez différentes populations de TAC françaises. Les objectifs étaient dans un premier temps, d'étudier les déterminismes génétiques de différentes composantes de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum* par une approche de détection de QTL ; puis d'évaluer dans quelle mesure ces déterminismes sont partagés entre différents protocoles infectieux et s'ils sont exploitables en sélection dans les lignées commerciales françaises.

Pour cela, j'ai utilisé des croisements expérimentaux entre lignées isogéniques de TAC pour explorer le déterminisme de différentes composantes de la réponse à l'infection après des infections induites selon deux protocoles, par injection ou par balnéation. J'ai ainsi cherché à (i) identifier les principaux déterminants génétiques de ces composantes, puis à (ii) mieux comprendre l'impact du protocole infectieux (méthode d'infection, souche infectieuse) sur les modalités de la résistance et enfin à (iii) caractériser la réponse précoce à l'infection dans la rate et son rôle potentiel dans l'issue de l'infection au niveau individuel. Enfin, j'ai étendu les analyses à une population de truites élevées dans une entreprise de sélection française, pour avoir une image de l'architecture génétique de la résistance dans une population standard et valider l'intérêt des QTL détectés dans les croisements expérimentaux.

4.1. Intérêts et limites de l'étude

4.1.1. Les ressources génétiques utilisées

Les croisements expérimentaux : lignées isogéniques et individus haploïdes doublés

La majorité des résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus à partir de croisements expérimentaux entre lignées isogéniques choisies pour leur résistance contrastée à *F. psychrophilum*. Les descendances étudiées étaient soit composées d'individus haploïdes doublés (HD) obtenus par reproduction gynogénétique d'une femelle F1, soit d'un croisement F2 lorsque la gynogenèse mitotique n'a pas permis d'obtenir des HD en effectif suffisant pour un dispositif QTL.

Les travaux de caractérisation des lignées isogéniques de l'INRA réalisés en amont de cette thèse ont permis d'identifier des croisements pertinents, entre lignées sensibles (B57^S, G17^S) à très sensibles (A36^S) et lignées plus résistantes (AP2^R, A02^R, A03^R), facilitant *a priori* la détection de QTL dans un dispositif avec des phénotypes « extrêmes ». D'autre part, la maîtrise développée au sein du laboratoire pour l'entretien et la reproduction des lignées isogéniques a permis de reproduire le même croisement, entre les lignées AP2^R et B57^S, à plusieurs années d'intervalle et ainsi de tirer profit d'un fond génétique identique pour comparer différents protocoles infectieux. Il aurait été intéressant d'utiliser des croisements encore plus contrastés, avec des lignées encore plus résistantes, mais l'entretien de tels individus étant laborieux, certains croisements n'étaient pas réalisables dans les contraintes du calendrier de la thèse.

Au moment de la mise en place des protocoles expérimentaux et jusqu'à mi-parcours de cette thèse, nous ne disposions que d'un génome de référence partiel (assemblage en chromosomes et scaffolds, mauvais ordonnancement des contigs...). L'utilisation des techniques de GBS comme le RADseq ou le ddRADseq et un génotypage *de novo*, permettait donc d'obtenir des génotypes sans informations *a priori* sur le génome. Dans ces conditions, l'utilisation d'individus HD était particulièrement intéressante pour discriminer facilement les variants entre deux locus différents (PSV) et les vrais SNP.

D'autre part, l'utilisation de descendances HD permet de limiter le nombre d'individus à considérer (entre 150 et 300) tout en conservant une puissance de détection de QTL raisonnable comme l'illustre la figure 36. Cette réduction du nombre d'individus nécessaires pour une puissance donnée est particulièrement intéressante dans le cas de caractères difficiles à mesurer, comme le sont typiquement les caractères de résistance aux maladies.

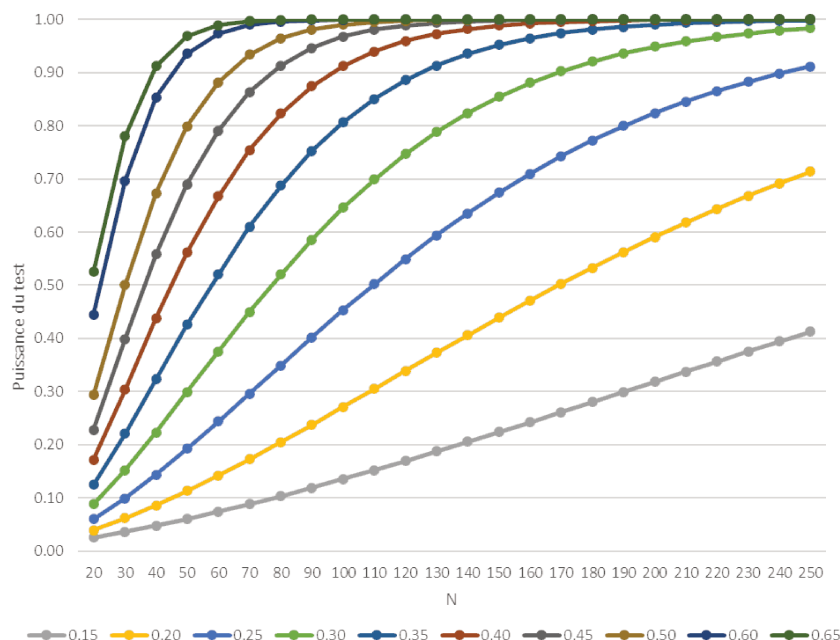


Figure 36. Puissance d'un t-test en fonction de l'effet de substitution allélique du QTL

N = nombre d'individus dans la population

Les différentes courbes ont été construites avec le package PWR (R Core Team, 2013) pour différentes valeurs de **a** qui correspondent à différents effets de substitution alléliques avec une erreur de type I = 1%

Pour une population F2 standard de 100 individus, un QTL avec un effet de substitution de **a** = 0,35 peut être détecté avec une puissance de 80%. Dans une population HD, il n'y a pas d'individu hétérozygote et les deux groupes de descendants sont uniquement constitués d'homozygotes. Ainsi, la différence d'effet entre les deux groupes est **2a**. De ce fait, pour une même puissance, avec des HD on peut détecter des QTL avec un effet de substitution allélique deux fois plus faible (**a** = 0,175).

Pour l'EXP1, la gynogenèse n'ayant pas fonctionné, c'est le croisement F2, réalisé par précaution qui a dû être utilisé. Dans cette expérience, on souffre donc d'une perte de puissance, par rapport aux expériences réalisées avec des HD.

La lignée commerciale

L'EXP4 a été réalisée sur une lignée commerciale, ce qui permettait de tester la généralité des QTL détectés dans les croisements expérimentaux dans une population sélectionnée par ailleurs pour des caractères de croissance et de rendement de découpe. Cette approche était d'autant plus intéressante qu'elle a permis d'utiliser une autre méthode de détection de QTL à l'aide d'une approche combinant l'analyse d'association et l'analyse de liaison (LD-LA).

Cependant, le nombre d'individus génotypés était contraint par le prix de la puce au moment de la conception du projet, ce qui a de fait limité la puissance de notre dispositif. De plus, nous avons fait le choix d'échantillonner les individus à génotyper de manière à représenter au mieux la structure de la

population. Nous avons ainsi constitué un échantillon composé de nombreuses familles de demi-germains avec un très petit effectif (moins de 10 individus). Si ce choix était judicieux pour détecter des QTL par une approche LD-LA, il n'a pas permis de proposer une étude plus poussée des gains génétiques potentiels en cas de sélection génomique sur ce caractère, pour laquelle des familles de plus grandes tailles auraient été préférables.

Aujourd'hui, le prix du génotypage avec la puce 57K a considérablement diminué, ce qui permet d'envisager de réaliser des approches LD-LA avec un plus grand nombre d'individus et donc une meilleure puissance de détection.

4.1.2. Les outils de génotypage

Le génotypage par séquençage : RADseq et ddRADseq

Le génotypage par séquençage (GBS) a été réalisé par deux techniques, le RADseq et le ddRADseq. Le RADseq, développé avec la plateforme GetPlaGe de l'INRA, a permis d'obtenir un nombre important de SNP (~10 000) et ainsi de construire une carte génétique relativement dense avec 2 130 positions pour 2 645 cM soit un 1 SNP tous les 1,2 cM en moyenne. En l'absence d'un assemblage du génome de qualité, l'approche RADseq est particulièrement intéressante et permet d'obtenir un nombre significatif de SNP polymorphes dans la population cible.

Cependant, les résultats du ddRADseq, approche choisie dans le cadre du projet européen Fishboost parce qu'elle permet de limiter fortement les coûts de préparation des librairies, ont été plutôt décevants. Les cartes génétiques produites étaient 2 à 3 fois moins denses qu'avec le RADseq (entre 800 et 1 300 marqueurs). Un des autres problèmes rencontrés spécifiquement dans l'EXP1 était le manque de répétabilité du ddRADseq entre les trois librairies préparées par le partenaire du projet, à différents moments. Pour maximiser le nombre de marqueurs dans nos analyses, nous avons dû traiter les librairies séparément, ce qui a compliqué la comparaison des QTL détectés puisqu'une partie des marqueurs sur les différentes cartes génétiques étaient spécifiques d'une analyse.

Ce manque de répétabilité entre librairies est en partie lié à l'étape de sélection de la taille des fragments qui peut conduire à produire des jeux de marqueurs différents pour les différentes librairies et donc augmenter le nombre de génotypes manquants en cas de groupement (Andrews et al., 2016). Un autre biais du ddRADseq peut intervenir au moment de l'étape de PCR, avec une amplification préférentielle des fragments courts dont la profondeur de couverture sera ensuite plus importante que pour des fragments plus longs, ce qui peut générer des erreurs de génotypage de type « *allele drop out* » dont il a été plus amplement question en introduction (§ 1.1.5.1 et Andrews et al., 2016).

En l'absence d'assemblage du génome de qualité, ces génotypages ont été réalisés *de novo*. Cependant, avec le nouvel assemblage du génome, il pourrait être intéressant de comparer les résultats de génotypage à de nouveaux génotypages obtenus en alignant les lectures sur le génome pour essayer de retrouver un plus grand nombre de marqueurs. Il aurait aussi été intéressant de réaliser un séquençage plus profond des parents et grands-parents et d'imputer les génotypes des descendants pour densifier les cartes génétiques obtenues.

La puce de génotypage Axiom™ Trout Genotyping Array (57K).

L'EXP4 était la première analyse réalisée en France avec la puce de génotypage 57K pour la truite. Cette puce commerciale permet de réaliser un génotypage relativement rapide, avec des marqueurs constants dans le temps, qui permettent donc d'accumuler les informations facilement d'une population à l'autre. Cependant, pour cette première utilisation, il a fallu réaliser un travail important de validation des marqueurs même s'il s'agissait d'un produit commercial. En effet, une partie non négligeable des marqueurs correspondaient en fait à plusieurs positions distinctes sur le génome (sans doute à cause d'un tri de départ inopérant pour s'affranchir complètement des effets de la tétraploïdie résiduelle).

Enfin, il a aussi été nécessaire de réaliser une étape de tri permettant d'éliminer les marqueurs présentant du polymorphisme d'amorce qui ne donnait pas un génotypage de qualité. Ces différentes étapes de tri ont été réalisées en étroite collaboration avec Jonathan D'Ambrosio, doctorant INRA/SYSAF de l'équipe. Au final, sur les 57 501 SNP de la puce, seulement 30 060 étaient informatifs dans la population, ce qui permet quand même de réaliser un génotypage plus dense qu'avec les techniques de GBS.

4.1.3. Phénotyper la réponse à *Flavobacterium psychrophilum*

Pour de nombreuses maladies, les caractères de résistance sont souvent complexes à phénotyper, c'est particulièrement vrai dans le cas de *F. psychrophilum* car les protocoles infectieux sont de plus particulièrement difficiles à maîtriser.

Infester avec *F. psychrophilum*

Les infections expérimentales

Les modèles d'infection expérimentale avec *F. psychrophilum* ont été mis au point tardivement par rapport à d'autres bactéries. L'infection expérimentale par balnéation n'est d'ailleurs maîtrisée que par un très petit nombre d'équipes et n'avait encore jamais été utilisée pour des analyses génétiques qui nécessitent

un nombre importants d'individus. La collaboration de longue date avec une équipe spécialiste de cette bactérie nous a permis de bénéficier de ce modèle original.

Dans la majorité des études réalisées sur *F. psychrophilum*, les infections expérimentales sont réalisées par injection. Cette méthode d'infection est la seule qui permet de standardiser la dose reçue par les individus, de connaître le moment précis de l'infection et d'être certain que l'ensemble des individus a été infecté. Seulement, avec *F. psychrophilum*, même l'infection par injection est difficile à maîtriser et peut provoquer d'importantes mortalités en fonction de la taille des poissons et de la virulence de la souche utilisée. C'est ce qui nous est arrivé dans l'EXP2 dans laquelle nous avons infecté par injection des poissons de petite taille, proche de la taille des poissons infectés par balnéation, pour minimiser la potentielle différence de réponse due à la maturation du système immunitaire. Le résultat a été une mortalité quasi complète (3% de survivants), limitant fortement les possibilités de détection de QTL.

L'infection par balnéation est particulièrement intéressante car elle permet, potentiellement, de détecter des déterminismes génétiques associés aux défenses immunitaires contournés par l'injection. Cependant, la dose reçue par chaque individu n'est pas maîtrisée et il est surtout impossible de savoir si chaque poisson a réellement été infecté, information primordiale à connaître lorsqu'on s'intéresse à la résilience et à la tolérance. Si l'infection par balnéation est plus proche d'une infection naturelle que l'infection par injection, elle n'est pas non plus une réplique exacte puisque les poissons sont infectés dans des conditions de stress (confinement) qui peuvent influencer leur réponse à l'infection, et que des concentrations bactériennes très supérieures à celles qui prévalent en conditions d'infection naturelle (10^7 à 10^9 cfu/mL) sont nécessaires pour induire l'infection.

Les épisodes naturels de mortalité

Dans l'EXP4, nous avons étudié la résistance après un épisode naturel de flavobactériose. C'est la première fois qu'une telle analyse est réalisée pour détecter des QTL associés à la résistance à *F. psychrophilum*. Cette approche est particulièrement intéressante car elle est réalisée dans les conditions d'élevage et permet donc d'éviter les biais liés à des infections expérimentales. Cependant, il est plus difficile d'obtenir des phénotypes aussi précis en conditions d'élevage. Les infections expérimentales permettent également de mesurer d'autres performances individuelles comme le poids avant, après et au moment de l'infection en marquant les poissons.

En vue d'une éventuelle reconduite de ce type d'analyse après un épisode naturel de mortalité, il serait intéressant de pouvoir collecter les individus morts deux fois par jour et réaliser immédiatement un prélèvement de nageoire en vue du génotypage. En effet, nous avons eu des problèmes de qualité d'ADN pour certains individus, probablement liés à l'activité protéolytique importante de la bactérie.

Les caractères de réponse à l'infection

Si le phénotypage de la résistance, une fois l'infection maîtrisée, est relativement aisé, il est plus difficile de phénotyper pour les autres composantes de la réponse à l'infection. Pour la tolérance, la mesure individuelle nécessaire à la détection de QTL est, en pratique, impossible à réaliser car elle nécessite de mesurer plusieurs fois la charge bactérienne, qui est un caractère léthal dans le cas de *F. psychrophilum*. La résilience est, quant à elle, plus facilement quantifiable (Figure 37).

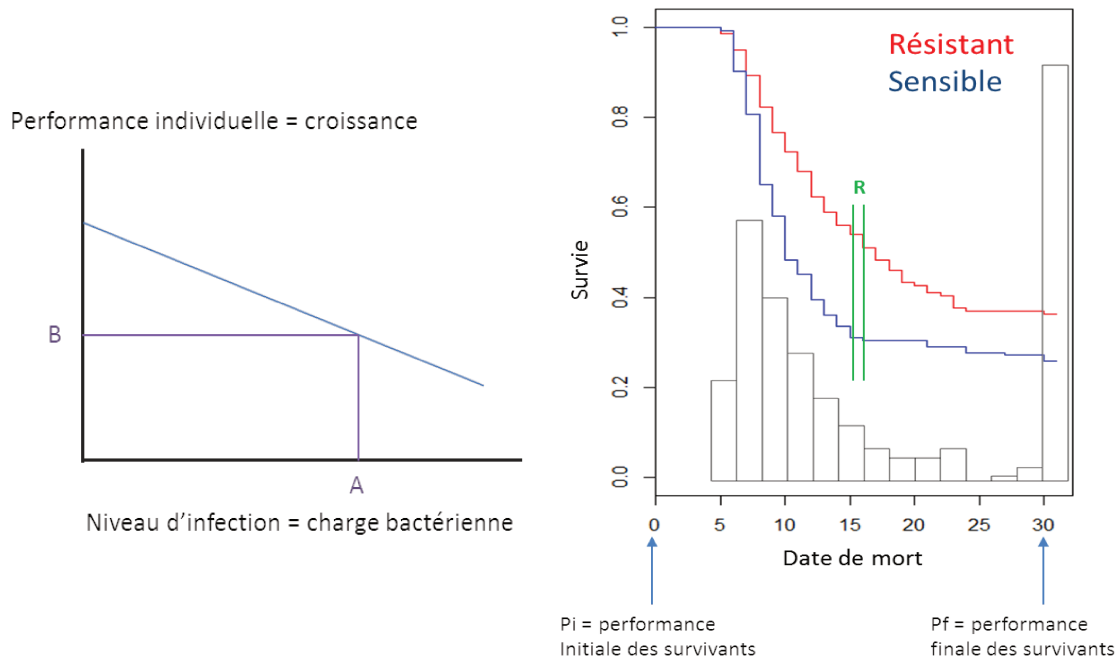


Figure 37. Rappel des approches théoriques et pratiques de la résistance, la tolérance et la résilience

Théoriquement (figure de gauche) : On mesure la **résistance**, au point **A**, comme le niveau d'infection, la **tolérance** comme la pente de la droite de régression performance = f(charge) et la **résilience**, au point **B**, comme une performance donnée pour un niveau de charge infectieuse donnée

En pratique (figure de droite) : On mesure la **résistance** comme la survie (**STATUT**), ou la date de mort (**ENDURANCE**) ou à l'aide de d'analyse de survies combinant les deux informations (**RESISTANCE** : **R** = risque relatif entre un individu **sensible** et un individu **résistant**). En l'absence de quantification de la charge bactérienne individuelle on mesure la **RESILIENCE** comme la performance finale des survivants (corrigée ou non pas leur performance initiale).

Adapté de (Bishop, 2012)

D'autres composantes de la réponse sont particulièrement intéressantes à prendre en compte. Il a par exemple été mis en évidence que la capacité d'un poisson à endiguer précocement l'invasion par un agent pathogène est vraisemblablement déterminante pour la survie dans de nombreuses maladies (Verrier et al., 2018). La rate étant un organe cible de *F. psychrophilum*, l'étude de la cinétique de la charge bactérienne précoce dans cet organe pourrait mettre en évidence des déterminismes génétiques liés au contrôle précoce de l'infection. Il était prévu dans une analyse associée à l'EXP3 de quantifier la charge bactérienne dans la rate 48h après des infections expérimentales avec la souche FRGDSA 1882/11, sur des effectifs relativement importants (~120 poissons). Cependant, sans doute en raison d'une infection moins intense qu'attendue, la multiplication de la bactérie dans la rate à la date de prélèvement s'est révélée inférieure au seuil de détection de la méthode de quantification (real-time PCR) disponible à ce moment-là. Nous avons donc dû utiliser les données de l'EXP3b réalisée sur un effectif bien moindre.

Dans l'EXP1, nous nous sommes aussi intéressés au portage dans la rate des individus survivants à l'infection. Cette information est particulièrement intéressante dans le cadre d'un programme de sélection. En effet, si les animaux résistants sont aussi porteurs sains du pathogène, ils peuvent jouer le rôle de réservoir et être responsables de nouvelles infections. Dans l'EXP1, nous avons contrôlé la présence de bactéries dans la rate relativement tôt en fin d'infection. La technique de mesure utilisée s'est révélée inadaptée à la mesure de très faible quantité de bactéries. Nous avons donc limité les mesures aux rates des individus infectés par injection (peu d'individus) et nous avons exploité le caractère de portage comme un caractère binaire (présence/absence).

Une nouvelle technique de détection par PCR numérique (appelée aussi ddPCR pour *droplet digital PCR*) est en cours de test au laboratoire et devrait nous permettre d'améliorer la détection et la quantification de la charge bactérienne et donc d'exploiter les informations de portage pour les individus infectés par balnéation dans l'EXP1 et de charge bactérienne précoce pour les individus de l'analyse associée à l'EXP3a. Des techniques très sensibles de détection seront aussi utiles pour confirmer le portage à des moments plus éloignés de la fin de l'épisode infectieux.

4.2. Diversité des déterminismes génétiques chez les truites arc-en-ciel pour répondre à l'infection par *F. psychrophilum*

4.2.1. Différentes composantes de la réponse à l'infection, en partie contrôlées par des déterminismes génétiques spécifiques

Le statut et l'endurance apportent des informations complémentaires sur la résistance

Les résultats obtenus dans les dispositifs expérimentaux ainsi que dans la lignée commerciale mettent en évidence que le STATUT et l'ENDURANCE permettent de révéler des déterminismes génétiques potentiellement différents. En effet, nous détectons 9 QTL associés spécifiquement au STATUT et 5 QTL associés spécifiquement à l'ENDURANCE (Figure 38). La RESISTANCE, analysée à l'aide d'une analyse de survie permet de combiner les deux informations. Il n'est donc pas surprenant que la majorité des QTL associés à la RESISTANCE soit aussi associée au STATUT et/ou à l'ENDURANCE. La date de mort (DDM) permet aussi de combiner les informations de STATUT et d'ENDURANCE mais ne prend pas correctement en compte les données censurées (date de mort inconnue des vivants).

L'intérêt de l'analyse de survie est aussi d'augmenter la puissance de détection des QTL en prenant en compte les informations de survie (STATUT) et d'endurance. On détecte ainsi 4 QTL associés à la RESISTANCE uniquement, dont les effets sont certainement trop faibles pour être détectés par le STATUT ou l'ENDURANCE séparément.

L'image générale qui se dégage de nos résultats suggère que la survie (STATUT) et l'endurance ne sont qu'en partie seulement contrôlés par des déterminismes génétiques communs (Figure 38) et qu'il existe des déterminismes génétiques propres à chaque caractère. Le fait de survivre à l'infection d'une part, ou

d'y résister plus ou moins longtemps (mais en y succombant finalement) dépendraient donc de mécanismes en partie différents.

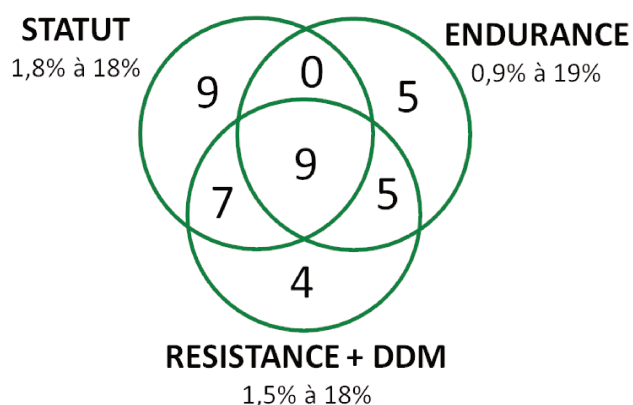


Figure 38. Résumé de l'ensemble des 39 QTL associés aux composantes de la résistance et détectés dans cette étude

Les QTL ont été détectés dans les 3 croisements expérimentaux ou dans la population commerciale DDM : mesurée comme la date de mort pour les morts et la date de fin d'infection +1 pour les vivants. Utilisée dans l'EXP2 et dans l'EXP4 uniquement

Les % correspondent à la variance phénotypique expliquée par les QTL dans les 3 croisements expérimentaux

Ces trois caractères, STATUT, ENDURANCE et RESISTANCE/DDM, offrent donc, ensemble, une description intéressante de la résistance à l'infection. En pratique, le STATUT reste néanmoins le caractère d'intérêt.

La résilience, une composante de la réponse à l'infection différente de la résistance

En ignorant les 6 QTL trouvés dans la population commerciale, on détecte en tout 44 QTL associés aux principales composantes de la réponse : STATUT, ENDURANCE, RESISTANCE et RESILIENCE (Tableau 12.a et 12.b) quand on considère l'ensemble des 4 expériences réalisées sur les croisements expérimentaux.

Tableau 12. EXP1, EXP2, EXP3a et EXP3b : Tableau récapitulatif du nombre de QTL associé à une, deux ou trois composantes de la réponse à l'infection

a	STATUT	ENDURANCE	RESISTANCE	RESILIENCE
STATUT	6			
ENDURANCE	0	6		
RESISTANCE	7	3	6	
RESILIENCE	3	0	1	6
b				
STATUT + RESISTANCE + ENDURANCE	5			
STATUT + RESISTANCE + RESILIENCE	1			
STATUT + ENDURANCE + RESILIENCE	0			

Tableau a.

Les chiffres sur la diagonale correspondent aux nombres de QTL associés uniquement à un caractère

Les chiffres sous la diagonale correspondent aux nombres de QTL associés à deux caractères

Tableau b.

Les chiffres correspondent aux nombres de QTL associés à trois caractères

Nous avons détecté uniquement 5 QTL associés à la fois à la RESILIENCE, au STATUT et/ou à la RESISTANCE. Chacun des 3 QTL communs entre STATUT et RESILIENCE a été identifié dans des familles différentes. De ce fait, il est possible qu'il s'agisse simplement de QTL proches mais différents, et que les déterminismes génétiques du STATUT et de la RESILIENCE soient donc distincts.

Nous mettons donc en évidence que, dans nos dispositifs, la RESILIENCE est contrôlée principalement par des déterminismes génétiques différents de ceux qui contrôlent les caractères de résistance. Ce résultat est conforté par d'autres études qui détectent des corrélations génétiques négatives entre résistance et tolérance (Yáñez et al., 2010) ou qui stipulent l'existence d'un compromis entre ces deux caractères (Fineblum et Rausher, 1995 ; Råberg et al., 2007).

La résilience est un caractère composite qui cumule les informations de résistance et de tolérance et il est difficile, sans connaissance précise de la charge bactérienne, de séparer correctement au niveau individuel ces deux composantes (Doeschl-Wilson et al., 2012b). Cependant, avec les lignées isogéniques, nous disposons d'un outil particulièrement utile pour mesurer la tolérance. En effet, tous les individus d'une même lignée isogénique correspondant à un "même individu génétique" et la performance moyenne de la lignée représente la performance moyenne d'un génotype. De ce fait, on peut tout à fait mettre au point des protocoles infectieux avec *F. psychrophilum* permettant de mesurer de façon répétée les performances d'un unique "individu génétique" après une infection pour différentes charges bactériennes (à condition d'être capable de mesurer cette charge). Comme nous avons plusieurs lignées isogéniques à disposition à l'INRA, nous pourrions comparer la tolérance de ces lignées et avoir ainsi plus d'informations sur la variabilité génétique de ce caractère, encore peu étudié.

4.2.2. La résistance à *F. psychrophilum*, un caractère polygénique dont le déterminisme est complexe

La résistance, un caractère expliqué par un grand nombre de QTL

Dans cette étude, nous avons détecté au total 39 QTL associés au STATUT, à l'ENDURANCE et/ou à la RESISTANCE dans les croisements expérimentaux et la population commerciale. Certains de ces QTL sont très significatifs et ont un effet important dans nos dispositifs expérimentaux où ils expliquent jusqu'à 18% de la variance phénotypique de la résistance (Omy3.2, EXP3a) et 19% de la variance phénotypique de l'endurance (Omy25a, EXP1). Dans la population commerciale, les 5 QTL détectés n'expliquent, en cumulé, que 7,6% de la variance génétique de la date de mort (au maximum 2,8% de la variance expliquée par le QTL sur Omy 17 associé au STATUT).

De nombreux QTL associés à la résistance (STATUT ou DDM) ont été mis en évidence à partir de populations nord-américaines (Campbell et al., 2014 ; Johnson et al., 2008 ; Liu et al., 2015 ; Palti et al., 2015b ; Vallejo et al., 2014, 2017b ; Wiens et al., 2013). Au total, une cinquantaine de QTL associés à la résistance à *F. psychrophilum* sont ainsi recensés chez la TAC. Ces QTL expliquent entre 1% et 72% de la variance phénotypique dans les populations respectives où ils ont été détectés (Figure 39).

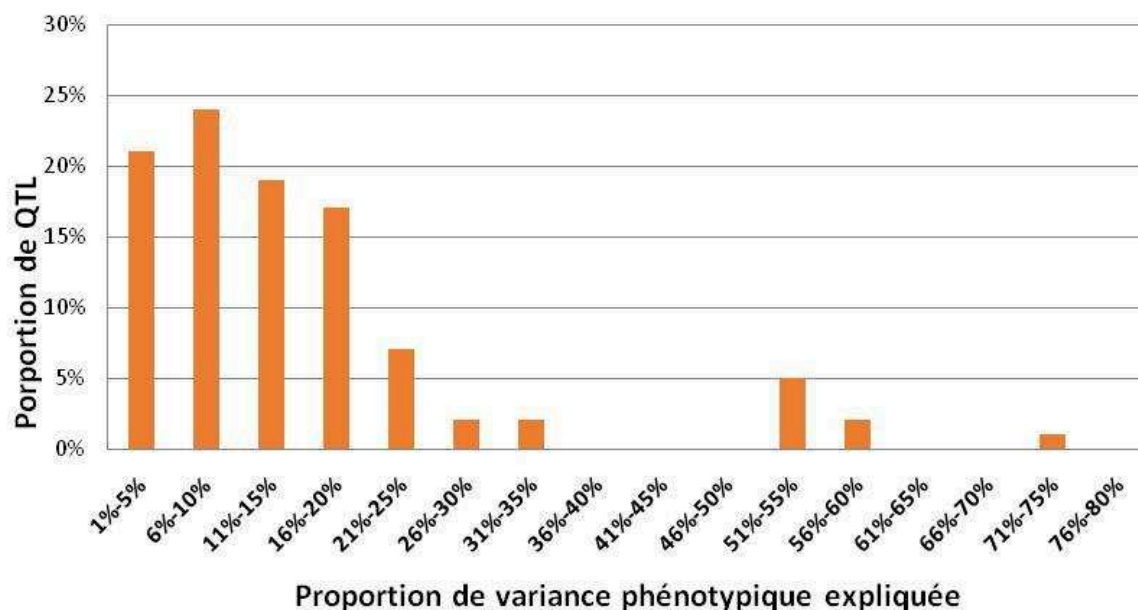


Figure 39. Distribution des QTL en fonction de leur effet sur les caractères de résistance (STATUT, ENDURANCE, DDM et RESISTANCE)

Synthèse des données issues de cette étude et de Liu et al., 2015 ; Palti et al., 2015b ; Vallejo et al., 2014, 2017b ; Wiens et al., 2013.

Les QTL expliquant les plus fortes proportions de variance phénotypique sont situés sur les chromosomes Omy8 et Omy25 et ont tous été identifiés dans une même population issue du NCCCWA (Liu et al., 2015 ; Palti et al., 2015b ; Vallejo et al., 2014).

La plus importante proportion de variance phénotypique expliquée (58% et 72%) a été estimée pour le QTL sur Omy8 dans deux familles dont les parents ont été choisis parce qu'ils ségrégent pour ce QTL, l'effet du QTL est probablement surestimé par la structure de la population ou le génotypage sélectif réalisé (Liu et al., 2015 ; Palti et al., 2015b). Plus récemment, une GWAS réalisée dans une autre population nord-américaine (TLUM, Troutlodge, Inc) estime que ce QTL jusque 19,3% de la variance génétique mais il n'est pas retrouvé dans la population du NCCCWA (Vallejo et al., 2017b). Dans nos dispositifs, nous détectons aussi ce QTL sur Omy8 dans les EXP1 et 2 cependant il n'explique que 5% de la variance phénotypique de la résilience dans l'EXP1 et il n'est mis en évidence dans l'EXP2 que lorsque l'on corrige les données de

l'effet d'un QTL plus important. On ne retrouve donc pas l'équivalent de ce QTL à effet très fort dans nos croisements expérimentaux ni dans notre lignée commerciale qui pourrait être spécifique de la population (TLUM) et que l'on ne détecte pas dans nos populations françaises (potentiellement à cause une MAF plus faible pour les allèles de ce QTL).

Le QTL détecté sur le chromosome 25, qui correspond à notre QTL sur Omy25a, explique 6,6% de la variance génétique de la résistance à *Fp* dans la population du NCCCWA et jusque 35,4% de la variance génétique du STATUT dans la population TLUM (Vallejo et al., 2017b). Dans notre dispositif, ce QTL est détecté dans trois des 4 croisements expérimentaux où il explique environ 5% de la variance phénotypique du STATUT et/ou de la RESISTANCE et jusque 19% de la variance pour l'ENDURANCE. Il serait particulièrement intéressant de réaliser une étude fonctionnelle des gènes positionnés dans ce QTL et qui pourraient coder pour des mécanismes immunitaires "universels" de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum*.

Les premières simulations de Vallejo et al. (2010) estimaient que la résistance à l'infection par *F. psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel était un caractère oligogénique. Si les études dans les populations nord-américaines ont confirmé ces résultats, nos données suggèrent plutôt un déterminisme polygénique du caractère dans les populations françaises contrôlé par un grand nombre de QTL à effets faibles à modérés.

La résistance, un caractère complexe mettant en jeu un certain nombre de QTL épistatiques

Alors que plusieurs études mettent en évidence l'importance des relations d'épistasie dans l'expression des caractères complexes (Carlborg et Haley, 2004 ; Flint and Mott, 2001), ces interactions ne sont généralement pas prises en compte dans les travaux de cartographie de QTL. La prise en compte des interactions permet d'augmenter la puissance des dispositifs et donc de détecter plus de QTL (Carlborg et al., 2005 ; Carlborg et Haley, 2004 ; Phillips, 2008) et d'obtenir une image plus complète des mécanismes qui sous-tendent le caractère d'intérêt. L'augmentation de puissance liée à la prise en compte des interactions est particulièrement bénéfique dans l'EXP3a où l'on détecte 5 QTL supplémentaires sur les 12 détectés au total.

Nos croisements expérimentaux (grands-parents HD et descendants HD) se prêtaient particulièrement bien à de telles analyses et notre étude est la première à détecter des interactions entre QTL gouvernant la réponse à une infection bactérienne chez la TAC. Au total, dans les EPX2 et 3a, 14 paires de QTL épistatiques ont été détectées.

Nous avons ainsi mis en évidence des interactions de type "amplificatrice", quand un QTL porteur de l'allèle de résistance va avoir pour effet d'augmenter l'effet du QTL avec lequel il est en interaction, et des interactions de type "compensatrice", quand un QTL n'aura un effet que si l'autre QTL est porteur de l'allèle de sensibilité. Nous avons aussi mis en évidence quelques cas d'inversion des effets alléliques à l'un des QTL en fonction de l'allèle à l'autre QTL. De tels cas ont également été rapportés dans la littérature (Fijneman et al., 1996 ; van Wezel et al., 1996).

Ces interactions révèlent une architecture sous-jacente complexe, en cohérence avec ce que l'on connaît des mécanismes immunitaires potentiellement impliqués dans la résistance. Les données disponibles aujourd'hui ne permettent pas de proposer de manière fiable des gènes candidats pour les différents QTL que nous avons identifiés. Néanmoins, la connaissance de ces interactions pourrait à l'avenir faciliter l'interprétation de futures études fonctionnelles et faciliter la construction de modèles de réseaux de gènes. A titre d'exemple, le système du complément est particulièrement complexe et deux des gènes codant pour les protéines C3 et C3-3 ont été identifiés sur des QTL épistatiques (sur Omy2 et Omy17). Les QTL avec lesquels Omy2 et Omy17 sont en interactions ne correspondent pas aux eQTL associés à l'expression des gènes *c3* et *c3-3* et mis en évidence dans l'EXP3b. Cependant la détection de ces eQTL n'a été réalisée qu'après une injection alors que toutes les interactions entre Omy2 et un autre QTL ne sont détectées qu'après l'immersion.

4.2.3. L'effet du protocole infectieux sur les déterminismes génétiques de la résistance

L'effet de la voie d'infection : comparaison de l'injection, de la balnéation et l'infection naturelle

Notre étude est la première à exploiter d'autres voies d'infection que l'injection expérimentale pour détecter des QTL de résistance à l'infection par *F. psychrophilum* chez la truite. Nos résultats apportent ainsi des éléments nouveaux sur les mécanismes de défense potentiellement mis en jeu par l'hôte et les sources de résistances potentiellement exploitables par la sélection.

Intra-expérience, les QTL que nous détectons sont plutôt spécifiques d'un mode d'infection (Figure 40.a). Les QTL communs entre les deux méthodes d'infection sont, souvent, les QTL les plus significatifs et/ou qui expliquent la plus grande part de variance phénotypique (Annexe 3). La figure 40.b indique l'ensemble des QTL détectés après les 5 expériences selon le protocole infectieux.

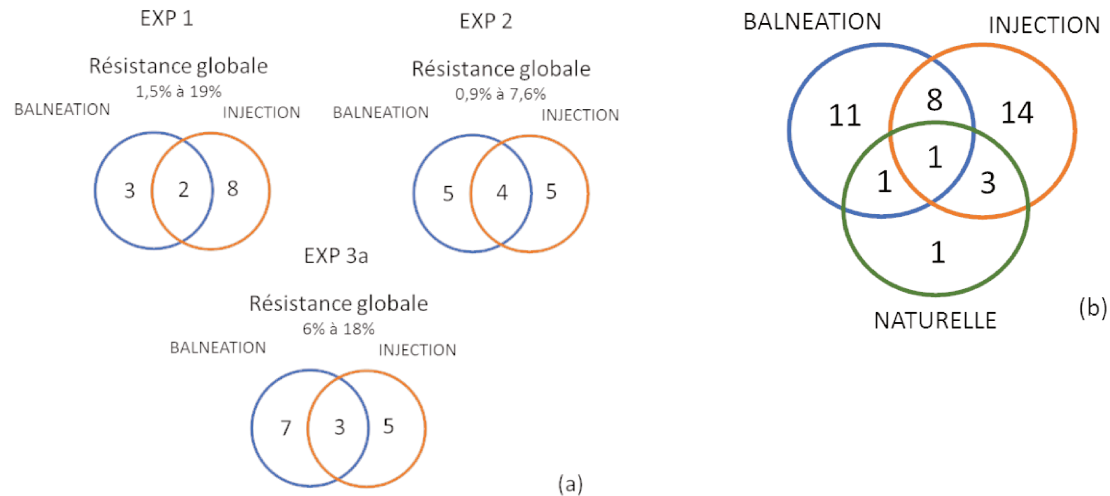


Figure 40. Diagrammes de Venn présentant les résultats de détection de QTL associés aux différents caractères de résistance globale après une infection par injection, balnéation ou une infection naturelle avec *F. psychrophilum*

(a) QTL détectés intra-expérience, dans les EXP1, 2 et 3a. Les % représentent les proportions de variance phénotypiques expliquées par les QTL.

(b) Tous les QTL détectés dans les EXP1, 2, 3a, 3b et 4

Nos résultats mettent en évidence une majorité de QTL spécifiques aux modes d'infection, suggérant fortement que la résistance à une infection par injection et la résistance à une infection par balnéation sont deux caractères contrôlés par des déterminismes génétiques en partie spécifiques. La balnéation stimule certainement des mécanismes immunitaires liés aux défenses externes ou encore à la réponse précoce sur le lieu de l'infection qui ne sont pas ou peu stimulés par l'injection.

Sur les 13 QTL détectés uniquement après la balnéation ou l'infection naturelle, 2 QTL sont localisés sur des chromosomes n'ayant jamais été rapportés dans la littérature comme porteurs de QTL de résistance à *F. psychrophilum*. Huit autres QTL sont positionnés sur des chromosomes porteurs d'un ou plusieurs QTL de résistance déjà répertoriés mais à une distance suffisante pour supposer qu'ils sont différents. Enfin les 3 autres QTL ont été associés à la résistance par injection dans d'autres études.

On peut aussi supposer qu'une partie des déterminismes génétiques mis en évidence après l'une ou l'autre des méthodes d'infection stimule des mécanismes immunitaires différents selon l'intensité de l'infection. Même s'il est difficile de mesurer et comparer objectivement l'intensité de l'infection avec *F. psychrophilum* en fonction du protocole infectieux, on peut supposer que l'intensité d'une infection par balnéation est moins importante que celle d'une infection par injection. On observe par exemple toujours des mortalités bien supérieures par injection. Cette différence de mortalité peut être liée au fait que, par balnéation, la charge bactérienne initiale qui infecte l'individu est réduite par rapport à une infection par

injection, mais aussi au fait que, par injection, une partie des signaux permettant d'initier une réponse immunitaire ne sont pas stimulés, perturbant ainsi la réponse de l'hôte.

Les conclusions apportées par nos résultats QTL, à savoir l'existence de facteurs de défense externes ou activés très précocement après l'entrée de la bactérie dans l'hôte par la voie naturelle sont confortées par une étude conduite au laboratoire avec des familles de truites arc-en-ciel standard. Dans cette étude, 440 familles de plein-germains ont été infectées avec la même souche bactérienne FRGDSA 1882/11, et par les deux protocoles d'infection que nous avons mis en œuvre (baignation ou injection intrapéritonéale). La corrélation génétique entre les deux méthodes d'infection est modérée ($0,73 \pm 0,10$), ce qui confirme l'existence de facteurs de résistance en partie dépendants du mode d'infection.

A l'avenir il pourrait être particulièrement intéressant d'étudier les effecteurs de la réponse spécifique d'une infection par immersion au niveau de la peau, du mucus et du microbiote du mucus qui pourraient être impliqués dans la résistance par baignation. Maintenant que les protocoles infectieux par baignation sont bien maîtrisés, il serait intéressant de compléter les études fonctionnelles par des analyses réalisées sur des individus infectés par baignation

L'effet de la souche bactérienne

Plusieurs études mettent évidence une certaine diversité génétique de *F. psychrophilum* avec plusieurs complexes-clonaux (CC-ST) et sérotypes différents qui peuvent être associés à des virulences différentes (Duchaud et al., 2018 ; Nicolas et al., 2008 ; Rochat et al., 2017). Différentes souches appartenant à des CC-ST et des sérotypes différents peuvent ainsi cohabiter dans une même pisciculture (Siekoula-Nguedia et al., 2012), voire co-infecter les poissons (Bernardet, communication personnelle).

Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant de regarder les interactions génotype de l'hôte-génotype de l'agent pathogène pour déterminer dans quelle mesure différentes souches mobilisent différents mécanismes immunitaires.

Dans les EXP3a et 3b, nous détectons 6 QTL associés à la résistance après une infection avec la souche JIP02/86 (CC-ST20, sérotype 1) dont 4 communs aux QTL de résistance détectés avec la souche FRGDSA 1882/11 (CC-ST90, sérotype 2). Une partie des déterminismes génétiques associés à la résistance sont donc communs quelle que soit la souche bactérienne utilisée. Ces résultats sont parfaitement cohérents avec ceux obtenus dans le cadre du projet RE-SIST dans lequel Crusot et al. (2016) ont estimé une corrélation génétique très élevée ($0,94 \pm 0,14$) entre la résistance par injection avec la souche FRGDSA 1882/11 et une autre souche FRGDSA 74382/3. Ces corrélations élevées restent néanmoins à confirmer dans le cas d'une infection par baignation, mais actuellement seule la souche FRGDSA 1882/11 est disponible pour les infections par baignation.

4.2.4. Un noyau de QTL associés à la résistance, quel que soit le caractère et le protocole infectieux

Dans cette étude, nous mettons en évidence que certains des QTL détectés sont associés spécifiquement à une composante de la réponse et/ou à un fond génétique donné et/ou à une méthode d'infection donnée.

Toutefois, nous détectons 5 QTL associés à plusieurs caractères de résistance dans au moins trois de nos fonds génétiques et détectés par les deux méthodes d'infection (Figure 41). Ces 5 QTL ont aussi été détectés dans différentes publications réalisées sur les populations du NCCCWA ou d'autres populations américaines (Liu et al., 2015 ; Palti et al., 2015b ; Vallejo et al., 2014, 2017b).

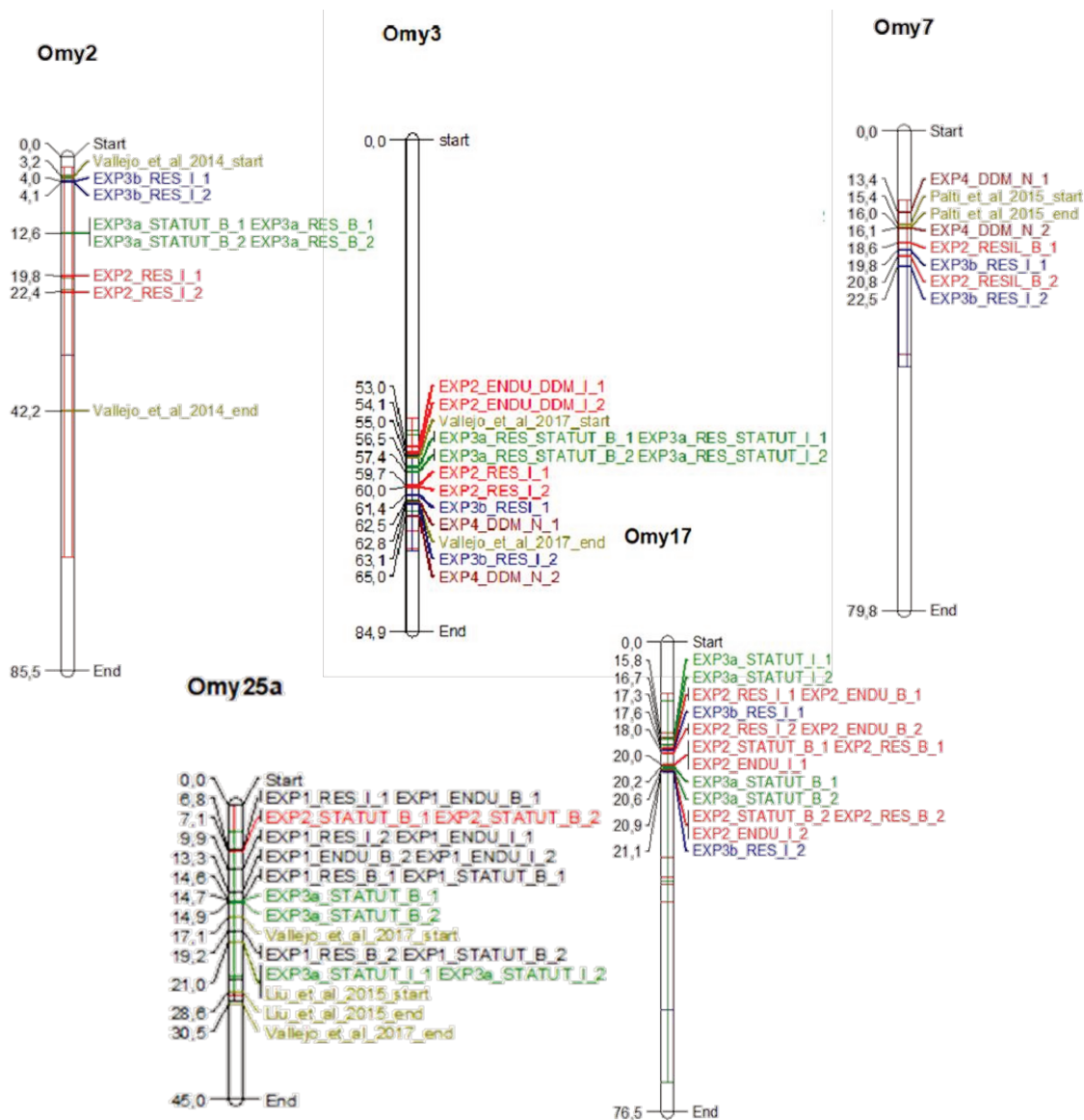


Figure 41. Les QTL sur les chromosomes Omy2, 3, 17 et 25a sont très conservés dans plusieurs de nos croisements expérimentaux ainsi que dans la lignée commerciale

Les couleurs correspondent aux différentes expériences : EXP1 en noir, EXP2 en rouge, Exp3a en vert, EXP3b en bleu et EXP4 en marron. Les QTL identifiés en kaki proviennent de la littérature (Liu et al., 2015; Palti et al., 2015b; Vallejo et al., 2017b, 2014)

Les QTL détectés dans nos études sont positionnés sur les chromosomes en fonction de leurs marqueurs flanquants 1 et 2 après alignement sur le génome. Ils sont identifiés avec un préfixe correspondant à l'expérience, puis selon les caractères auxquels ils sont associés : RES = RESISTANCE, ENDU = ENDURANCE, RESIL = RESILIENCE. Le suffixe « _I » fait référence aux QTL détectés après l'injection, le suffixe « _B » aux QTL détectés après la balnéation.

Les QTL détectés dans la littérature sont positionnés en fonction de leurs marqueurs flanquant ou des positions des premiers et derniers SNP significatifs dans (Vallejo et al., 2017) avec les suffixes « _start » et « _end »

Ces QTL représentent donc certainement un noyau de gènes impliqués dans la résistance globale des TAC à l'infection par *F. psychrophilum*. Ils contrôlent probablement des mécanismes immunitaires très partagés entre différentes populations et qui sont stimulés par différentes méthodes d'infection et différentes souches bactériennes. Quelques gènes candidats fonctionnels identifiés précédemment (Langevin et al., 2012) ont été positionné dans ces QTL, comme des gènes codant pour des récepteurs cellulaires permettant la reconnaissance des agents pathogènes ou des protéines dont le rôle est d'attaquer la bactérie (CD209, métalloprotéase), des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (cytokines, interférons) (Voir Annexe 4 pour Supplementary File 6 du § 3.1.1.1).

De nouvelles approches positionnelles sont envisageables pour réduire la liste de gènes candidat, par exemple à l'aide de croisements avancés (backcross) entre lignées isogéniques permettant de raffiner la position de ces QTL. En outre, les lignées isogéniques sont actuellement en cours de reséquençage, la comparaison des variants (SNP mais aussi variants structuraux) entre plusieurs lignées pourrait permettre d'identifier d'éventuels polymorphismes causaux. Enfin, des approches complémentaires sont aussi envisageables, comme de réaliser un transcriptome complet par RNAseq sur un petit nombre d'individus pour valider les gènes candidats identifiés.

4.3. Conclusions générales et perspectives : l'amélioration génétique de la résistance à *Flavobacterium psychrophilum*

4.3.1. Quels caractères faut-il améliorer ?

L'intérêt de l'amélioration génétique de la résistance aux maladies des cheptels terrestres et aquatiques a été rapidement compris et a engendré un important effort de recherche cette dernière décennie, toutes espèces confondues (Doeschl-Wilson et Kyriazakis, 2012 ; Gjedrem et Gjedrem, 2015 ; Guy et al., 2012 ; Robinson et al., 2017 ; Yáñez et al., 2014a).

Ainsi, on cherche à améliorer la résistance pour, d'une part limiter les pertes économiques importantes liées aux différentes pathologies et d'autre part, limiter les traitements qui représentent un coût non négligeable pour les éleveurs et ont un impact important sur l'environnement et la santé humaine. La sélection devrait permettre de réduire la fréquence et la gravité des épisodes infectieux.

Cependant, sélectionner les individus pour améliorer la résistance a potentiellement un impact important sur la population d'agents pathogènes. En effet, du fait des interactions hôtes-pathogènes, sélectionner pour des hôtes résistants a pour conséquence une co-sélection pour la virulence des agents pathogènes (Carr et al., 2006 ; Woolhouse et al., 2002). En conséquence, la résistance obtenue par la sélection peut être "éphémère" et contournée par l'évolution des agents pathogènes. L'effort de sélection à produire pour améliorer la résistance sera de nouveau important. Même si jusqu'à présent, aucun cas de contournement de la résistance acquise dans le cadre de programmes de sélection en pisciculture n'a été mis en évidence (Quillet et Dorson, 2018), ce risque est réel et plusieurs cas de résistance médicamenteuse ont été mis en évidence, comme l'antibiorésistance, ou encore dans le cas d'approches vaccinales comme c'est le cas pour *Streptococcus iniae* dans des populations de poissons (Eynogor et al., 2008).

Pour tenter de limiter ces risques, il est important de s'assurer que la sélection porte sur un nombre suffisant de déterminants génétiques car la sélection d'un nombre limité de mécanismes de défense serait

plus facilement contournée par un agent pathogène muté. D'où l'intérêt d'introduire la tolérance conjointement à la résistance dans les objectifs de sélection pour garantir la durabilité de la résistance. D'une part, l'amélioration de la tolérance n'a pas d'impact négatif sur la population d'agents pathogènes (Carr et al., 2006 ; Woolhouse et al., 2002). D'autre part, si on améliore aussi la tolérance, l'impact d'une infection avec un agent pathogène plus virulent sera limité, puisque les animaux pourront continuer à exprimer de bonnes performances, infectés ou non.

Pour l'amélioration génétique de la tolérance, d'autres études sont nécessaires pour, d'une part estimer la variabilité génétique et l'héritabilité de ce caractère et donc la faisabilité de la sélection. D'autre part, actuellement l'absence de méthode de mesure précise et individuelle de la tolérance est le frein principal à l'introduction de ce caractère dans les objectifs de sélection. Il est cependant assez facilement envisageable de mesurer la résilience comme la croissance pendant un épisode infectieux ou de prendre en compte des mesures moyennes réalisées sur des groupes.

En pratique, pour améliorer la résistance, il semble intéressant de mesurer au moins deux caractères : la survie finale (le statut) et l'endurance (durée de vie après l'infection). En effet, ces deux caractères sont en partie contrôlés par des gènes distincts, mais apportent des informations complémentaires sur la résistance, que l'on n'arrive pas forcément à identifier en prenant en compte les caractères séparément mais qui sont détectés avec la RESISTANCE (qui permet de cumuler les informations). De plus certains QTL associés à l'endurance avec une souche bactérienne virulente mais n'ayant pas d'effet sur le statut pourraient être associés au statut pour des individus infectés avec une souche moins virulente. Si l'on sélectionne avec une souche très virulente il est donc aussi intéressant de prendre en compte les QTL associés à l'endurance. En pratique, ces deux données sont déjà récoltées lors d'infections expérimentales, ce qui ne nécessite donc pas de travail supplémentaire.

Nous avons aussi mis en évidence dans nos analyses qu'au sein d'un lot, le poids au moment de l'infection n'a pas d'influence sur la survie. Il semble donc possible de se passer de cette mesure lors d'infections expérimentales si l'on souhaite améliorer uniquement la résistance (et non pas la résilience ou la tolérance) sans perdre en précision sur la mesure phénotypique, ce qui est un avantage considérable pour la mise en œuvre pratique des infections expérimentales.

Enfin plusieurs études mettent en évidence que les corrélations génétiques entre la résistance à *F. psychrophilum* et la résistance à d'autres maladies sont faibles mais positives (Robinson et al., 2017) ce qui veut dire que l'amélioration de la résistance à *F. psychrophilum* est possible sans détériorer la résistance à d'autres maladies. Ainsi la sélection sur une seule maladie améliorerait l'état de santé général. D'un point de vue économique, il est alors intéressant de se focaliser sur la sélection directe pour les maladies les plus problématiques ainsi que celles dont la résistance est la plus héritable. D'autres études réalisées au sein

du SYSAAF mettent en évidence que les corrélations génétiques entre résistance à la flavobactériose et rendement de carcasse, bien que négatives sont faibles (SYSAAF, 2017). En conséquence, l'amélioration génétique de la résistance ne détériorerait pas les performances de croissance et de rendement. Il est donc envisageable d'utiliser des index de sélection combinés pour améliorer simultanément ces caractères.

4.3.2. Avec quelle méthode d'infection ?

Une fois le choix des caractères arrêté, se pose le choix de la méthode d'infection. Dans le cas de la flavobactériose, on peut envisager de sélectionner en utilisant l'injection, la balnéation ou en tirant profit d'épisodes de mortalité naturelle.

D'un point de vue pratique, l'injection reste la méthode la plus simple à mettre en œuvre et celle qui permet de mieux maîtriser la dose infectieuse. Elle permet aussi d'obtenir des mortalités intermédiaires (30% - 70%), ce qui est primordial pour améliorer la précision des analyses génétiques des caractères de survie (Robinson et al., 2017 ; Vandeputte et al., 2009b). Cependant, une trop forte dose injectée et la mortalité devient trop importante pour être réellement exploitable (EXP2). Dans ce cas, il est envisageable de choisir une souche de *F. psychrophilum* à la virulence modérée qui permet d'obtenir des mortalités intermédiaires par injection, ce qui nécessite de pouvoir tester et conserver plusieurs souches. Comme les corrélations génétiques des résistances obtenues entre souches sont bonnes, on peut se contenter d'utiliser une souche de référence, dont la production et la conservation sont bien maîtrisées, ce qui permet de bien calibrer les infections expérimentales et donc d'optimiser l'efficacité de la sélection. Il s'agit toutefois de vérifier de temps à autre que les populations sont bien résistantes avec une souche différente.

La balnéation et la mortalité naturelle sont potentiellement intéressantes car elles permettent d'exploiter toute la diversité des mécanismes de défense mis en action par les poissons et donc d'exploiter l'ensemble de la variabilité sous-jacente. Il serait donc judicieux d'utiliser l'un de ces deux types d'infections pour sélectionner pour la résistance, à condition de confirmer la bonne corrélation des résistances entre différentes souches de bactéries, testée uniquement par injection pour le moment.

Le choix entre infection naturelle ou infection expérimentale se pose encore. Les infections expérimentales permettant de maîtriser plus facilement les paramètres extérieurs, et de réaliser un phénotypage fin, elles semblent plus intéressantes à mettre en œuvre que les infections naturelles. D'autre part, la gestion d'un épisode de mortalité naturelle est laborieuse puisqu'on ne maîtrise ni la date de début, ni la sévérité de l'infection et qu'enfin il est parfois difficile de diagnostiquer précisément la maladie et d'être certain que la mortalité est due à un agent pathogène donné et non pas à plusieurs agents différents. Il existe enfin le risque que la maladie ne se déclenche pas, et que la sélection soit

impossible. Si l'on décide d'utiliser une infection expérimentale, réalisée dans des conditions sanitaires et environnementales contrôlées, pour sélectionner les individus, il est possible que le progrès observé en pisciculture soit différent du progrès attendu. En effet, les facteurs externes (température, présence d'autres agents pathogènes, etc. ...) dans les piscicultures sont moins contrôlés et peuvent influencer la survie finale des individus (Yáñez et al., 2014a a). Cependant, une étude récente réalisée par (Wiens et al., 2018) montre que trois générations de sélection pour la résistance à *Fp* en utilisant une infection par injection (lignée ARS-Fp-R) permet d'obtenir une meilleure survie qu'en l'absence de sélection (ARS-Fp-C et lignée commerciale). Sélectionner pour la résistance à *Fp* à l'aide de méthodes d'infection expérimentales permettraient donc d'améliorer efficacement la résistance des cheptels à des infections naturelles.

Le choix entre infection naturelle et expérimentale dépendra aussi certainement du coût et de la disponibilité de la méthode d'infection, puisque les infections expérimentales doivent être réalisées dans des structures dédiées. Ce choix repose aujourd'hui aussi sur la disponibilité et la facilité de mise en œuvre des protocoles infectieux. S'il est trop laborieux de réaliser des infections par balnéation (qui demandent une plus grande maîtrise de la culture de la bactérie car il faut la produire en plus grande nombre) l'infection par injection reste une très bonne alternative. En effet, les QTL les plus importants que nous avons détectés sont communs entre l'injection, la balnéation, et l'infection naturelle.

4.3.3. Avec quelle méthode de sélection?

En dernier lieu, il faut choisir la méthode de sélection. Pour un caractère létal comme la résistance à une maladie, les deux méthodes de sélection les plus intéressantes et les plus prometteuses sont la sélection assistée par marqueur (SAM) et la sélection génomique (SG) qui permettent toutes les deux de tirer profit de la variabilité génétique intra-famille, contrairement à la sélection généalogique.

Au début de cette thèse, la SAM semblait particulièrement intéressante dans le cas de l'amélioration génétique de la résistance à la flavobactériose. En effet, les quelques études publiées laissaient imaginer une architecture oligogénique de la résistance avec quelques QTL majeurs et plusieurs QTL à effets plus faibles (Leeds et al., 2010 ; Vallejo et al., 2010). Cependant, les résultats obtenus dans cette thèse mettent en évidence que, dans les populations françaises, la résistance à la flavobactériose est plutôt polygénique et complexe avec de nombreuses interactions entre les QTL qu'il faudrait réussir à prendre en compte dans une SAM efficace. La SG est aujourd'hui plus intéressante à mettre en œuvre pour les caractères complexes (Legarra et Fernando, 2009). Pour le moment, la SG se concentre uniquement sur des modèles d'évaluation basée sur l'additivité des effets des gènes, mais le développement de nouvelles méthodes de prédiction génomique permettant de prendre en compte les effets d'épistasie sont en cours (travaux de

A. Legarra et collaborateurs), ce qui pourrait être particulièrement utile pour les caractères complexes comme la résistance aux maladies.

De plus, les évolutions technologiques ayant dépassé nos attentes, le prix de la puce de génotypage 57K a fortement diminué et il est aujourd'hui plus intéressant économiquement de l'utiliser que de produire des puces spécifiques pour la SAM dont l'efficacité serait limitée par le manque de précision de la localisation des QTL (SYSAAF, communication personnelle). La faisabilité de la SG pour l'amélioration de la résistance à *F. psychrophilum* ayant été mise en évidence (Vallejo et al., 2017a), la filière française est en train de fournir un effort important pour réaliser le même type d'études prospectives en lien avec les équipes de recherche et le SYSAAF et commencer rapidement à sélectionner pour la résistance à la flavobactériose.

Références

- Acolas, M.L., Roussel, J.M., Lebel, J.M., Baglinière, J.L., 2007. Laboratory experiment on survival, growth and tag retention following PIT injection into the body cavity of juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Fisheries Research* 86, 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.05.011>
- Agreste, 2007. Recensement de la salmoniculture 1997-2007.
- Aguilar, I., Misztal, I., Johnson, D.L., Legarra, A., Tsuruta, S., Lawlor, T.J., 2010. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score1. *Journal of Dairy Science* 93, 743–752. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2730>
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., 1987. Breeding for worm resistance: A perspective. *International Journal for Parasitology* 17, 559–566. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90132-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90132-9)
- Amita, K., Hoshino, M., Honma, T., Wakabayashi, H., 2000. An Investigation on the Distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa River. *Fish Pathol.* 35, 193–197. <https://doi.org/10.3147/jsfp.35.193>
- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G., Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* 17, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- Anses, 2014. Evaluation des risques d'émergence d'antibiorésistance liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale (Avis No. Saisine n° 2011-SA-0071). Maisons-Alfort, France.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197, 205–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50013-8>
- Baerwald, M.R., Petersen, J.L., Hedrick, R.P., Schisler, G.J., May, B., 2011. A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity (Edinb)* 106, 920–926. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.137>
- Bailey, G.S., Williams, D.E., Hendricks, J.D., 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environ Health Perspect* 104, 5–21.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLOS ONE* 3, e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Ballard, W.W., 1973. Normal embryonic stages for salmonid fishes, based on *Salmo gairdneri* Richardson and *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Journal of Experimental Zoology* 184, 7–25. <https://doi.org/10.1002/jez.1401840103>
- Becker, W.A., 1967. Manual of procedures in quantitative genetics, 2d ed. ed. Program in Genetics, Washington State University, Pullman.
- Benfey, T.J., Solar, I.I., Jong, G.D., Donaldson, E.M., 1986. Flow-Cytometric Confirmation of Aneuploidy in Sperm from Triploid Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 838–840. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<838:FCOAS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<838:FCOAS>2.0.CO;2)
- Berg, P., Henryon, M., 1998. A comparison of mating designs for inference on genetic parameters in fish - Research - Aarhus University. Presented at the World Congress on Genetic Applied to Livestock Production, Armidale, Australia, p. 115.
- Bernardet, J.F., 1997. Immunization with bacterial antigens: *Flavobacterium* and *Flexibacter* infections. *Dev. Biol. Stand.* 90, 179–188.
- Bernardet, J.F., Baudin-Laurencin, F., Tixerant, G., 1988. First identification of *Cytophaga psychrophila* in France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 8, 104–105.

- Bernardet, J.-F., Bowman, J.P., 2006. The Genus *Flavobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*. Springer New York, New York, NY, pp. 481–531. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_17
- Bernardet, J.F., Grimont, P.A.D., 1989. Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 346–354. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-346>
- Bernardet, J.F., Kerouault, B., 1989. Phenotypic and genomic studies of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1796–1800.
- Bernardet, J.F., Rigaudeau, D., Houel, A., Rochat, T., Duchaud, E., 2015. Inefficacité de l'iode pour la désinfection des oeufs de truite porteurs de *Flavobacterium psychrophilum* et essai de décontamination des bacs d'élevage.
- Bernardet, J.-F., Seger, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996. Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 128–148. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-128>
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Silva, C.D., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.-M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G.H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J.-N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Crollius, H.R., Guiguen, Y., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications* 5, 3657. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Bertolini, J.M., Wakabayashi, H., Watral, V.G., Whipple, M.J., Rohovec, J.S., 1994. Electrophoretic Detection of Proteases from Selected Strains of *Flexibacter psychrophilus* and Assessment of Their Variability. *Journal of Aquatic Animal Health* 6, 224–233. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1994\)006<0224:EDOPFS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1994)006<0224:EDOPFS>2.3.CO;2)
- Biacchesi, S., Le Berre, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., Brémont, M., Quillet, E., Boudinot, P., 2007. Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *Journal of Fish Diseases* 30, 631–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00854.x>
- Bijma, P., Van-Arendonk, J., Bovenhuis, H., 1997. Breeding Value and Variance Component Estimation from Data Containing Inbred Individuals: Application to Gynogenetic Families in Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Genetics* 145, 1243–1249.
- Billard, R., 1983. Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 233, 265–284.
- Billard, R., 1975. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. V. - Effets de la dilution et définition du rapport optimum gamètes/dilueur. *Bulletin Français de la Pisciculture* 121–135. <https://doi.org/10.1051/kmae:1975008>
- Bishop, S., 2012. A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00168>
- Bishop, S.C., Woolliams, J.A., 2010. On the Genetic Interpretation of Disease Data. *PLOS ONE* 5, e8940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008940>
- Bisset, S.A., Morris, C.A., Squire, D.R., Hickey, S.M., 1996. Genetics of resilience to nematode parasites in young Romney sheep—use of weight gain under challenge to assess individual anthelmintic

- treatment requirements. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 39, 313–323.
<https://doi.org/10.1080/00288233.1996.9513191>
- Bobe, J., Breton, B., Fostier, A., Guigen, Y., Jalabert, B., Kah, O., Labbé, C., Lareyre, J.-J., Le Bail, P.-Y., Le Gac, F., Leveroni Calvi, S., Mahé, S., Quillet, E., Vandeputte, M., 2010. Chapitre 2. Sexualité et reproduction, in: *La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage*. Quae, p. 39.
- Bobe, J., Jalabert, B., Fostier, A., 2008. Oogenesis: Post-vitellogenic events leading to a fertilizable oocyte, in: Maria João ROcha, Augustine Arukwe, B.G. Kapoor, *Fish Reproduction*. Science Publishers, Enfield, Etats-Unis, p. (1) 1-36.
- Bolis, C.L., Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Rankin, J.C., 2001. Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research* 44, 265–280.
<https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0845>
- Borg, A.F., 1960. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildl. Dis.* 8, 1–85.
- Borg, A.F., 1948. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. University of Washington, Seattle.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology, Reviews in Fish Immunology* 20, 239–262.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>
- Boussaha, M., Guyomard, R., Cabau, C., Esquerré, D., Quillet, E., 2012. Development and characterisation of an expressed sequence tags (EST)-derived single nucleotide polymorphisms (SNPs) resource in rainbow trout. *BMC Genomics* 13, 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-238>
- Boutin, S., Audet, C., Derome, N., 2013. Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Can. J. Microbiol.* 59, 662–670.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0443>
- Breton, B., Quillet, E., Jalabert, B., 1996. Contrôle de la reproduction et du sexe chez les poissons d'élevage. *INRA Productions Animales Hors série*, 17–26.
- Brody, T., Wohlfarth, G., Hulata, G., Moav, R., 1981. Application of electrophoretic genetic markers to fish breeding: IV. Assessment of breeding value of full-sib families. *Aquaculture* 24, 175–186.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90054-5)
- Brown, L.L., Cox, W.T., Levine, R.P., 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 213–218. <https://doi.org/10.3354/dao029213>
- Bugeon, J., Lefevre, F., Cardinal, M., Uyanik, A., Davenel, A., Haffray, P., 2010. Flesh Quality in Large Rainbow Trout with High or Low Fillet Yield. *Journal of Muscle Foods* 21, 702–721.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2010.00214.x>
- Bullock, G.L., Conroy, D.A., Snieszko, S.F., 1971. Myxobacterioses, in: *Diseases of Fish*. TFH Publications, Jersey City, pp. 60–88.
- Bureau, D.P., Azevedo, P.A., Tapia-Salazar, M., Cuzon, G., 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications. Presented at the *Avances en Nutricion Acuicola V.*, Mérida, Yucatan, México, p. 30.
- Callet, T., Dupont-Nivet, M., Cluzeaud, M., Jaffrezic, F., Laloë, D., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Mazurais, D., Skiba-Cassy, S., Médale, F., 2018. Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry. *PLOS ONE* 13, e0201462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201462>
- Callet, T., Médale, F., Larroquet, L., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., Dupont-Nivet, M., 2017. Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE* 12, e0186705.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705>

- Campbell, N.R., LaPatra, S.E., Overturf, K., Towner, R., Narum, S.R., 2014. Association Mapping of Disease Resistance Traits in Rainbow Trout Using Restriction Site Associated DNA Sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4, 2473–2481. <https://doi.org/10.1534/g3.114.014621>
- Carcamo, C.B., Diaz, N.F., Winkler, F.M., 2015. Genetic diversity in Chilean populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43, 59–70. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-6>
- Carlborg, O., Brockmann, G.A., Haley, C.S., 2005. Simultaneous mapping of epistatic QTL in DU6i x DBA/2 mice. *Mamm. Genome* 16, 481–494. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2425-4>
- Carlborg, Ö., Haley, C.S., 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Reviews Genetics* 5, 618–625. <https://doi.org/10.1038/nrg1407>
- Carr, D.E., Murphy, J.F., Eubanks, M.D., 2006. Genetic variation and covariation for resistance and tolerance to Cucumber mosaic virus in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae): a test for costs and constraints. *Heredity* 96, 29–38. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800743>
- Castillo, D., Christiansen, R.H., Dalsgaard, I., Madsen, L., Middelboe, M., 2015. Bacteriophage Resistance Mechanisms in the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: Linking Genomic Mutations to Changes in Bacterial Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1157–1167. <https://doi.org/10.1128/AEM.03699-14>
- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.-P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.-P., Quillet, E., Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fillatreau, S., Sunyer, O., Boudinot, P., 2013. Teleost Fish Mount Complex Clonal IgM and IgT Responses in Spleen upon Systemic Viral Infection. *PLOS Pathogens* 9, e1003098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003098>
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J.H., 2011. Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1, 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>
- Chapuis, H., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Vandeputte, M., Quillet, E., 2012. Modélisation de l'efficacité d'une sélection contre la mortalité avec génotypage a posteriori des candidats et collatéraux soumis à un challenge., in: Programme et Résumés. Presented at the 3èmes Journées Recherche Filière Piscicole, Paris, France, pp. 105–106.
- Chevassus, B., Devaux, A., Chourrout, D., Jalabert, B., 1988. Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J. Hered.* 79, 89–92.
- Chevassus, B., Escaffre, A.M., Herioux, F., 1976. Variabilité et héritabilité des performances de croissance chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Annales de génétique et de sélection animale* 8, 273. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-8-2-273>
- Chevassus, B., Quillet, E., Krieg, F., Hollebecq, M.-G., Mambrini, M., Fauré, A., Labbé, L., Hiseux, J.-P., Vandeputte, M., 2004. Enhanced individual selection for selecting fast growing fish: the PROSPER method, with application on brown trout (*Salmo trutta fario*). *Genetics Selection Evolution* 36, 643–661. <https://doi.org/10.1051/gse:2004022>
- Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36, 111–126. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90058-9)
- Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod Nutr Dev* 20, 727–733.
- Chourrout, D., CHEVASSUS, B., Herioux, F., 1980. Analysis of an Hertwig effect in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) after fertilization with γ -irradiated sperm. *Reproduction Nutrition Développement* 20, 719–726. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800414>
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females

- Potential of tetraploid fish. *Theoret. Appl. Genetics* 72, 193–206.
<https://doi.org/10.1007/BF00266992>
- Chourrout, D., Quillet, E., 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout: Sex and survival of progenies production of all-triploid populations. *Theoret. Appl. Genetics* 63, 201–205.
<https://doi.org/10.1007/BF00303993>
- Christiansen, R.H., Madsen, L., Dalsgaard, I., Castillo, D., Kalatzis, P.G., Middelboe, M., 2016. Effect of Bacteriophages on the Growth of *Flavobacterium psychrophilum* and Development of Phage-Resistant Strains. *Microb Ecol* 71, 845–859. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0737-5>
- Cordero, H., Brinchmann, M.F., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2015. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *PROTEOMICS* 15, 4007–4020.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500120>
- Cosson, J., 2004. The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. *Aquaculture International* 12, 69–85. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>
- Cox, D.R., 1972. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 34, 187–220.
- Crandell, P.A., Gall, G.A.E., 1993. The genetics of body weight and its effect on early maturity based on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 117, 77–93.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90125-I](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90125-I)
- Crusot, M., Quillet, E., Dechamp, N., Rigaudeau, D., Bernardet, J.F., Dupont-Nivet, M., 2016. Sélectionner pour la résistance à la flavobactériose chez la truite arc-en-ciel : effet du mode d’infection expérimentale et de la souche bactérienne, in: Communication Orale. Presented at the JRFP, Paris, France.
- Dalsgaard, I., 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 127–144. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90032-7)
- Dalsgaard, I., Madsen, L., 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases* 23, 199–209.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00242.x>
- Daremborg, C., 1843. *Le Serment; la loi de l’art du médecin Hippocrate*, Traduction de Charles Daremborg. ed. Lefèvre, Paris, France.
- Darvasi, A., Soller, M., 1997. A Simple Method to Calculate Resolving Power and Confidence Interval of QTL Map Location. *Behav Genet* 27, 125–132. <https://doi.org/10.1023/A:1025685324830>
- Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J.I., Soller, M., 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134, 943–951.
- Davies, B., Bromage, N., 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 205, 183–200. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00665-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00665-2)
- Davis, H.S., 1946. Care and diseases of trout (US Fish and Wildlife Service No. 12). US Department of the Interior, cited in Bullock et al., 1971.
- De Brouin De Bouville, R., 1930. Une réussite carpicole : Le croisement Beauvoir n° 1. *Bulletin Français de Pisciculture* 169–176. <https://doi.org/10.1051/kmae:1930032>
- de Givry, S., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D., Schiex, T., 2005. Carhta Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21, 1703–1704.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti222>
- de Verdal, H., Vandeputte, M., O’Connell, C.M., Bégout, M.L., Mekki, W., Chatain, B., Benzie, J.A., 2018. Measuring individual feed efficiency and its correlations with performances and agonistic

- behaviours in juvenile nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in groups, in: AQUA 2018. Presented at the WAS, Montpellier, France.
- Dechamp, N., Konieczka, A., Hervet, C., Ciobotaru, C., Bernardet, J.F., Rochat, T., Krieg, F., Quillet, E., 2018. Resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in isogenic lines of rainbow trout: does the infection route matter?
- Diter, A., Quillet, E., Chourrout, D., 1993. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 42, 777–786. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00383.x>
- Doeschl-Wilson, A.B., Bishop, S., Kyriazakis, I., Villanueva, B., 2012a. Novel methods for quantifying individual host response to infectious pathogens for genetic analyses. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00266>
- Doeschl-Wilson, A.B., Kyriazakis, I., 2012. Should we aim for genetic improvement in host resistance or tolerance to infectious pathogens? *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00272>
- Doeschl-Wilson, A.B., Villanueva, B., Kyriazakis, I., 2012b. The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00265>
- Dorson, M., Quillet, E., Hollebecq, M., Torhy, C., Chevassus, B., 1995. Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary Research* 26, 361–368.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.-F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessi res, P., Gibrat, J.-F., Claverol, S., Dumetz, F., H naff, M.L., Benmansour, A., 2007. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology* 25, 763–769. <https://doi.org/10.1038/nbt1313>
- Duchaud, E., Rochat, T., Habib, C., Barbier, P., Loux, V., Guérin, C., Dalsgaard, I., Madsen, L., Nilsen, H., Sundell, K., Wiklund, T., Strepparava, N., Wahli, T., Caburlotto, G., Manfrin, A., Wiens, G.D., Fujiwara-Nagata, E., Avendaño-Herrera, R., Bernardet, J.-F., Nicolas, P., 2018. Genomic Diversity and Evolution of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00138>
- Ducrocq, V., S lkner, J., M szaros, G., 2010. Survival Kit v6 - A software package for survival analysis., in: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Presented at the WCGALP, Leipzig, Germany.
- Dupont-Nivet, M., Médale, F., Leonard, J., Le Guillou, S., Tiquet, F., Quillet, E., Geurden, I., 2009. Evidence of genotype–diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* 295, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.031>
- Dupont-Nivet, M., Robert-Grani , C., Guillou, S.L., Tiquet, F., Quillet, E., 2012. Comparison of isogenic lines provides evidence that phenotypic plasticity is under genetic control in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology* 81, 1754–1762. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03437.x>
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Chevassus, B., 2002. Optimization of factorial mating designs for inference on heritability in fish species. *Aquaculture, Genetics in Aquaculture VII* 204, 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00839-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00839-0)
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Haffray, P., Chevassus, B., 2006. Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs. *Aquaculture* 252, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.005>
- Duston, J., Bromage, N., 1986. Photoperiodic mechanisms and rhythms of reproduction in the female rainbow trout. *Fish Physiol Biochem* 2, 35–51. <https://doi.org/10.1007/BF02264072>

- Ekman, E., Akerman, G., Balk, L., Norrgren, L., 2003. Nanoinjection as a tool to mimic vertical transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 55, 93–99. <https://doi.org/10.3354/dao055093>
- Ekman, E., Norrgren, L., 2003. Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 26, 529–538. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00487.x>
- Elsen, J.-M., Mangin, B., Goffinet, B., Boichard, D., Le Roy, P., 1999. Alternative models for QTL detection in livestock. I. General introduction. *Genetics Selection Evolution* 31, 213. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-31-3-213>
- Embury, G.C., Hayford, C.O., 1925. The Advantage of Rearing Brook Trout Fingerlings from Selected Breeders. *Transactions of the American Fisheries Society* 55, 135–148. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1925\)55\[135:TAORBT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1925)55[135:TAORBT]2.0.CO;2)
- Escaffre, A.-M., Bergot, P., 1984. Utilization of the yolk in rainbow trout alevins (*Salmo gairdneri* Richardson) : effect of egg size. *Reproduction Nutrition Développement* 24, 449–460.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R., 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity (Edinb)* 71 (Pt 5), 488–496.
- Eyngor, M., Tekoah, Y., Shapira, R., Hurvitz, A., Zlotkin, A., Lublin, A., Eldar, A., 2008. Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6892–6897. <https://doi.org/10.1128/AEM.00853-08>
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4 edition. ed. Pearson, Harlow.
- FAO, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.* (SOFIA). Rome.
- FAO, 2015. *Fishery et Aquaculture Statistics: FishStatJ.* FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132, 645–657. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00109-5)
- Ferrari, S., Chatain, B., Cousin, X., Leguay, D., Vergnet, A., Vidal, M.-O., Vandeputte, M., Bégout, M.-L., 2014. Early individual electronic identification of sea bass using RFID microtags: A first example of early phenotyping of sex-related growth. *Aquaculture* 426–427, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.033>
- Fevolden, S.E., Nordmo, R., Refstie, T., Røed, K.H., 1993. Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) selected for high or low responses to stress. *Aquaculture* 109, 215–224. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90164-T](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90164-T)
- Fijneman, R.J., de Vries, S.S., Jansen, R.C., Demant, P., 1996. Complex interactions of new quantitative trait loci, *Sluc1*, *Sluc2*, *Sluc3*, and *Sluc4*, that influence the susceptibility to lung cancer in the mouse. *Nat. Genet.* 14, 465–467. <https://doi.org/10.1038/ng1296-465>
- Filangi, O., Moreno-Romieux, C., Gilbert, H., Legarra Albizu, A., Le Roy, P., Elsen, J.M., 2010. QTLMap, a software for QTL detection in outbred populations, in: 9. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Presented at the WCGALP, Leipzig, Germany, p. np.
- Fineblum, W.L., Rausher, M.D., 1995. Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature* 377, 517–520. <https://doi.org/10.1038/377517a0>
- Flint, J., Mott, R., 2001. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat. Rev. Genet.* 2, 437–445. <https://doi.org/10.1038/35076585>

- FranceAgriMer, 2018. Les filières pêche et aquaculture Bilan 2017, Données et bilans de FranceAgriMer. FranceAgriMer.
- FranceAgriMer, 2016. Les filières pêche et aquaculture en France. FranceAgriMer.
- Fraslin, C., Dechamp, N., Bernard, M., Krieg, F., Hervet, C., Guyomard, R., Esquerré, D., Barbieri, J., Kuchly, C., Duchaud, E., Boudinot, P., Rochat, T., Bernardet, J.-F., Quillet, E., 2018a. Quantitative trait loci for resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions. *Genetics Selection Evolution* 50, 60. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0431-9>
- Fraslin, C., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Bestin, A., Vandeputte, M., 2018b. How to genetically increase fillet yield in fish: New insights from simulations based on field data. *Aquaculture* 486, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.012>
- Fritz, S., Colleau, J.J., Druet, T., Boscher, M.Y., Rossignol, M.N., Malafosse, A., Boichard, D., 2003. Mise en place d'une Sélection Assistée par Marqueurs dans les trois principales races bovines laitières françaises, in: *Rencontres Recherches Ruminants*. Presented at the 3R, pp. 53–56.
- Froschauer, A., Volff, J.-N., Braasch, I., 2006. Fish Genomes, Comparative Genomics and Vertebrate Evolution [WWW Document]. *Current Genomics*. URL <http://www.eurekaselect.com/55207/article> (accessed 8.2.18).
- Gao, G., 2016. A New and Improved Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reference Genome Assembly. Presented at the International Conference on Integrative Salmonid Biology.
- Gao, G., Nome, T., Pearse, D.E., Moen, T., Naish, K.A., Thorgaard, G.H., Lien, S., Palti, Y., 2018. A New Single Nucleotide Polymorphism Database for Rainbow Trout Generated Through Whole Genome Resequencing. *Front. Genet.* 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00147>
- Garcia, C., Pozet, F., Michel, C., 2000. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis. Aquat. Org.* 42, 191–197. <https://doi.org/10.3354/dao042191>
- Genet, C., Dehais, P., Palti, Y., Gao, G., Gavory, F., Wincker, P., Quillet, E., Boussaha, M., 2011. Analysis of BAC-end sequences in rainbow trout: Content characterization and assessment of synteny between trout and other fish genomes. *BMC Genomics* 12, 314. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-314>
- Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M.N., Schrama, J.W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S.J., Panserat, S., Médale, F., 2013. The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout. *PLOS ONE* 8, e83162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083162>
- Gilbert, H., 2015. Sélection pour l'efficacité alimentaire chez le porc en croissance : opportunités et challenges. Presented at the 47e Journées Recherche Porcine, Paris, France, p. 12.
- Gjedrem, T., 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture Complete*, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.003>
- Gjedrem, T., 2010. The first family-based breeding program in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2, 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01011.x>
- Gjedrem, T., 1997. Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquaculture International* 5, 197–206. <https://doi.org/10.1023/A:1014546816984>
- Gjedrem, T., 1975. Possibilities for genetic gain in salmonids. *Aquaculture* 6, 23–29. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(75\)90087-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(75)90087-3)
- Gjedrem, T., Gjedrem, T., 2015. Disease Resistant Fish and Shellfish Are within Reach: A Review. *Journal of Marine Science and Engineering* 3, 146–153. <https://doi.org/10.3390/jmse3010146>

- Gjedrem, T., Robinson, N., Rye, M., 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* 350–353, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
- Glass, E.J., 2012. The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00263>
- Goddard, M.E., Hayes, B.J., 2002. Optimisation of response using molecular data. 2002. Session 22, 22.01.
- Gómez, E., Méndez, J., Cascales, D., Guijarro, J.A., 2014. *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: a difficult task. *Microbial Biotechnology* 7, 414–423. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12099>
- Gonzalez-Pena, D., Gao, G., Baranski, M., Moen, T., Cleveland, B.M., Kenney, P.B., Vallejo, R.L., Palti, Y., Leeds, T.D., 2016. Genome-Wide Association Study for Identifying Loci that Affect Fillet Yield, Carcass, and Body Weight Traits in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Genet* 7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00203>
- Gordon, L., Giraud, E., Ganière, J.-P., Armand, F., Bouju-Albert, A., de la Cotte, N., Mangion, C., Le Bris, H., 2007. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03138.x>
- Grima, L., Chatain, B., Ruelle, F., Vergnet, A., Launay, A., Mambrini, M., Vandeputte, M., 2010. In search for indirect criteria to improve feed utilization efficiency in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Part II: Heritability of weight loss during feed deprivation and weight gain during re-feeding periods. *Aquaculture* 302, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.016>
- Grima, L., Quillet, E., Boujard, T., Robert-Granié, C., Chatain, B., Mambrini, M., 2008. Genetic variability in residual feed intake in rainbow trout clones and testing of indirect selection criteria (Open Access publication). *Genet. Sel. Evol.* 40, 607–624. <https://doi.org/10.1051/gse:2008026>
- Grimholt, U., Lie, O., 1998. The major histocompatibility complex in fish. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 17, 121–127. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1091>
- Guy, S.Z.Y., Thomson, P.C., Hermes, S., 2012. Selection of pigs for improved coping with health and environmental challenges: breeding for resistance or tolerance? *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00281>
- Guyomard, R., Boussaha, M., Krieg, F., Hervet, C., Quillet, E., 2012. A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC Genetics* 13, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-15>
- Guyomard, R., Mauger, S., Tabet-Canale, K., Martineau, S., Genet, C., Krieg, F., Quillet, E., 2006. A Type I and Type II microsatellite linkage map of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics* 7, 302. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-302>
- Guyomard, R., Vandeputte, M., 2010. Chapitre 1. Génétique, in: *La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage*. Quae, pp. 9–38.
- Hadidi, S., Glenney, G.W., Welch, T.J., Silverstein, J.T., Wiens, G.D., 2008. Spleen Size Predicts Resistance of Rainbow Trout to *Flavobacterium psychrophilum* Challenge. *The Journal of Immunology* 180, 4156–4165. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4156>
- Haffray, P., Bugeon, J., Rivard, Q., Quittet, B., Puyo, S., Allamelou, J.M., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., 2013. Genetic parameters of in-vivo prediction of carcass, head and fillet yields by internal ultrasound and 2D external imagery in large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 410–411, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.016>
- Haffray, P., Pincent, C., Rault, P., Coudurier, B., 2004. Domestication et amélioration génétique des cheptels piscicoles français dans le cadre du SYSAAF. *INRA Productions Animales* 17, 243–252.

- Haldane, J.B., 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8, 299–309.
- Haley, C.S., Visscher, P.M., 1998. Strategies to Utilize Marker-Quantitative Trait Loci Associations. *Journal of Dairy Science* 81, 85–97. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)70157-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70157-2)
- Halver, J.E., Hardy, R.W., 2002. *Fish Nutrition*. Elsevier.
- Happe, A., Quillet, E., Chevassus, B., 1988. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 71, 107–118. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90278-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90278-5)
- Harrell, F.E., Davis, C.E., 1982. A new distribution-free quantile estimator. *Biometrika* 69, 635–640. <https://doi.org/10.1093/biomet/69.3.635>
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J., Goddard, M.E., 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92, 433–443. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1646>
- Heath, D.D., Busch, C., Kelly, J., Atagi, D.Y., 2002. Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology* 11, 197–214. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01434.x>
- Henderson, C.R., 1973. SIRE EVALUATION AND GENETIC TRENDS. *J Anim Sci* 1973, 10–41. <https://doi.org/10.1093/ansci/1973.Symposium.10>
- Henderson, C.R., 1963. Selection Index and Expected Genetic Advance. *Statistical Genetics and Plant Breeding* 982, 141–163.
- Henryon, M., Berg, P., Olesen, N.J., Kjær, T.E., Slierendrecht, W.J., Jokumsen, A., Lund, I., 2005. 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* 250, 621–636. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.022>
- Henryon, M., Jokumsen, A., Berg, P., Lund, I., Pedersen, P.B., Olesen, N.J., Slierendrecht, W.J., 2002. Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture* 209, 59–76. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00729-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00729-3)
- Hertwig, O., 1911. Die Radiumkrankheit tierischer Keimzellen. *Arch. mikr. Anat.* 77, 1–97.
- Hjelmeland, K., Christie, M., Raa, J., 1983. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* 23, 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02878.x>
- Hoare, R., Ngo, T.P.H., Bartie, K.L., Adams, A., 2017. Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorhynchus mykiss* L.). *Veterinary Research* 48, 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z>
- Hollebecq, M.-G., Faivre, B., Bourmaud, C., Michel, C., 1995. Spontaneous bactericidal and complement activities in serum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genetically selected for resistance or susceptibility to furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 407–426. <https://doi.org/10.1006/fsim.1995.0040>
- Holt, R.A., 1993. Bacterial cold-water disease. *Bacterial diseases of fish* 3–22.
- Holt, R.A., 1988. *Cytophaga psychrophila*, the Causative Agent of Bacterial Cold-water Disease in Salmonid Fish. Oregon State University Corvallis, Oregon State.
- Houston, R.D., 2017. Future directions in breeding for disease resistance in aquaculture species. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46, 545–551. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000600010>
- Houston, R.D., Taggart, J.B., Cézard, T., Bekaert, M., Lowe, N.R., Downing, A., Talbot, R., Bishop, S.C., Archibald, A.L., Bron, J.E., Penman, D.J., Davassi, A., Brew, F., Tinch, A.E., Gharbi, K., Hamilton, A., 2014. Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 15, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-90>

- Hulata, G., Wohlfarth, G.W., Halevy, A., 1986. Mass selection for growth rate in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture, Genetics in Aquaculture II* 57, 177–184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90195-X)
- Iida, Y., Mizokami, A., 1996. Outbreaks of Coldwater Disease in Wild Ayu and Pale Chub. *Fish Pathol.*, 31, 157–164. <https://doi.org/10.3147/jsfp.31.157>
- Izumi, S., Aranishi, F., Wakabayashi, H., 2003. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.* 56, 207–214. <https://doi.org/10.3354/dao056207>
- Jagiello, K., Polonis, M., Dobosz, S., Ocalewicz, K., 2018. Use of eggs from double haploid (DH) rainbow trout and UV irradiated grayling sperm to produce clonal fish. Presented at the AQUA2018, Montpellier, France.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 261–279. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005019>
- Jalabert, B., Billard, R., Chevassus, B., Escaffre, A., Carpentier, M., 1975. Preliminary experiments on sex control in trout: production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 15, 19–28.
- Jamieson, A., 1965. The genetics of transferrins in cattle. *Heredity (Edinb)* 20, 419–441.
- Johnson, N.A., Vallejo, R.L., Silverstein, J.T., Welch, T.J., Wiens, G.D., Hallerman, E.M., Palti, Y., 2008. Suggestive Association of Major Histocompatibility IB Genetic Markers with Resistance to Bacterial Cold Water Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol* 10, 429–437. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9080-7>
- Johnston, C.E., Cheverie, J.C., 1985. Comparative Analysis of Ionoregulation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) of Different Sizes Following Rapid and Slow Salinity Adaptation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1994–2003. <https://doi.org/10.1139/f85-247>
- Kalbfleisch, J.D., Prentice, R.L., 1980. *The Statistical Analysis of Failure Time Data*, Wiley. ed. New York, USA.
- Kaspar, V., Vandeputte, M., Kohlmann, K., Hulak, M., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Linhart, O., 2008. A proposal and case study towards a conceptual approach of validating sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.), with practical implications for hatchery procedures. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 406–409. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01148.x>
- Katagiri, T., Asakawa, S., Minagawa, S., Shimizu, N., Hirono, I., Aoki, T., 2001. Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. *Anim. Genet.* 32, 200–204.
- Kause, A., Ødegård, J., 2012. The genetic analysis of tolerance to infections: a review. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00262>
- Kause, A., Tobin, D., Dobly, A., Houlihan, D., Martin, S., Mäntysaari, E.A., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006a. Recording strategies and selection potential of feed intake measured using the X-ray method in rainbow trout. *Genetics Selection Evolution* 38, 389. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-38-4-389>
- Kause, A., Tobin, D., Houlihan, D.F., Martin, S. a. M., Mäntysaari, E.A., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006b. Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection: Different genetic potential on alternative diets. *J Anim Sci* 84, 807–817. <https://doi.org/10.2527/2006.844807x>
- Kaushik, S.J., 1998. Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non-salmonids. *Aquatic Living Resources* 11, 211–217. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(98\)89003-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)89003-7)
- Kent, M., Groff, J., Morrison, J., Yasutake, W., Holt, R., 1989. Spiral swimming behavior due to cranial and vertebral lesions associated with *Cytophaga psychrophila* infections in salmonid fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 6, 11–16. <https://doi.org/10.3354/dao006011>

- Khoo, S.K., Ozaki, A., Nakamura, F., Arakawa, T., Ishimoto, S., 2004. Identification of a novel chromosomal region associated with IHNV resistance in rainbow trout. *Fish Pathology* 39, 95–102.
- Kincaid, H.L., Bridges, W.R., Limbach, B. von, 1977. Three Generations of Selection for Growth Rate in Fall-Spawning Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 106, 621–628. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1977\)106<621:TGOSFG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1977)106<621:TGOSFG>2.0.CO;2)
- Knott, S.A., Elsen, J.M., Haley, C.S., 1996. Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoret. Appl. Genetics* 93, 71–80. <https://doi.org/10.1007/BF00225729>
- Knott, S.A., Haley, C.S., 1992. Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. *Genetics Research* 60, 139–151. <https://doi.org/10.1017/S0016672300030822>
- Kondo, M., Kawai, K., Kurohara, K., Oshima, S., 2002. Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infect.* 4, 279–283.
- Kosambi, D.D., 1943. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Annals of Eugenics* 12, 172–175. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x>
- Krishna, G., Gopikrishna, G., Gopal, C., Jahageerdar, S., Ravichandran, P., Kannappan, S., Pillai, S.M., Paulpandi, S., Kiran, R.P., Saraswati, R., Venugopal, G., Kumar, D., Gitterle, T., Lozano, C., Rye, M., Hayes, B., 2011. Genetic parameters for growth and survival in *Penaeus monodon* cultured in India. *Aquaculture* 318, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.028>
- Kumagai A., 2016. Bacterial cold-water disease in salmonid fish and ayu. *Fish Pathol.*, 51, 153–157. <https://doi.org/10.3147/jsfp.51.153>
- Kumagai, A., Nawata, A., 2010. Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* Vertical Transmission by Iodophor Treatment of Unfertilized Eggs in Salmonids. *Fish Pathol.* 45, 164–168. <https://doi.org/10.3147/jsfp.45.164>
- Kumagai, A., Takahashi, K., 1997. Imported Eggs Responsible for the Outbreaks of Cold-Water Disease among Cultured Coho Salmon in Japan. *Fish Pathol.*, 32, 231–232. <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.231>
- Labbé, L., Prunet, P., 2010. Chapitre 11. Adaptation, in: *La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage*. Quae, p. 227.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science* 7, 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- LaFramboise, T., 2009. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 37, 4181–4193. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp552>
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Cain, K.D., 2003. Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome. *Journal of Fish Diseases* 26, 377–384. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00468.x>
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Congleton, J.L., Sun, B., Cain, K.D., 2002. Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 25, 703–713. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00424.x>
- Lallias, D., Boussaha, M., Bernard, M., Ciobotaru, C., Dechamp, N., Dupont Nivet, M., Quillet, E., 2018. In-depth genomic characterization of a unique collection of rainbow trout isogenic lines. *AQUA 2008 Abstracts Website*.

- Lallias, D., Quillet, E., Bégout, M.-L., Aupérin, B., Khaw, H.L., Millot, S., Valotaire, C., Kernéis, T., Labbé, L., Prunet, P., Dupont-Nivet, M., 2017. Genetic variability of environmental sensitivity revealed by phenotypic variation in body weight and (its) correlations to physiological and behavioral traits. *PLOS ONE* 12, e0189943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189943>
- Lande, R., Thompson, R., 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743–756.
- Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–199.
- Langevin, C., Blanco, M., Martin, S.A.M., Jouneau, L., Bernardet, J.-F., Houel, A., Lunazzi, A., Duchaud, E., Michel, C., Quillet, E., Boudinot, P., 2012. Transcriptional Responses of Resistant and Susceptible Fish Clones to the Bacterial Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLOS ONE* 7, e39126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039126>
- LaPatra, S.E., Fehring, T.R., Cain, K.D., 2014. A probiotic *Enterobacter* sp. provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes. *Aquaculture* 433, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.022>
- Larzul, C., Manfredi, E., Elsen, J., 1997. Potential gain from including major gene information in breeding value estimation. *Genetics Selection Evolution* 29, 161–184.
- Le Bouquin, S., Baron, S., Thomas, R., Jamin, M., Hamne-Poujade, S., Chauvin, C., 2016. Quel usage des antibiotiques en salmoniculture continentale en France ? Presented at the 5èmes Journées de la Recherche Filière Piscicole.
- Le Bras, Y., Dechamp, N., Krieg, F., Filangi, O., Guyomard, R., Boussaha, M., Bovenhuis, H., Pottinger, T.G., Prunet, P., Le Roy, P., Quillet, E., 2011. Detection of QTL with effects on osmoregulation capacities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics* 12, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-46>
- Le Roy, P., Elsen, J.M., Boichard, D., Mangin, B., Bidanel, J.P., Goffinet, B., 1998. An algorithm for QTL detection in mixture of full and half sib families. Presented at the 6th World congress on genetics applied to livestock production, Armidale, Australia.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture Research* 25, 345–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00698.x>
- Leder, E.H., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., 2006. The Candidate Gene, Clock, Localizes to a Strong Spawning Time Quantitative Trait Locus Region in Rainbow Trout. *J Hered* 97, 74–80. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj004>
- Leeds, T.D., Silverstein, J.T., Weber, G.M., Vallejo, R.L., Palti, Y., Rexroad, C.E., Evenhuis, J., Hadidi, S., Welch, T.J., Wiens, G.D., 2010. Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *J. Anim. Sci.* 88, 1936–1946. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2538>
- Legarra, A., Fernando, R.L., 2009. Linear models for joint association and linkage QTL mapping. *Genetics Selection Evolution* 41, 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-43>
- Lehmann, J., Mock, D., Stiirenberg, F.-J., Bernardet, J.-F., 1991. First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Diseases of Aquatic Organisms* 10, 217–220. <https://doi.org/10.3354/dao010217>
- Levraud, J.-P., Palha, N., Langevin, C., Boudinot, P., 2014. Through the looking glass: witnessing host–virus interplay in zebrafish. *Trends in Microbiology* 22, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.014>
- Li, H., 2011. A quick method to calculate QTL confidence interval. *J. Genet.* 90, 355–360.
- Lien, S., Gidskehaug, L., Moen, T., Hayes, B.J., Berg, P.R., Davidson, W.S., Omholt, S.W., Kent, M.P., 2011. A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome

- homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics* 12, 615. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-615>
- Lien, S., Koop, B.F., Sandve, S.R., Miller, J.R., Kent, M.P., Nome, T., Hvidsten, T.R., Leong, J.S., Minkley, D.R., Zimin, A., Grammes, F., Grove, H., Gjuvsland, A., Walenz, B., Hermansen, R.A., von Schalburg, K., Rondeau, E.B., Di Genova, A., Samy, J.K.A., Olav Vik, J., Vigeland, M.D., Caler, L., Grimholt, U., Jentoft, S., Inge Våge, D., de Jong, P., Moen, T., Baranski, M., Palti, Y., Smith, D.R., Yorke, J.A., Nederbragt, A.J., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K.S., Jiang, X., Fan, D., Hu, Y., Liberles, D.A., Vidal, R., Iturra, P., Jones, S.J.M., Jonassen, I., Maass, A., Omholt, S.W., Davidson, W.S., 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature* 533, 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Liu, S., Vallejo, R.L., Palti, Y., Gao, G., Marancik, D.P., Hernandez, A.G., Wiens, G.D., 2015. Identification of single nucleotide polymorphism markers associated with bacterial cold water disease resistance and spleen size in rainbow trout. *Front. Genet.* 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00298>
- Long, A., Call, D.R., Cain, K.D., 2014. Investigation of the Link between Broodstock Infection, Vertical Transmission, and Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* in Eggs and Progeny of Rainbow Trout and Coho Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 26, 66–77. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.886632>
- Lorenzen, E., 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in Relation to Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). National Veterinary Laboratory, Århus, and Royal Veterinary and Agriculture University, Copenhagen, Denmark.
- Lund, T., Gjedrem, T., Bentsen, H.B., Eide, D.M., Larsen, H.J.S., Røed, K.H., 1995. Genetic variation in immune parameters and associations to survival in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 46, 748–758. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01598.x>
- Madetoja, J., Nyman, P., Wiklund, T., 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 43, 27–38. <https://doi.org/10.3354/dao043027>
- Madetoja, J., Nystedt, S., Wiklund, T., 2003. Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01061.x>
- Madsen, L., Bertelsen, S.K., Dalsgaard, I., Middelboe, M., 2013. Dispersal and Survival of *Flavobacterium psychrophilum* Phages In Vivo in Rainbow Trout and In Vitro under Laboratory Conditions: Implications for Their Use in Phage Therapy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4853–4861. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-13>
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 1999. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 36, 169–176. <https://doi.org/10.3354/dao036169>
- Mair, G.C., Bartley, D.M., Stankus, A., Beveridge, M., Funge-Smith, S., Garcia-Gomez, R., Lucente, D., Sirani, C., Zhou, X.W., Zhang, Z., Halwart, M., 2018. The state of the world's aquatic genetic resources. Presented at the XIII ISGA, Cairns, Australia.
- Marancik, D., Gao, G., Paneru, B., Ma, H., Hernandez, A.G., Salem, M., Yao, J., Palti, Y., Wiens, G.D., 2015. Whole-body transcriptome of selectively bred, resistant-, control-, and susceptible-line rainbow trout following experimental challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Genet* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00453>
- Martínez, J.L., Casado, A., Enríquez, R., 2004. Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Dis. Aquat. Org.* 59, 79–84. <https://doi.org/10.3354/dao059079>
- Martinez, V.A., Hill, W.G., Knott, S.A., 2002. On the use of double haploids for detecting QTL in outbred populations. *Heredity (Edinb)* 88, 423–431.

- Mauricio, R., Rausher, M.D., Burdick, D.S., 1997. Variation in the Defense Strategies of Plants: Are Resistance and Tolerance Mutually Exclusive? *Ecology* 78, 1301–1311.
<https://doi.org/10.2307/2266125>
- Merle, C., Faure, D., Urdaci, M.-C., Le Hénaff, M., 2003. Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1120–1127.
- MESRI, 2016. Utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements utilisateurs français -Enquête statistique 2016 -.
- Meuwissen, T.H., Goddard, M.E., 2000. Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics* 155, 421–430.
- Meuwissen, T.H., Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829.
- Meuwissen, T.H.E., Karlsen, A., Lien, S., Olsaker, I., Goddard, M.E., 2002. Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Genetics* 161, 373–379.
- Meyers, T., 1989. Apparent chronic bacterial myeloen-cephalitis in hatchery-reared juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Alaska. *Diseases of Aquatic Organisms* 6, 217–219.
<https://doi.org/10.3354/dao006217>
- Michel, C., Garcia, C., 2003. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 34, 127–132.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2002057>
- Miller, M.R., Atwood, T.S., Eames, B.F., Eberhart, J.K., Yan, Y.-L., Postlethwait, J.H., Johnson, E.A., 2007. RAD marker microarrays enable rapid mapping of zebrafish mutations. *Genome Biology* 8, R105.
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r105>
- Miller, N.W., Sizemore, R.C., Clem, L.W., 1985. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. *The Journal of Immunology* 134, 2884–2888.
- Millot, S., Péan, S., Labbé, L., Kerneis, T., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Bégout, M.-L., 2014. Assessment of genetic variability of fish personality traits using rainbow trout isogenic lines. *Behav. Genet.* 44, 383–393. <https://doi.org/10.1007/s10519-014-9652-z>
- Moreno, C.R., Elsen, J.M., Roy, P.L., Ducrocq, V., 2005. Interval mapping methods for detecting QTL affecting survival and time-to-event phenotypes. *Genetics Research* 85, 139–149.
<https://doi.org/10.1017/S0016672305007366>
- Morgan, T.H., 1911. The Origin of Five Mutations in Eye Color in *Drosophila* and Their Modes of Inheritance. *Science* 33, 534–537. <https://doi.org/10.1126/science.33.849.534-a>
- Morin, T., Pallandre, L., Cabon, J., Louboutin, L., Bestin, A., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Allal, F., Chatain, B., Guéméné, D., Salvat, G., Haffray, P., 2016. FORTIOR Genetics, Une plateforme de challenge pour améliorer la résistance génétique aux maladies aquacoles, in: Poster. Presented at the 5e JRFP.
- Morris, D.B., Richard, K.R., Wright, J.M., 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 120–126.
- Morrison, R.N., Nowak, B.F., 2002. The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Serodiagnostics* 11, 46–54. <https://doi.org/10.1053/saep.2002.28241>
- Muziasari, W.I., Pärnänen, K., Johnson, T.A., Lyra, C., Karkman, A., Stedtfeld, R.D., Tamminen, M., Tiedje, J.M., Virta, M., 2016. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw052.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw052>

- Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T.K., Somamoto, T., 2011. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1296–1308. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.003>
- Naruse, K., Ijiri, K., Shima, A., Egami, N., 1985. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 236, 335–341. <https://doi.org/10.1002/jez.1402360311>
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2003a. Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 55, 101–107. <https://doi.org/10.3354/dao055101>
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2003b. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 26, 563–574. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x>
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 807–825. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00037-4)
- Nichols, K.M., Young, W.P., Danzmann, R.G., Robison, B.D., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R.B., Bentzen, P., Spies, I., Knudsen, K., Allendorf, F.W., Cunningham, B.M., Brunelli, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K.H., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Genetics* 34, 102–115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00957.x>
- Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.F., Duchaud, E., 2008. Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74. <https://doi.org/10.1128/AEM.00244-08>
- Nobel Lecture, 2018. Nobel Lecture [WWW Document]. NobelPrize.org. URL <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1907/laveran/lecture/>
- Okazaki, T., 1984. Genetic-Divergence and Its Zoogeographic Implications in Closely Related Species *Salmo-Gairdneri* and *Salmo-Mykiss*. *Jpn. J. Ichthyol.* 31, 297–311.
- Oplinger, R.W., Wagner, E.J., Cavender, W., 2015. Use of Penicillin and Streptomycin to Reduce Spread of Bacterial Coldwater Disease II: Efficacy of Using Antibiotics in Diluents and During Water Hardening. *Journal of Aquatic Animal Health* 27, 32–37. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.945049>
- Ostland, V.E., McGrogan, D.G., Ferguson, H.W., 1997. Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases* 20, 443–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00323.x>
- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M.R., Akutsu, T., Okamoto, N., 2001. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics* 265, 23–31.
- Pacha, R.E., Ordal, E.J., 1970. Myxobacterial diseases of salmonids. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 5, 243–257.
- Pacha, R.E., Porter, S., 1968. Characteristics of myxobacteria isolated from the surface of freshwater fish. *Appl Microbiol* 16, 1901–1906.
- Palaiokostas, C., Bekaert, M., Khan, M.G., Taggart, J.B., Gharbi, K., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2015. A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics* 16, 171. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1383-x>
- Palti, Y., Gahr, S.A., Hansen, J.D., Rexroad, C.E., 2004. Characterization of a new BAC library for rainbow trout: evidence for multi-locus duplication. *Anim. Genet.* 35, 130–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01112.x>
- Palti, Y., Gao, G., Liu, S., Kent, M.P., Lien, S., Miller, M.R., Rexroad, C.E., Moen, T., 2015a. The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources* 15, 662–672. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12337>

- Palti, Y., Gao, G., Miller, M.R., Vallejo, R.L., Wheeler, P.A., Quillet, E., Yao, J., Thorgaard, G.H., Salem, M., Rexroad, C.E., 2014. A resource of single-nucleotide polymorphisms for rainbow trout generated by restriction-site associated DNA sequencing of doubled haploids. *Molecular Ecology Resources* 14, 588–596. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12204>
- Palti, Y., Genet, C., Luo, M.C., Charlet, A., Gao, G., Hu, Y., Castaño-Sánchez, C., Tabet-Canale, K., Krieg, F., Yao, J., Vallejo, R.L., Rexroad, C.E., 2011. A first generation integrated map of the rainbow trout genome. *BMC Genomics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-180>
- Palti, Y., Luo, M.C., Hu, Y., Genet, C., You, F.M., Vallejo, R.L., Thorgaard, G.H., Wheeler, P.A., Rexroad, C.E., 2009. A first generation BAC-based physical map of the rainbow trout genome. *BMC Genomics* 10, 462. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-462>
- Palti, Y., Parsons, J.E., Thorgaard, G.H., 1999. Identification of candidate DNA markers associated with IHN virus resistance in backcrosses of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). *Aquaculture* 173, 81–94. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00471-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00471-2)
- Palti, Y., Vallejo, R.L., Gao, G., Liu, S., Hernandez, A.G., Rexroad, C., Wiens, G.D., 2015b. Detection and Validation of QTL Affecting Bacterial Cold Water Disease Resistance in Rainbow Trout Using Restriction-Site Associated DNA Sequencing. *PLOS ONE* 10, e0138435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138435>
- Parker, G.A., 1998. 1 - Sperm Competition and the Evolution of Ejaculates: Towards a Theory Base, in: Birkhead, T.R., Møller, A.P. (Eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, San Diego, pp. 3–54. <https://doi.org/10.1016/B978-012100543-6/50026-X>
- Pérez-Pascual, D., Rochat, T., Kerouault, B., Gómez, E., Neulat-Ripoll, F., Henry, C., Quillet, E., Guijarro, J.A., Bernardet, J.F., Duchaud, E., 2017. More Than Gliding: Involvement of GldD and GldG in the Virulence of *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02168>
- Perry, S.F., Tufts, B., 1998. *Fish Respiration*. Academic Press.
- Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S., Hoekstra, H.E., 2012. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Phillips, P.C., 2008. Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* 9, 855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>
- Phillips, R.B., Nichols, K.M., DeKoning, J.J., Morasch, M.R., Keatley, K.A., Rexroad, C., Gahr, S.A., Danzmann, R.G., Drew, R.E., Thorgaard, G.H., 2006. Assignment of Rainbow Trout Linkage Groups to Specific Chromosomes. *Genetics* 174, 1661–1670. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.055269>
- Pilson, D., 2000. The evolution of plant response to herbivory: simultaneously considering resistance and tolerance in *Brassica rapa*. *Evolutionary Ecology* 14, 457. <https://doi.org/10.1023/A:1010953714344>
- Plinius Secundus, G., 1469. *Naturalis Historia*. Nicolas Jenson.
- Purdom, C.E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33, 287–300. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90409-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90409-X)
- Quillet, E., 1994. Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic rainbow trout females. *Aquaculture* 123, 223–236. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90061-2)
- Quillet, E., 1986. Contribution à l'étude de la triploïdie induite chez les salmonidés : conséquences sur les caractéristiques zootechniques (Thèse de Docteur-Ingénieur). INA PG.
- Quillet, E., Aubard, G., Quéau, I., 2002. Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: detection and genetic analysis. *J. Hered.* 93, 91–99.

- Quillet, E., Boudry, P., Lapegue, S., 2007a. Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes : un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage. *INRA Productions Animales* 20, 239–252.
- Quillet, E., Chevassus, B., Blanc, J.-M., Krieg, F., Chourrout, D., 1988. Performances of auto and allotriploids in salmonids I. Survival and growth in fresh water farming. *Aquat. Living Resour.* 1, 29–43. <https://doi.org/10.1051/alr:1988004>
- Quillet, E., Dorson, M., 2018. Exploitation de la résistance génétique aux maladies des poissons, in: *GESTION DE LA SANTE DES POISSONS*.
- Quillet, E., Dorson, M., Aubard, G., Torhy, C., 2007b. In vitro assay to select rainbow trout with variable resistance/susceptibility to viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 76, 7–16. <https://doi.org/10.3354/dao076007>
- Quillet, E., Dorson, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., Boudinot, P., 2007c. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.07.002>
- Quillet, E., Garcia, P., Guyomard, R., 1991. Analysis of the production of all homozygous lines of rainbow trout by gynogenesis. *Journal of Experimental Zoology* 257, 367–374. <https://doi.org/10.1002/jez.1402570310>
- Quillet, E., Le Guillou, S., Aubin, J., Fauconneau, B., 2005. Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.014>
- Quinton, C.D., Moghadasi, S.M., McKay, L.R., McMillan, I., 2002. Genetic parameters of body weight, female spawning date, and age at sexual maturation in rainbow trout. Presented at the 7th World Congress on Genetics in Applied to Livestock Production, Montpellier, France, p. 4.
- R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rabanal, H.R., 1988. History of Aquaculture. FAO.
- Råberg, L., Graham, A.L., Read, A.F., 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 364, 37–49. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0184>
- Råberg, L., Sim, D., Read, A.F., 2007. Disentangling Genetic Variation for Resistance and Tolerance to Infectious Diseases in Animals. *Science* 318, 812–814. <https://doi.org/10.1126/science.1148526>
- Rahman, M.H., Kuroda, A., Dijkstra, J.M., Kiryu, I., Nakanishi, T., Otodate, M., 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 169–179. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0362>
- Rahman, M.H., Otodate, M., Iida, Y., Yokomizo, Y., Nakanishi, T., 2000. Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 35, 199–203. <https://doi.org/10.3147/jsfp.35.199>
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J.D., Costa, G., Kataria, P., Bromage, E.S., 2012. Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. *J. Immunol.* 188, 1341–1349. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101938>
- Rangdale, R.E., 1995. Studies on rainbow trout fry syndrome (RTFS). Ministry of Agriculture, Fisheries and Fodd, Weymouth, University of Stirling.
- Rangdale, R.E., Richards, R.H., Alderman, D.J., 1999. Histopathological and electron microscopical observations on rainbow trout fry syndrome. *Vet. Rec.* 144, 251–254.
- Rasmussen, R.S., 2008. Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. *Aquaculture Research* 32, 767–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00617.x>

- Refstie, T., Steine, T.A., 1978. Selection experiments with salmon: III. Genetic and environmental sources of variation in length and weight of Atlantic salmon in the freshwater phase. *Aquaculture* 14, 221–234. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90096-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90096-0)
- Regneri, J., Klotz, B., Scharl, M., 2016. Chapter Two - Genomic and Transcriptomic Approaches to Study Cancer in Small Aquarium Fish Models, in: Foulkes, N.S. (Ed.), *Advances in Genetics, Genetics, Genomics and Fish Phenomics*. Academic Press, pp. 31–63. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.04.001>
- Rendueles, O., Ferrières, L., Frétaud, M., Bégaud, E., Herbomel, P., Levraud, J.-P., Ghigo, J.-M., 2012. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria. *PLoS Pathog.* 8, e1002815. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002815>
- Rexroad, C.E., Rodriguez, M.F., Coulibaly, I., Gharbi, K., Danzmann, R.G., DeKoning, J., Phillips, R., Palti, Y., 2005. Comparative mapping of expressed sequence tags containing microsatellites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 6, 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-54>
- Rexroad, C.E., Vallejo, R.L., 2009. Estimates of linkage disequilibrium and effective population size in rainbow trout. *BMC Genet* 10, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-83>
- Riffkin, G.G., Dobson, C., 1979. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infections. *Veterinary Parasitology* 5, 365–378. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(79\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0304-4017(79)90027-X)
- Robinson, N.R., Gjedrem, T., Quillet, E., 2017. Improvement of Disease Resistance by Genetic Methods, in: *Fish Diseases, Prevention and Control Strategies*. Galina Jeney, UK.
- Robledo, D., Palaikostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P., Houston, R., 2017. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture* 0. <https://doi.org/10.1111/raq.12193>
- Rochat, T., Fujiwara-Nagata, E., Calvez, S., Dalsgaard, I., Madsen, L., Calteau, A., Lunazzi, A., Nicolas, P., Wiklund, T., Bernardet, J.-F., Duchaud, E., 2017. Genomic Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* Serotypes and Development of a Multiplex PCR-Based Serotyping Scheme. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01752>
- Rodriguez, M.F., LaPatra, S., Williams, S., Famula, T., May, B., 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture* 241, 93–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.003>
- Røed, K.H., Fjalestad, K.T., Strømsheim, A., 1993. Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 114, 19–31. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90247-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90247-V)
- Rogel-Gaillard, C., 2000. Les banques de grands fragments d'ADN. INRA Productions Animales, Génétique moléculaire : principes et applications aux populations animales HS, 79–85.
- Ruzzante, D.E., 1994. Domestication effects on aggressive and schooling behavior in fish. *Aquaculture* 120, 1–24. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90217-8)
- Ryerse, I.A., Hooft, J.M., Bureau, D.P., Hayes, M.A., Lumsden, J.S., 2016. Diets containing corn naturally contaminated with deoxynivalenol reduces the susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to experimental *Flavobacterium psychrophilum* infection. *Aquaculture Research* 47, 787–796. <https://doi.org/10.1111/are.12537>
- Sadoul, B., Friggens, N.C., Valotaire, C., Labbé, L., Colson, V., Prunet, P., Leguen, I., 2017. Physiological and behavioral flexibility to an acute CO₂ challenge, within and between genotypes in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 209, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.002>
- Sadoul, B., Leguen, I., Colson, V., Friggens, N.C., Prunet, P., 2015. A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a

- confinement stress. *Physiology & Behavior* 140, 139–147.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.006>
- Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S.K., Woram, R.A., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Holm, L.-E., Guyomard, R., Hoyheim, B., 2000. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. *Genetics* 155, 1331–1345.
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology* 4, 525–539.
<https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salte, R., Gjøen, H.M., Norberg, K., Gjerdem, T., 1993. Plasma protein levels as potential marker traits for resistance to furunculosis. *Journal of Fish Diseases* 16, 561–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00892.x>
- Schibler, L., Vaiman, D., Cribiu, E.P., 2000. Origine du polymorphisme de l'ADN. INRA Productions Animales, Génétique moléculaire : principes et applications aux populations animales HS, 37–43.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L., 2000. Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4908–4915. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4908-4915.2000>
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fisheries* 4, 401–429.
<https://doi.org/10.1007/BF00042888>
- Siekoula-Nguedia, C., Blanc, G., Duchaud, E., Calvez, S., 2012. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: predominance of a clonal complex. *Vet. Microbiol.* 161, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>
- Siitonen, L., Gall, G.A.E., 1989. Response to selection for early spawn date in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 78, 153–161. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90029-X)
- Silverstein, J.T., Vallejo, R.L., Palti, Y., Leeds, T.D., Rexroad, C.E., Welch, T.J., Wiens, G.D., Ducrocq, V., 2009. Rainbow trout resistance to bacterial cold-water disease is moderately heritable and is not adversely correlated with growth. *J Anim Sci* 87, 860–867. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1157>
- Simms, E.L., 2000. Defining tolerance as a norm of reaction. *Evolutionary Ecology* 14, 563–570.
<https://doi.org/10.1023/A:1010956716539>
- Simms, E.L., Triplett, J., 1994. COSTS AND BENEFITS OF PLANT RESPONSES TO DISEASE: RESISTANCE AND TOLERANCE. *Evolution* 48, 1973–1985. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02227.x>
- Smith, G., Stearley, R., 1989. The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trout. *Fisheries* 14, 4–10. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1989\)014<0004:TCASNO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1989)014<0004:TCASNO>2.0.CO;2)
- Soltani, M., Burke, C.M. (Department of A., 1995. Responses of fish-pathogenic *Cytophaga/Flexibacter*-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* (United Kingdom).
- Sonesson, A.K., Gjerde, B., Robinson, N., 2011. A simple selection scheme to improve disease resistance and growth. *Aquaculture* 319, 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.009>
- Starliper, C.E., 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.04.001>
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>
- Sudheesh, P.S., Zimmerman, J.K., Cain, K.D., 2016. Dietary effects on immunity, stress, and efficacy of two live attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine formulations. *Aquaculture* 454, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.004>

- Sunyer, J.O., Boshra, H., Lorenzo, G., Parra, D., Freedman, B., Bosch, N., 2003. Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 27, 549–564. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:549>
- Sunyer, J.O., Zarkadis, I.K., Sahu, A., Lambris, J.D., 1996. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8546–8551.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus*. *J Genet* 56, 143–155. <https://doi.org/10.1007/BF02984741>
- Swarup, H., 1956. Production of Heteroploidy in the Three-Spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Nature* 178, 1124–1125. <https://doi.org/10.1038/1781124a0>
- SYSAAF, 2017. Journées Techniques Aquacoles du SYSAAF : RE-SIST, Amélioration de la résistance à la flavobactériose chez la truite.
- Taylor, P.W., 2004. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in Eggs and Sexual Fluids of Pacific Salmonids by a Polymerase Chain Reaction Assay: Implications for Vertical Transmission of Bacterial Coldwater Disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 104–108. <https://doi.org/10.1577/H03-053.1>
- Thompson, K.D., 2017. Immunology: Improvement of innate and adaptive immunity, in: *Fish Diseases, Prevention and Control Strategies*. Galina Jeney, UK.
- Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57, 57–64. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90180-8)
- Thorgaard, G.H., Bailey, G.S., Williams, D., Buhler, D.R., Kaattari, S.L., Ristow, S.S., Hansen, J.D., Winton, J.R., Bartholomew, J.L., Nagler, J.J., Walsh, P.J., Vijayan, M.M., Devlin, R.H., Hardy, R.W., Overturf, K.E., Young, W.P., Robison, B.D., Rexroad, C., Palti, Y., 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 133, 609–646. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00167-7)
- Thorgaard, G.H., Gall, G.A., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics* 93, 961–973.
- Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E., Stier, A.R., 1981. Polyploidy Induced by Heat Shock in Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 110, 546–550. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1981\)110<546:PIBHSI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1981)110<546:PIBHSI>2.0.CO;2)
- Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Hershberger, W.K., Myers, J.M., 1990. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture* 85, 215–221. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90021-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90021-E)
- Uddin, N., Wakabayashi, H., 1997. Effects of Temperature on Growth and Protease Production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, 魚病研究 32, 225–226. <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.225>
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Schryver, P.D., Bossier, P., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture* 5, S1–S25. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x>
- Vallejo, R.L., Leeds, T.D., Gao, G., Parsons, J.E., Martin, K.E., Evenhuis, J.P., Fragomeni, B.O., Wiens, G.D., Palti, Y., 2017a. Genomic selection models double the accuracy of predicted breeding values for bacterial cold water disease resistance compared to a traditional pedigree-based model in rainbow trout aquaculture. *Genet. Sel. Evol.* 49, 17. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0293-6>
- Vallejo, R.L., Liu, S., Gao, G., Fragomeni, B.O., Hernandez, A.G., Leeds, T.D., Parsons, J.E., Martin, K.E., Evenhuis, J.P., Welch, T.J., Wiens, G.D., Palti, Y., 2017b. Similar Genetic Architecture with Shared and Unique Quantitative Trait Loci for Bacterial Cold Water Disease Resistance in Two Rainbow Trout Breeding Populations. *Front. Genet.* 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00156>

- Vallejo, R.L., Palti, Y., Liu, S., Evenhuis, J.P., Gao, G., Rexroad, C.E., Wiens, G.D., 2014. Detection of QTL in Rainbow Trout Affecting Survival When Challenged with *Flavobacterium psychrophilum*. *Mar Biotechnol* 16, 349–360. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9553-9>
- Vallejo, R.L., Wiens, G.D., Rexroad, C.E., Welch, T.J., Evenhuis, J.P., Leeds, T.D., Janss, L.L.G., Palti, Y., 2010. Evidence of major genes affecting resistance to bacterial cold water disease in rainbow trout using Bayesian methods of segregation analysis. *J. Anim. Sci.* 88, 3814–3832. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2951>
- van Wezel, T., Stassen, A.P., Moen, C.J., Hart, A.A., van der Valk, M.A., Demant, P., 1996. Gene interaction and single gene effects in colon tumour susceptibility in mice. *Nat. Genet.* 14, 468–470. <https://doi.org/10.1038/ng1296-468>
- Vandeputte, M., 2010. Chapitre 13. Méthodes de gestion et amélioration génétique des populations d'élevage, in: *La Truite Arc-En-Ciel : De La Biologie à l'élevage, Synthèses*. Editions Quae, p. 336 p.
- Vandeputte, M., Baroiller, J.F., Haffray, P., Quillet, E., 2009a. Amélioration génétique des poissons : quelles réalisations et quels défis pour demain ? *Cahiers Agricultures* 18, 262-269 (1).
- Vandeputte, M., Chapuis, H., Dupont Nivet, M., 2009b. Optimisation of factorial mating designs to estimate genetic parameters for threshold trait in DNA pedigreed mixed families of fish, in: *Tenth International Symposium on Genetics in Aquaculture*. Bangkok, Thailand.
- Vandeputte, M., Haffray, P., 2014. Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. *Front. Genet.* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00432>
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235, 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.019>
- Vandeputte, M., Quillet, E., Chevassus, B., 2002. Early development and survival in brown trout (*Salmo trutta fario* L.): indirect effects of selection for growth rate and estimation of genetic parameters. *Aquaculture, Genetics in Aquaculture VII* 204, 435–445. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00829-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00829-8)
- VanRaden, P.M., 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91, 4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
- Vatsos, I.N., Thompson, K.D., Adams, A., 2003. Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Org.* 56, 115–126. <https://doi.org/10.3354/dao056115>
- Vatsos, I.N., Thompson, K.D., Adams, A., 2001. Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 178–182.
- Verrier, E.R., Dorson, M., Mauger, S., Torhy, C., Ciobotaru, C., Hervet, C., Dechamp, N., Genet, C., Boudinot, P., Quillet, E., 2013. Resistance to a Rhabdovirus (VHSV) in Rainbow Trout: Identification of a Major QTL Related to Innate Mechanisms. *PLOS ONE* 8, e55302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055302>
- Verrier, E.R., Genet, C., Laloë, D., Jaffrezic, F., Rau, A., Esquerre, D., Dechamp, N., Ciobotaru, C., Hervet, C., Krieg, F., Jouneau, L., Klopp, C., Quillet, E., Boudinot, P., 2018. Genetic and transcriptomic analyses provide new insights on the early antiviral response to VHSV in resistant and susceptible rainbow trout. *BMC Genomics* 19, 482. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4860-1>
- Villanueva, B., Pong-Wong, R., Woolliams, J.A., 2002. Marker assisted selection with optimised contributions of the candidates to selection. *Genetics Selection Evolution* 34, 679. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-6-679>

- Vivier, P., 1956. Un important centenaire : REMY, GEHIN, HAXO, COSTE et l'établissement domanial de pisciculture d'Huningue (1843-1853-1953). Bulletin Français de Pisciculture 121–139. <https://doi.org/10.1051/kmae:1956004>
- Von Weis, J., 1987. Über das Vorkommen einer Kaltwasserkrankheit bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri* Tierärztl. Umschau 42, 575–577.
- Waché, Y., Auffrey, F., Gatesoupe, F.-J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture 258, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.002>
- Wahli, T., Madsen, L., 2018. Flavobacteria, a Never Ending Threat for Fish: a Review. Current Clinical Microbiology Reports 5, 26–37. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0086-x>
- Wakabayashi, H., Toyama, T., Iida, T., 1994. A Study on Serotyping of *Cytophaga psychrophila* Isolated from Fishes in Japan. Fish Pathol., 魚病研究 29, 101–104. <https://doi.org/10.3147/jsfp.29.101>
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, E.S., 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science 280, 1077–1082.
- Wang, H., Misztal, I., Aguilar, I., Legarra, A., Muir, W.M., 2012. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. Genetics Research 94, 73–83. <https://doi.org/10.1017/S0016672312000274>
- Wang, S., Meyer, E., McKay, J.K., Matz, M.V., 2012. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. Nature Methods 9, 808–810. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2023>
- Wiens, G.D., Palti, Y., Leeds, T.D., 2018. Three generations of selective breeding improved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) disease resistance against natural challenge with *Flavobacterium psychrophilum* during early life-stage rearing. Aquaculture 497, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.064>
- Wiens, G.D., Vallejo, R.L., Leeds, T.D., Palti, Y., Hadidi, S., Liu, S., Evenhuis, J.P., Welch, T.J., Iii, C.E.R., 2013. Assessment of Genetic Correlation between Bacterial Cold Water Disease Resistance and Spleen Index in a Domesticated Population of Rainbow Trout: Identification of QTL on Chromosome Omy19. PLOS ONE 8, e75749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075749>
- Wiklund, T., Dalsgaard, I., 2002. Survival of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum in vitro. Fish & Shellfish Immunology 12, 141–153. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0360>
- Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. J. Appl. Microbiol. 88, 299–307.
- Willems, O.W., Miller, S.P., Wood, B.J., 2013. Aspects of selection for feed efficiency in meat producing poultry. World's Poultry Science Journal 69, 77–88. <https://doi.org/10.1017/S004393391300007X>
- Wilson, M., Bengtén, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Pasquier, L.D., Warr, G.W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. PNAS 94, 4593–4597. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4593>
- Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nature Genetics 32, 569–577. <https://doi.org/10.1038/ng1202-569>
- Wright, J.R., 2002. Almost famous: E. Clark Noble, the common thread in the discovery of insulin and vinblastine. CMAJ 167, 1391–1396.

- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y.-A., Jørgensen, L. von G., Heinecke, R.D., Buchmann, K., LaPatra, S., Sunyer, J.O., 2013. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *PNAS* 110, 13097–13102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304319110>
- Yamagami, K., Hamazaki, T.S., Yasumasut, S., Masuda, K., Iuchi, I., 1992. Molecular and Cellular Basis of Formation, Hardening, and Breakdown of the Egg Envelope in Fish, in: Jeon, K.W., Friedlander, M. (Eds.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 51–92. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62050-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62050-1)
- Yamaguchi, T., Quillet, E., Boudinot, P., Fischer, U., 2018. What could be the mechanisms of immunological memory in fish? *Fish Shellfish Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.035>
- Yamamoto, S., Sanjyo, I., Sato, R., Kohara, M., Tahara, H., 1991. Estimation of the heritability for resistance to infectious haematopoietic necrosis in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi = Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 57, 1519–1522.
- Yáñez, J.M., Houston, R.D., Newman, S., 2014a. Genetics and genomics of disease resistance in salmonid species. *Front Genet* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00415>
- Yáñez, J.M., Naswa, S., Lopez, M., Bassini, L., Cabrejos, M., Gilbey, J., et al., 2014b. Development of a 200K SNP Array for Atlantic Salmon: Exploiting Across Contients Genetic Variation. Presented at the World Congress on genetics Applied to Livestock Production, Vancouver, Canda.
- Yáñez, J.M., Naswa, S., López, M.E., Bassini, L., Correa, K., Gilbey, J., Bernatchez, L., Norris, A., Neira, R., Lhorente, J.P., Schnable, P.S., Newman, S., Mileham, A., Deeb, N., Di Genova, A., Maass, A., 2016. Genomewide single nucleotide polymorphism discovery in Atlantic salmon (*Salmo salar*): validation in wild and farmed American and European populations. *Mol Ecol Resour* 16, 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12503>
- Yáñez, J.M., Smith, P.A., Manneschi, G., Guajardo, A., Rojas, M.E., Díaz, S., Valdés, M., Martínez, V.A., 2010. Unravelling Genetic Co-variation For Resistance And Tolerance Against Piscirickettsia salmonis Infection In Atlantic Salmon (*Salmo salar*), in: *Proceedings of the Ninth World Congress Genetics Applied Livestock Production*. Presented at the 9th World Congress Genetics Applied Livestock Productions, Leipzig, Germany, p. 4.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., Guigen, Y., 2012a. An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* 22, 1423–1428. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.045>
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guigen, Y., 2012b. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications* 6, 486–496. <https://doi.org/10.1111/eva.12032>
- Young, W.P., Wheeler, P.A., Coryell, V.H., Keim, P., Thorgaard, G.H., 1998. A Detailed Linkage Map of Rainbow Trout Produced Using Doubled Haploids 12.
- Zak, T., Deshev, R., Benet-Perlberg, A., Naor, A., Magen, I., Shapira, Y., Ponzoni, R.W., Hulata, G., 2014. Genetic improvement of Israeli blue (Jordan) tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), through selective breeding for harvest weight. *Aquaculture Research* 45, 546–557. <https://doi.org/10.1111/are.12072>
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827–835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>
- Zwollo, P., Hennessey, E., Moore, C., Marancik, D.P., Wiens, G.D., Epp, L., 2017. A BCWD-resistant line of rainbow trout exhibits higher abundance of IgT+ B cells and heavy chain tau transcripts compared to a susceptible line following challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Dev. Comp. Immunol.* 74, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.019>

Zwollo, P., Ray, J.C., Sestito, M., Kiernan, E., Wiens, G.D., Kaattari, S., StJacques, B., Epp, L., 2015. B cell signatures of BCWD-resistant and susceptible lines of rainbow trout: a shift towards more EBF-expressing progenitors and fewer mature B cells in resistant animals. *Dev. Comp. Immunol.* 48, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.018>

Valorisations des résultats

Article publié dans revue à comité de lecture

Fraslin C. et al., Quantitative trait loci for resistance to *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout: effect of the mode of infection and evidence of epistatic interactions. 2018, GSE

<https://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12711-018-0431-9>

Article accepté dans revue à comité de lecture : Fraslin et al., in press.

Fraslin C. et al., (in press) Rainbow trout resistance to bacterial cold water disease: two new QTL identified after a natural disease outbreak in a French farm. Submitted. Anim. Genet.

Posters

Fraslin C., et Quillet E., Séminaire des doctorants du département de Génétique Animale de l'INRA (Mai 2016).

Communications Orales

Fraslin C., Colloque de l'association des doctorants de l'INRA de Jouy-en-Josas, Février 2017 (Jouy-en-Josas, France). **Prix de la meilleure communication orale.**

Fraslin C., et Quillet E., Journée des doctorants de l'Ecole Doctorale ABIES, Avril 2017 (Paris, France). **Prix de la meilleure communication orale.**

Fraslin C., et Quillet E., Séminaire des doctorants du département de Génétique Animale de l'INRA, Mai 2017 (Rennes, France). **Prix de la meilleure communication orale.**

Fraslin C., et al., ddRADseq mapping of QTLs associated with resistance to bacterial cold water disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. European Aquaculture Society, October 2017 (Dubrovnik, Croatia).

Fraslin C., et al., Résultats préliminaires : Identification des marqueurs de résistance à la flavobactériose par GWAS. Journées techniques piscicoles du SYSAAF. Décembre 2017 (Rennes, France).

Fraslin C., et al., Identification de QTL de résistance à la flavobactériose dans les lignées isogéniques par bain ou injection. Journées techniques piscicoles du SYSAAF. Décembre 2017 (Rennes, France).

Fraslin C., et al., Genetic architecture of rainbow trout resistance to *Flavobacterium psychrophilum* according to the infection mode. 13th International Symposium of Genetics in Aquaculture, July 2018 (Cairns, Australia)

Fraslin C., et al., Rainbow trout resistance to *Flavobacterium psychrophilum*: a genome wide association study in a French population after a natural disease outbreak. AQUA 2018, August 2018 (Montpellier, France)

Annexes

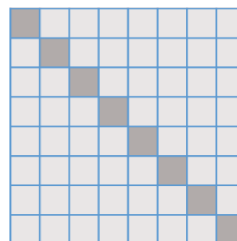
ANNEXE 1. Quelques-uns des différents plans de croisements en aquaculture/ trutticulture en France

adapté de (Berg and Henryon, 1998; Dupont-Nivet et al., 2002)

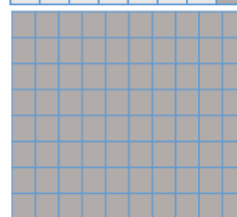
Famille de plein-germain : tous les descendants proviennent du même couple de parents

Famille de demi-germain : tous les descendants proviennent du croisement entre un mâle et plusieurs femelles (famille de père) ou entre une femelle et plusieurs mâles (famille de mère)

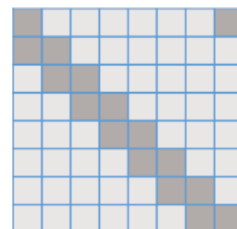
« Single pair mating » : ($m=f$) on croise un mâle unique avec une femelle unique et on obtient $m=f$ familles de pleins frères



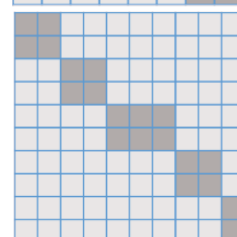
Factoriel complet : chaque mâle est individuellement reproduit avec chaque femelle et on obtient $m*f$ familles de pleins-frères



Design de Berg et Henryon (1998) : chaque mâle est reproduit avec deux femelles, chaque femelle est reproduite avec deux mâles



Factoriel incomplet : un sous-groupe des mâles est reproduit avec un sous-groupe de d femelles pour former $s*d$ familles (s peut être égale ou différent de d)



ANNEXE 2. Matériel et méthode de l'EXP 2

Protocoles infectieux

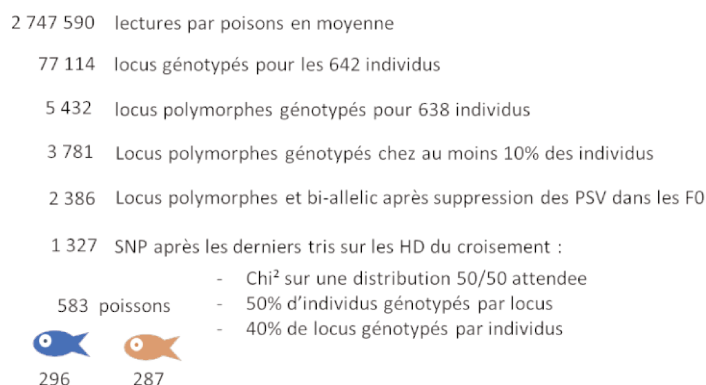
Pour la **balnéation**, 360 individus âgés de 4 mois post-fertilisation (pf) ont été marqués par Nonatag, pesés et distribués dans 6 aquarium. Une seconde pesée de contrôle a été réalisée 22 jours plus tard sur 340 poissons ayant survécu au marquage et conservé leur marque (identifiable). L'infection a eu lieu 20 jours plus tard : 300 poissons ont été infectés par immersion dans 4 aquarium de 4L, une solution contenant *F. psychrophilum* à une concentration moyenne de $1,6 \cdot 10^9$ CFU/mL a été versée dans chaque aquarium dont l'arrivée d'eau a été coupée. L'infection a duré 4h dans une eau maintenue à 10°C et une aération importante. Après 4h la circulation de l'eau a été rétablie, le volume des aquariums complété à 15L et les poissons sont restés dans leur aquarium jusqu'à la fin de l'expérience (32 jours). Pour l'**injection**, 358 individus (4 mois pf) ont été marqués par minitag, pesés et distribués dans 5 aquarium, 30 jours plus tard une seconde pesée de contrôle a été réalisée sur 328 individus survivants. L'infection a eu lieu 20 jours plus tard : 325 poissons ont été infectés par injection intramusculaire de 50µL d'une solution contenant *F. psychrophilum* à une concentration de $2 \cdot 10^2$ CFU/poissons pour les premiers poissons infectés et de $5 \cdot 10^2$ CFU/poisson pour les poissons infectés en dernier.

La mortalité a été relevée pendant 32 jours pour la balnéation et 28 jours pour l'injection. Les poissons morts pêchés deux fois par jours ont été identifiés, et un prélèvement de nageoire a été réalisé pour le génotypage. A la fin des deux protocoles, les poissons survivants ont été sacrifiés, identifiés, pesés et un prélèvement de nageoire a été réalisé.

Préparation des librairies et génotypage

L'ADN a été extrait, les librairies ddRADseq préparées (en une fois) et le génotypage réalisé de la même façon que pour l'EXP1 (§ 6.1.1). 642 poissons ont été séquencés (NextSeq 500, 82 bp pair-end reads) avec une couverture moyenne de 2 747 590 reads/poissons

Contrôles qualités sur les génotypes pour 296 poissons pour la balnéation et 287 pour l'injection



Construction de la carte génétique

Une carte génétique a été construite de la même façon que pour les EXP1 et 3a. Au final **761 marqueurs** avec une position unique sur la carte ont pu être exploités pour la détection de QTL.

ANNEXE 3. Ensemble des QTL détectés dans cette étude

Expérience	Protocole	Analyse	Omy	QTL	Significativité	Marqueur _1	Marqueur _2	95%_IC _1	95%_IC _2	Origine favorable	% Variance expliquée
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	1	1.1	1% Ch	31.21	31.21	11.16	22.32	G17	1.50%
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	1	1.2	5% Ch	67.48	72.89	15.79	83.81	B57	NA
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	1	1.2	1% Ch	68.06	61.27	22.32	77.99	A02	NA
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	1	1.3	5% Ch	77.64	77.64	9.00	77.64	A03	3.40%
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	2	2.1	5% Ch	4.00	4.00	4.00	32.90	B57	NA
EXP3a	BALNEATION	RESISTANCE	2	2.1	1% Ch	12.59	12.59	3.49	20.15	B57	NA
EXP3a	BALNEATION	STATUT	2	2.1	1% Ch	12.59	12.59	3.02	21.99	B57	6%
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	2	2.1	1% Ch	19.82	22.41	1.60	66.60	A36	NA
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	2	2.2	0.1% Ch	36.73	41.02	13.69	66.00	A03	2.30%
EXP1	INJECTION	ENDURANCE	2	2.2	1% Ch	36.73	41.02	20.90	78.87	A03	3.40%
EXP1	INJECTION	PORTAGE	2	2.2	5% Ch	41.02	42.53	0.00	83.65	G17	NA
EXP1	BALNEATION	RESISTANCE	2	2.2	1% Ch	50.79	52.74	16.90	78.87	A03	3.40%
EXP1	BALNEATION	STATUT	2	2.2	1% Ch	50.79	52.74	16.90	78.87	A03	3.40%
EXP2	INJECTION	ENDURANCE	3	3.1	1% Ch	19.87	21.45	14.12	80.29	A36	1.30%
EXP2	INJECTION	DDM	3	3.1	1% Ch	29.19	32.80	67.53	80.29	A36	2.60%
EXP2	INJECTION	ENDURANCE	3	3.2	1% Ch	54.11	52.99	48.18	67.53	A02	7%
EXP2	INJECTION	DDM	3	3.2	1% Ch	54.11	52.99	48.18	67.53	A02	7%
EXP3a	BALNEATION	RESISTANCE	3	3.2	1% G	56.47	57.36	54.41	62.21	AP2	NA
EXP3a	BALNEATION	STATUT	3	3.2	1% G	56.47	57.36	56.18	62.21	AP2	18%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	3	3.2	1% G	56.47	57.36	54.41	62.21	AP2	NA
EXP3a	BALNEATION	STATUT	3	3.2	1% G	56.47	57.36	54.41	62.01	AP2	NA
EXP3a	INJECTION	RESISTANCE	3	3.2	5% G	56.47	57.36	50.15	64.17	AP2	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	3	3.2	1% G	56.47	57.36	51.07	63.20	AP2	14%
EXP3a	INJECTION	STATUT	3	3.2	1% G	56.47	57.36	56.47	60.83	AP2	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	3	3.2	0.1% Ch	56.47	57.36	34.50	79.44	AP2	NA
EXP3b	INJECTION	CHARGE	3	3.2	5% G	56.50	57.40	56.50	63.20	AP2	NA
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	3	3.2	0.1% Ch	60.01	59.69	48.18	70.77	A02	NA
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	3	3.2	5% G	61.40	63.10	54.70	71.10	AP2	NA
EXP4	Naturel	DDM	3	3.2	NS	64.97		62.46	65.84	NA	1.6% G
EXP2	BALNEATION	ENDURANCE	3	3.3	1% Ch	72.60	72.60	52.99	80.29	A02	6.30%
EXP3b	INJECTION	eQTL c3-3	3	3.3	5% Ch	79.40	79.40	10.80	79.40	B57	20.44%
EXP1	INJECTION	ENDURANCE	4	4	1% Ch	41.15	47.57	21.03	60.79	G17	5%
EXP1	BALNEATION	STATUT	6	6	0.1% Ch	53.62	56.57	3.04	69.79	G17	14.50%
EXP1	BALNEATION	RESISTANCE	6	6	1% G	57.44	61.78	11.31	69.79	G17	8.20%
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	7	7.1	5% Ch	6.35	6.35	6.35	71.29	A03	4.10%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	7	7.1	1% Ch	8.43	8.56	5.70	70.49	AP2/B57	NA
EXP4	Naturel	DDM	7	7.2	NS	16.13		13.40	20.09	NA	1.2% G
EXP2	BALNEATION	RESILIENCE	7	7.2	5% Ch	18.55	20.83	11.44	37.16	A02	5.30%
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	7	7.2	5% G	19.80	22.50	19.80	39.30	AP2	NA

EXP3a	BALNEATION	STATUT	7	7.3	1% Ch	34.42	35.35	15.69	50.99	B57/AP2	NA
EXP4	Naturel	STATUT	7	7.3	NS	40.23		34.89	41.91	NA	1.9% G
EXP4	Naturel	DDM	7	7.3	5% Ch	41.61		37.86	41.72	NA	1.1% G
EXP4	Naturel	STATUT	7	7.4		45.14		43.91	47.44	NA	1.0% G
EXP2	BALNEATION	STATUT	8	8	1% Ch	72.18	73.83	42.54	81.73	A36/A02	NA
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	8	8	1% Ch	75.86	77.45	29.72	79.11	G17	5.80%
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	9	9	1% Ch	32.81	32.92	18.10	60.34	A03	4.40%
EXP1	INJECTION	PORTAGE	10	10.1	5% Ch	3.02	3.02	3.02	60.13	A03	NA
EXP3a	INJECTION	RESISTANCE	10	10.2	1% Ch	31.28	31.28	9.47	63.55	AP2	NA
EXP4	Naturel	DDM	10	10.2	NS	42.32		39.69	52.17	NA	1.6% G
EXP4	Naturel	STATUT	10	10.2	NS	42.32		39.69	46.35	NA	0.9% G
EXP2	INJECTION	ENDURANCE	10	10.3	1% Ch	57.31	60.13	41.24	60.32	A36	0.90%
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	10	10.3	5% Ch	60.13	60.32	7.61	60.32	A36	NA
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	11	11	5% Ch	19.07	19.28	6.34	61.16	A03	2.60%
EXP1	INJECTION	STATUT	12	12.1	1% Ch	8.76	8.76	8.76	71.02	A03	5.90%
EXP1	BALNEATION	RESISTANCE	12	12.2	1% Ch	39.08	40.24	8.76	55.70	A03	4.90%
EXP1	BALNEATION	STATUT	12	12.2	1% Ch	39.08	40.24	23.37	51.04	A03	6.40%
EXP2	BALNEATION	RESILIENCE	12	12.2	1% Ch	43.36	47.81	22.77	67.01	A36	10.50%
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	12	12.2	1% Ch	43.36	47.81	18.04	80.95	A02	NA
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	12	12.3	5% Ch	63.73	68.64	38.57	80.76	G17	4.80%
EXP1	INJECTION	STATUT	13	13.1	1% Ch	15.01	15.01	15.01	35.18	A03	3.50%
EXP3b	INJECTION	CHARGE	13	13.2	0.1% Ch	31.60	32.70	19.50	40.00	AP2	NA
EXP1	BALNEATION	RESISTANCE	14	14	5% G	7.98	7.98	7.98	16.98	A03	4.80%
EXP1	BALNEATION	STATUT	14	14	1% Ch	7.98	7.98	7.98	30.09	A03	4.80%
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	15	15.1	5% Ch	4.10	11.20	5.40	61.70	AP2	NA
EXP3b	INJECTION	eQTL c3	15	15.2	1% Ch	13.00	13.70	5.70	26.30	B57	22.91%
EXP3a	INJECTION	ENDURANCE	15	15.2	1% Ch	16.06	17.15	5.70	48.68	AP2	NA
EXP2	BALNEATION	ENDURANCE	16	16	0.1% Ch	0.00	3.78	3.78	11.13	A36	7.60%
EXP3a	INJECTION	STATUT	17	17.1	1% G	15.71	15.78	9.63	28.10	AP2	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	17	17.1	5% G	15.78	16.68	14.18	38.96	AP2	NA
EXP3b	INJECTION	RESISTANCE	17	17.1	5% G	17.60	21.10	17.60	56.90	AP2	NA
EXP2	BALNEATION	ENDURANCE	17	17.1	0.1% Ch	18.00	17.32	15.47	42.39	A02	7.20%
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	17	17.1	0.1% Ch	18.00	17.32	15.47	42.39	A02	NA
EXP2	BALNEATION	RESISTANCE	17	17.1	1% G	19.98	20.86	15.47	35.11	A02	5.10%
EXP2	BALNEATION	STATUT	17	17.1	1% G	19.98	20.86	14.79	39.47	A02	5.10%
EXP2	INJECTION	ENDURANCE	17	17.1	1% G	19.98	20.86	8.38	38.26	A02	4.30%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	17	17.1	1% Ch	20.19	20.55	9.63	71.68	AP2	NA
EXP3b	INJECTION	eQTL c3	17	17.1	1% Ch	20.20	20.50	14.00	40.30	B57	21.20%
EXP2	BALNEATION	RESILIENCE	17	17.2	5% Ch	38.26	39.47	15.47	71.16	A02	2.20%
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	17	17.3	1% Ch	52.41	54.72	13.47	67.06	G17	2.60%
EXP4	Naturel	STATUT	17	17.3	NS	57.19		56.41	64.59	NA	2.8% G
EXP4	Naturel	DDM	17	17.3	5% Ch	59.33		56.41	60.99	NA	2.1% G

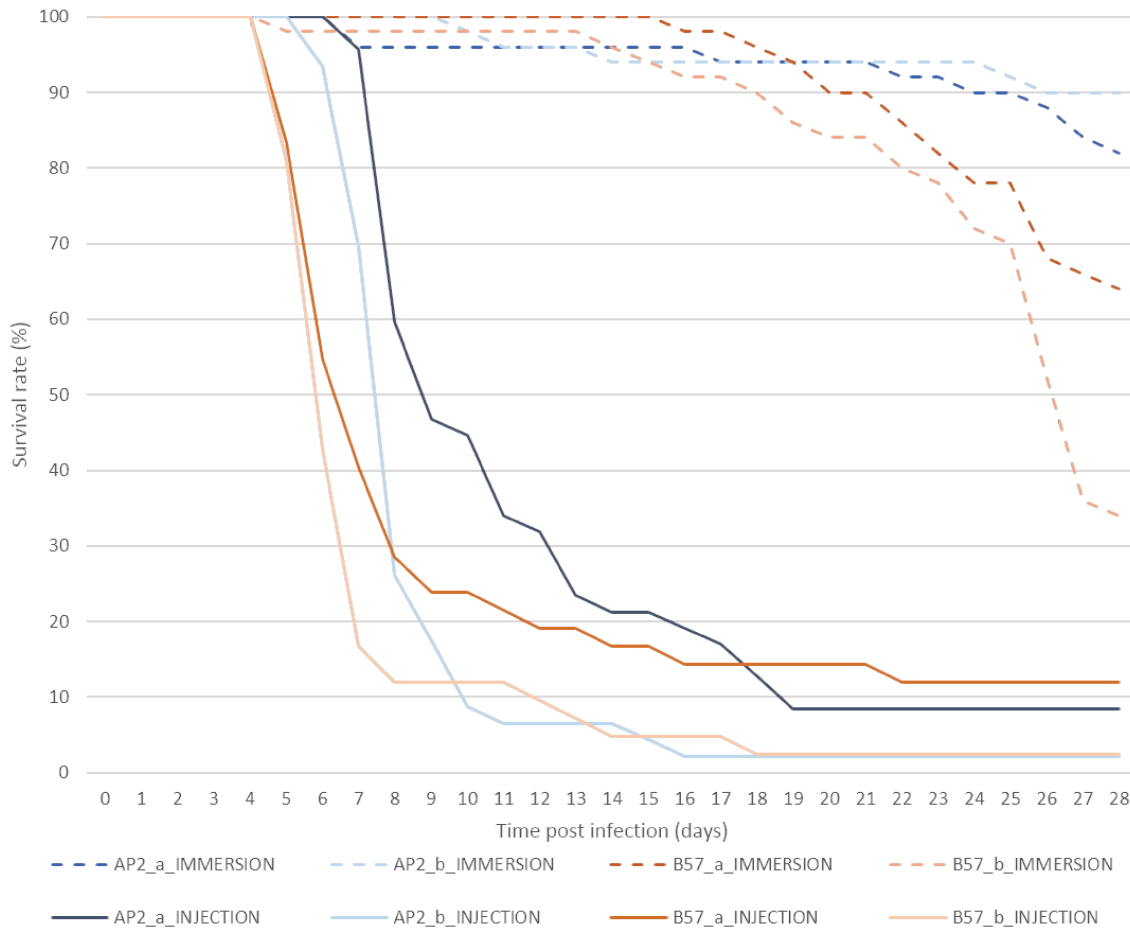
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	18	18	1% Ch	22.42	26.30	9.68	51.23	A02	NA
EXP2	BALNEATION	STATUT	18	18	5% Ch	31.10	32.74	5.73	53.23	A02	NA
EXP2	BALNEATION	RESISTANCE	18	18	5% Ch	31.10	32.74	9.68	47.99	A02	1.80%
EXP2	INJECTION	ENDURANCE	18	18	1% Ch	32.74	32.74	9.68	47.99	A02	1.10%
EXP3b	INJECTION	eQTL c3-3	19	19.1	5% Ch	16.10	20.70	78.80	25.00	AP2	21.97%
EXP3b	INJECTION	eQTL c3	19	19.1	5% Ch	24.60	24.70	7.80	55.20	AP2	14.13%
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	19	19.2	1% Ch	37.02	40.31	18.74	40.31	G17	7.00%
EXP2	BALNEATION	STATUT	20	20.1	0.1% Ch	5.53	8.65	6.18	21.61	A02/A36	NA
EXP1	INJECTION	PORTAGE	20	20.2	5% Ch	23.69		14.48	29.52	A03	NA
EXP3a	BALNEATION	ENDURANCE	20	20.2	1% Ch	27.82	29.46	24.88	31.83	B57	NA
EXP1	INJECTION	ENDURANCE	21	21.1	1% Ch	13.99	23.20	12.54	27.54	G17	4.20%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	21	21.2	0.1% Ch	41.66	41.94	30.99	49.25	B57	NA
EXP3a	BALNEATION	RESISTANCE	21	21.2	1% Ch	44.81	44.48	30.37	49.25	B57	NA
EXP3a	BALNEATION	STATUT	21	21.2	1% Ch	44.81	44.48	30.37	49.25	B57	7%
EXP1	INJECTION	RESILIENCE	24	24.1	5% Ch	8.88	8.88	8.88	30.07	G17	7.40%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	24	24.2	1% Ch	26.10	28.71	8.83	39.63	B57/AP2	NA
EXP1	BALNEATION	RESILIENCE	24	24.3	0.1% Ch	37.56	39.34	18.40	39.34	A03	19%
EXP1	INJECTION	RESISTANCE	25	25a	1% Ch	6.79	9.91	6.79	26.77	G17	9.80%
EXP1	BALNEATION	ENDURANCE	25	25a	5% G	6.79	13.29	6.79	21.05	G17	19%
EXP2	BALNEATION	STATUT	25	25a	5% Ch	7.09	7.09	0.00	29.15	A02	2.30%
EXP2	BALNEATION	STATUT	25	25b	5% Ch	7.09		60.90	80.55	A02	NA
EXP2	BALNEATION	STATUT	25	25a	5% Ch	9.91	11.73	6.79	31.29	A36	NA
EXP1	INJECTION	ENDURANCE	25	25a	1% G	9.91	13.29	6.79	26.77	G17	7.20%
EXP1	BALNEATION	RESISTANCE	25	25a	0.1% Ch	14.62	19.18	6.79	29.92	G17	6.30%
EXP1	BALNEATION	STATUT	25	25a	1% Ch	14.62	19.18	6.79	29.92	G17	5.60%
EXP3a	BALNEATION	STATUT	25	25a	1% Ch	14.74	14.91	4.18	28.57	B57	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	25	25a	1% Ch	20.96	20.96	4.18	26.05	AP2	7%
EXP3a	INJECTION	STATUT	25	25a	1% G	20.96	20.96	18.29	23.67	B57	NA
EXP3a	INJECTION	RESISTANCE	26	26	1% Ch	11.28	14.62	3.29	19.57	AP2	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	26	26	1% Ch	11.28	14.62	3.29	14.62	AP2	NA
EXP3a	BALNEATION	ENDURANCE	27	27	0.1% Ch	11.84	12.13	6.90	29.81	B57	NA
EXP2	BALNEATION	STATUT	28	28	5% G	17.56	32.42	4.49	39.45	A36/A02	NA
EXP2	BALNEATION	RESISTANCE	28	28	5% Ch	17.56	32.42	4.79	39.45	A36	1.80%
EXP2	BALNEATION	STATUT	28	28	5% Ch	17.56	32.42	4.49	39.45	A36	1.80%
EXP2	INJECTION	RESISTANCE	28	28	1% Ch	17.56	32.42	4.69	39.45	A36	NA
EXP3a	INJECTION	STATUT	29	29.1	1% Ch	16.18	16.79	9.45	37.32	AP2	NA
EXP1	INJECTION	RESILIENCE	29	29.1	5% Ch	17.70	21.67	1.60	40.13	G17	8.20%
EXP3a	INJECTION	ENDURANCE	29	29.2	1% Ch	32.26	33.06	12.38	37.32	AP2	11%
EXP3a	INJECTION	STATUT	29	29.2	1% G	33.06	35.03	17.65	37.32	AP2	12%
EXP3a	INJECTION	RESISTANCE	29	29.2	1% G	33.06	35.03	17.83	37.32	AP2	NA

% de variance expliquée : génétique dans les cas où un G est mentionné à côté de la valeur, phénotypique en l'absence de ce G

ANNEXE 4. ADDITIONAL FILES de l'article présenté en 6.2.1

Additional file 1 Figure S1

Title: Cumulative survival curves of fish from AP2 and B57 grandparental isogenic lines infected with *Flavobacterium psychrophilum*



Description:

Fish were infected with the *F. psychrophilum* FRGDSA 1882/11 strain and mortality was recorded for 29 days post-infection. For injection protocol (-), 100 fish (average weight of 10.27 g for AP2 and 12.16 g for B57) were infected with (a): 450 CFU / mL (replicate of 50 fish) or (b): 300-550 CFU/mL (replicate of 50 fish). For the immersion protocol (- - - -), 100 fish (average weight of 1.14 g for AP2 fish and 0.98 g for B57 fish) were infected by immersion for 4 h in a bacterial suspension (approximately 3.10^7 CFU/mL) in static water maintained at 10°C with vigorous aeration, in two replicates of 50 fish each (a) and (b).

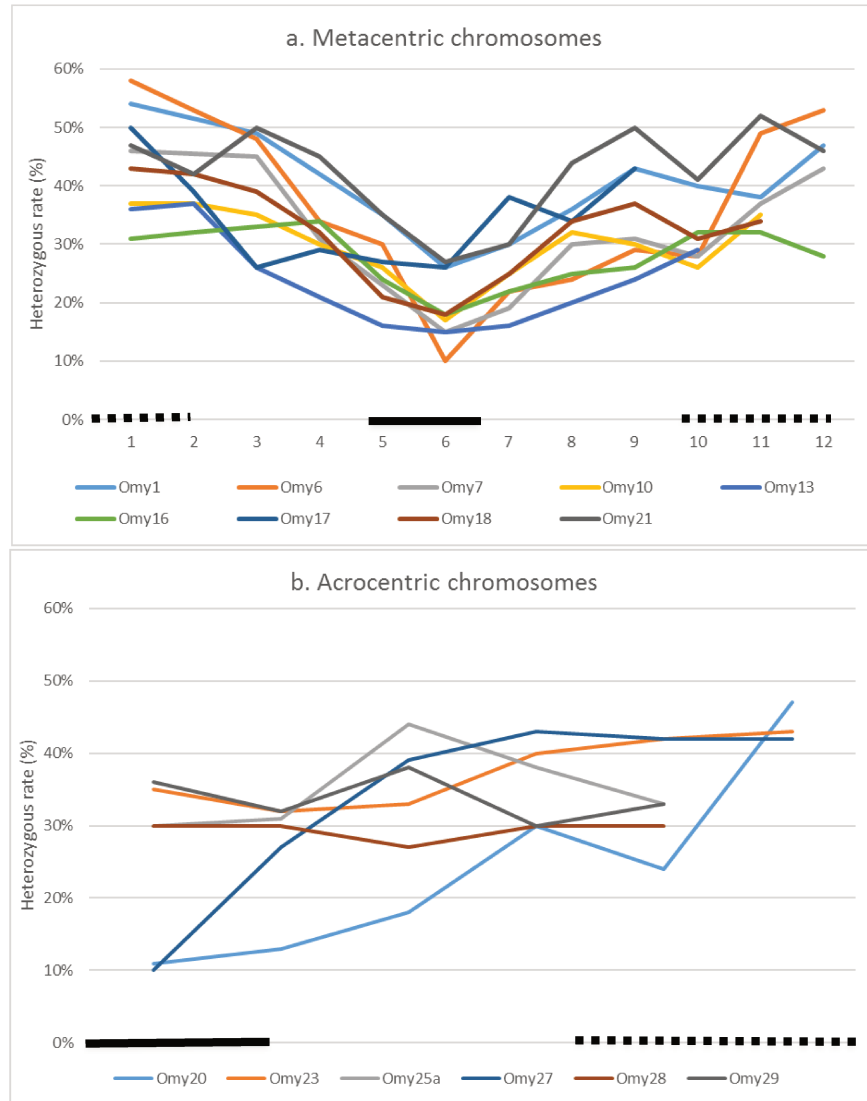
Additional file 2 Table S1 (non incluse)

Format: .xlsx

Title: List of putative duplicated loci: heterozygous RAD SNPs detected in at least two doubled haploid control individuals (DH controls), each from different rainbow trout isogenic lines.

Additional file 3 Figure S2

Title: Evolution of rate of hererozygosity along chromosomes (mean values for the 24 individuals with an overall rate of heterozygosity higher than 1%).



Description:

Metacentric chromosomes (a): under the hypothesis of spontaneous retention of the second polar body during meiosis, the rate of heterozygosity is expected to be lower around the centromere (-) than in telomeric regions (- - -).

Acrocentric chromosomes (b): under the hypothesis of spontaneous retention of the second polar body during meiosis, the heterozygous rate is expected to increase along the chromosome from the centromeric region to the telomere. Data are illustrated for 15 chromosomes.

Additional file 2 Table S2

Title: Overall survival and weight of fish of the QTL family at the end of the immersion and injection infectious challenges.

	Nb of fish infected	Body weight at challenge (g)	Survival rate (%)	Body weight of surviving fish (g)
IMMERSION				
Aq1	75	4.6	80	10.5
Aq2	75	4.9	77	10.5
Aq3	75	4.7	74	10.3
Mean	75	4.7	77	10.4
INJECTION				
Aq1	50	23.7	64	29.9
Aq2	50	20.8	38	28.8
Aq3	47	20.2	54	27.4
Mean	49	21.8	52	28.7

Data were recorded for 49 and 35 days for the immersion and injection challenges, respectively.

Additional file 2 Table S3 (non include)

Format: .xlsx

Title: Genetic linkage map constructed with the F2 progeny.

Description: The marker at one position used in the QTL detection is shown in red bold.

Additional file 2 Table S4 (non include)

Format: .xlsx

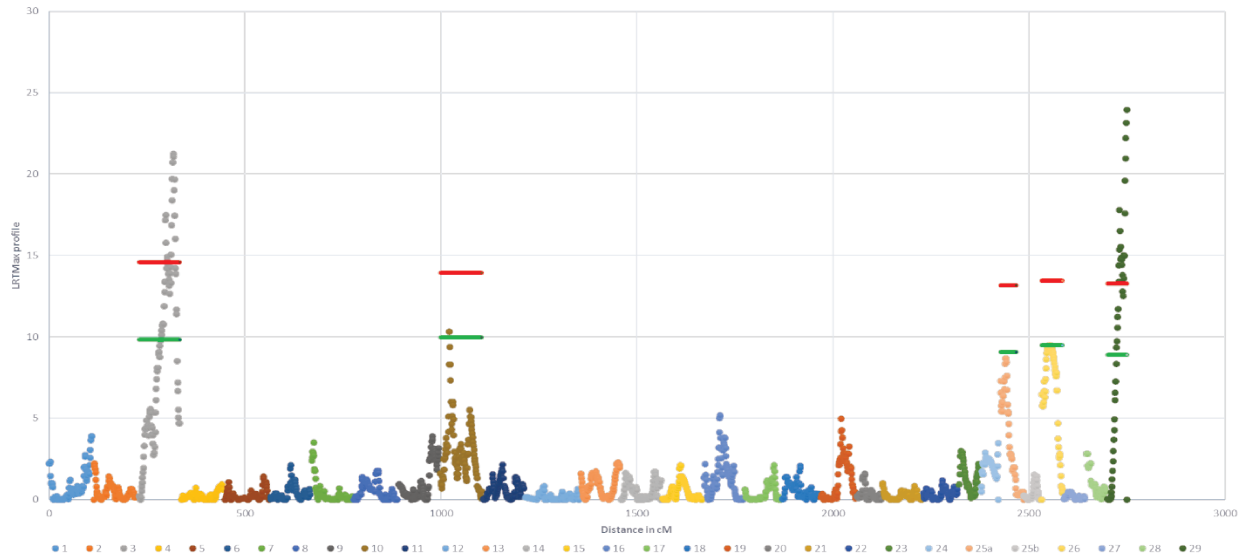
Title: SNP allele and position for the 2130 markers used in the QTL detection.

Description: SNP position is given in bp from the first bp of the read.

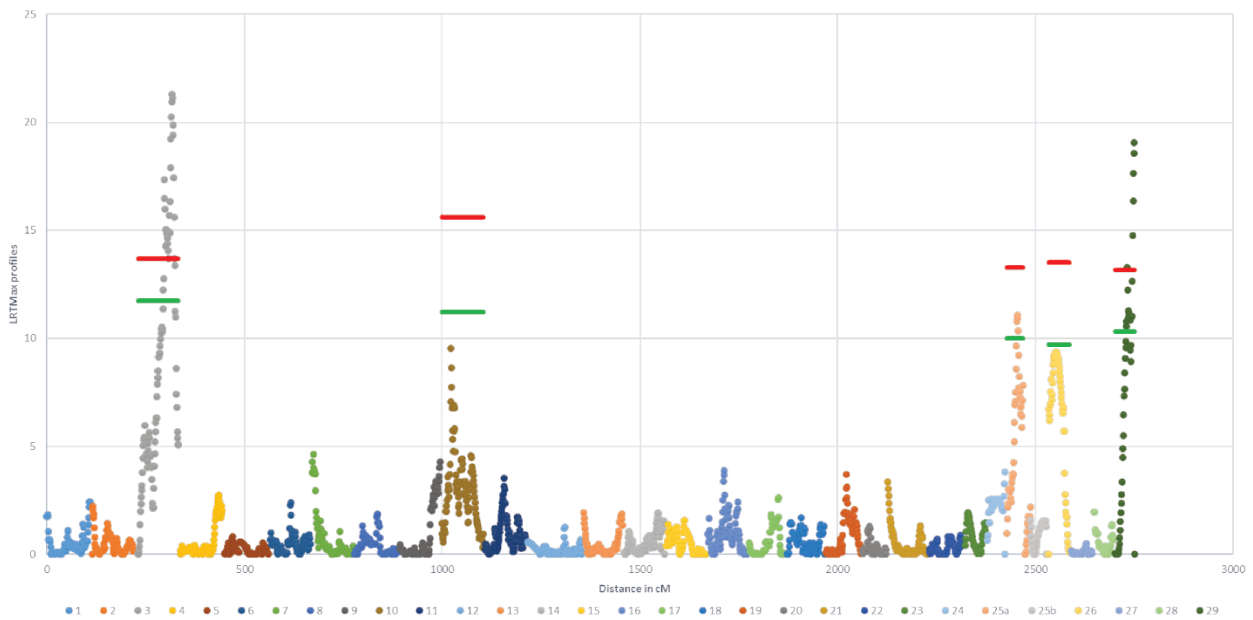
Additional file 4 Figure S3

Title: Graphical compilation of likelihood ratio profiles calculated for each chromosome (1-cM interval) for the two resistance traits after the two modes of infection challenges.

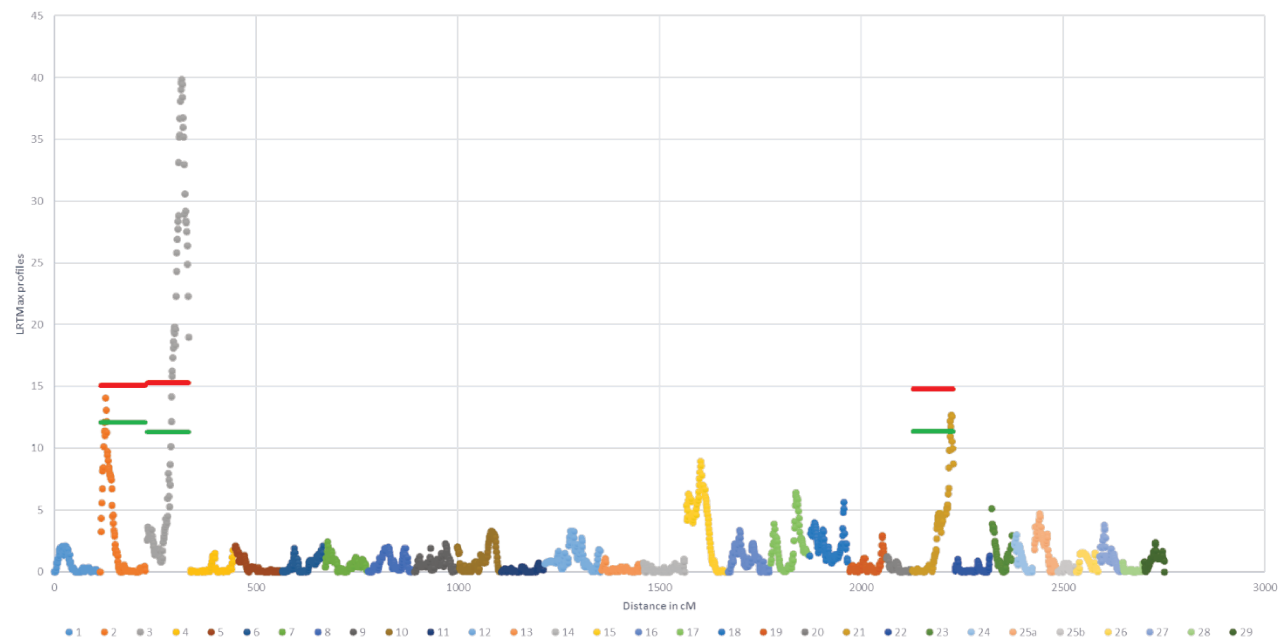
Description: (a) RESISTANCE and (b) STATUS after injection challenge, (c) RESISTANCE and (d) STATUS after immersion challenge. For each chromosome, horizontal bars indicate the corresponding significance thresholds (green : $P \leq 0.01$ at the chromosome-wide level; red: $P \leq 0.05$ at the genome-wide level).



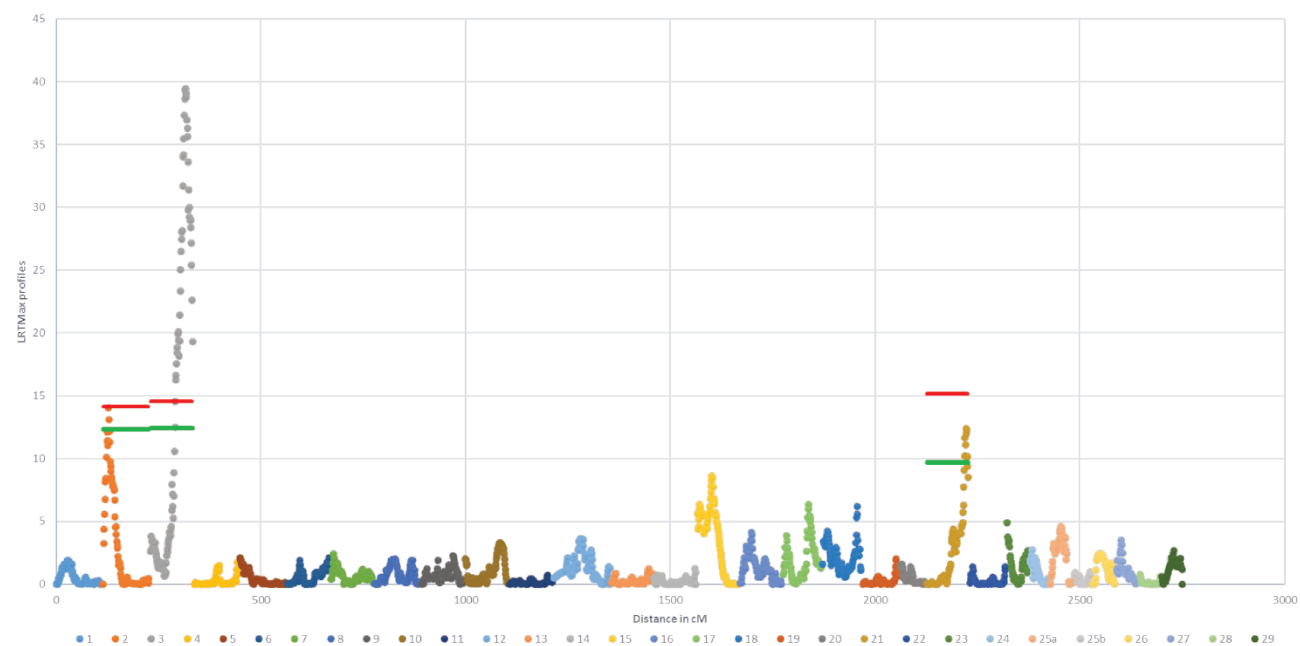
a



b



C

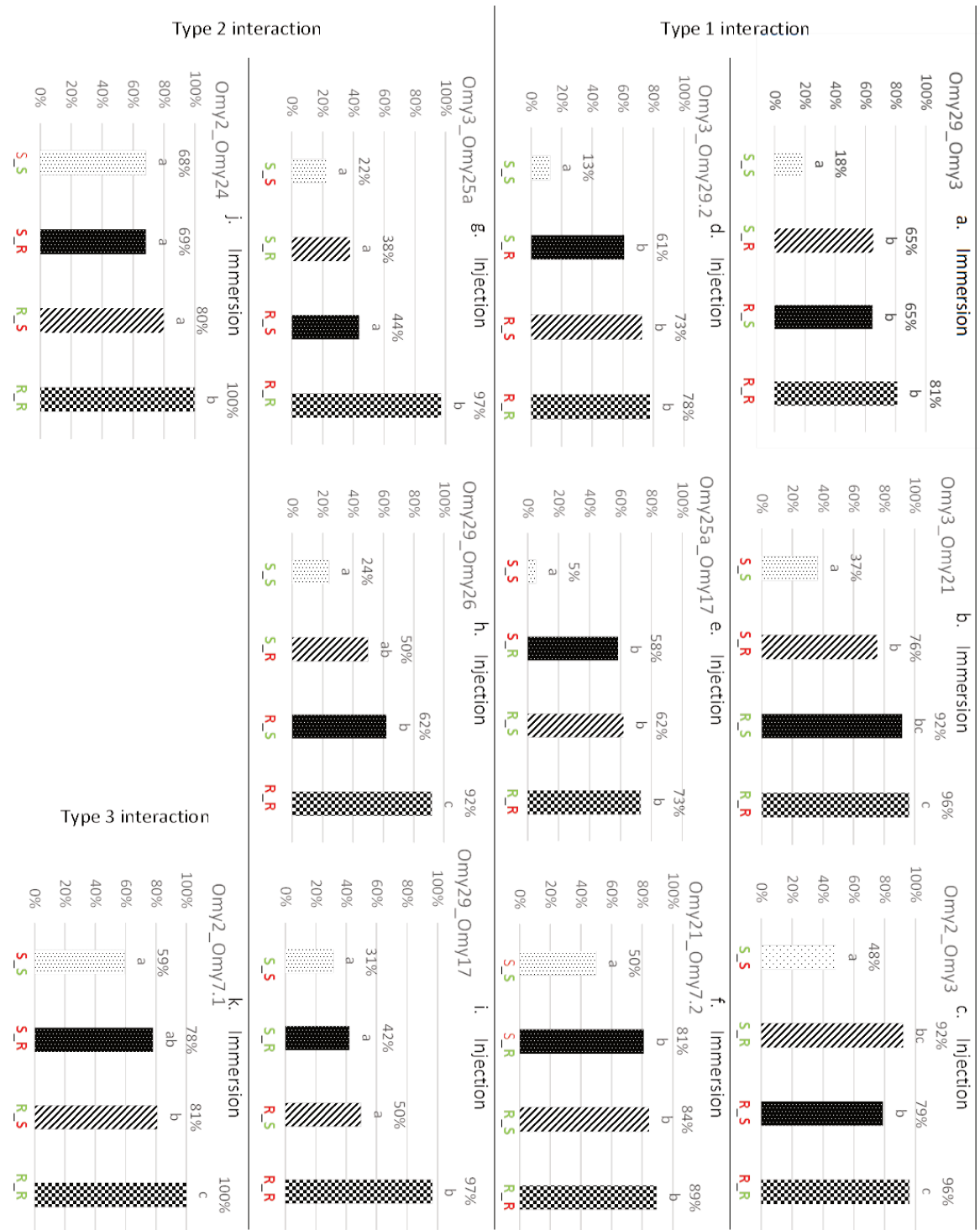


d

Additional File 5 Figure S4

Title: Final survival rate according to the allele origin at pairs of epistatic QTL for resistance to infection with *F. psychrophilum*.

Description: For each figure, abscissa corresponds to the combination of favourable (R) and unfavourable (S) alleles with the grandparent origin in colour (green for B57 and red for AP2) for each pair of epistatic QTL OmyA_OmyB. Survival rates (in ordinate) with similar letters are not significantly different (Fisher exact test $P \leq 0.05$ and Benjamini-Hochberg correction for multiple testing of stat package from R software).



Additional file 2 Table S5

Title: All significant ($P \leq 0.01$ at the chromosome wide level) detected QTL, error-I rejection threshold at chromosome and genome-wide levels calculated for each QTL, flanking markers at each QTL, with name and position on the linkage map (cM).

QTL	Analysis	Model		LRTmax	Significance	Position (cM)	start	stop	95% CI	start	stop
INJECTION											
Omy3	COX	<i>M1</i>	RESISTANCE	21.24	5% genome	89.2	56 465 056	57 364 295	68-97	50 145 203	64 170 632
Omy10	COX	<i>M1</i>	RESISTANCE	10.31	1% chromosome	23	31 278 100	31 278 194	04-93	9 388 634	63 548 054
Omy26	COX	<i>M1</i>	RESISTANCE	9.49	1% chromosome	20.9	11 809 900	14 624 715	01-41	3 286 969	19 567 325
Omy29	COX	<i>M1</i>	RESISTANCE	23.94	1% genome	48	33 063 490	35 029 190	26-49	17 825 675	37 322 574
Omy3	BINARY	<i>M1</i>	STATUS	21.28	1% genome	89.2	56 465 056	57 364 201	68-95	51 072 868	63 204 481
Omy25a	BINARY	<i>M1</i>	STATUS	11.06	1% chromosome	14	20 959 612	20 959 706	0-27	4 179 239	26 054 893
Omy29	BINARY	<i>M1</i>	STATUS	19.06	1% genome	48	33 063 396	35 029 190	25-49	17 654 434	37 322 574
Omy25a_{Omy3}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	25.49	1% genome	14	20 959 612	20 959 706	10-18	18 293 616	23 997 371
Omy29.2_{Omy3}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	14.85	1% chromosome	23	16 180 091	16 787 919	08-49	9 452 397	37 322 574
Omy3_{Omy25a}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	35.35	1% genome	89	56 465 056	57 364 295	86-92	56 465 150	60 833 798
Omy17_{Omy25a}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	15.85	5% genome	73	15 782 827	16 678 495	53-79	14 182 725	38 961 516
Omy3_{Omy29}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	15.27	0.1% chromosome	89	56 465 056	57 364 295	46-105	34 499 584	79 440 141
Omy17_{Omy29}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	18.29	1% genome	74	15 713 876	15 782 921	58-92	9 634 994	28 102 365
Omy26_{Omy29}	BINARY	<i>M2</i>	STATUS	11.75	1% chromosome	18	11 809 900	14 624 715	0-34	14 624 621	3 287 063

QTL	Mdel	Model	Trait	LRTmax	Significance	Position (cM)	start	stop	95% CI	start	stop
Immersion											
Omy2	COX	M1	RESISTANCE	14.04	1% chromosome	14.5	12 591 499	12 591 593	03-32	3 491 389	20 146 399
Omy3	COX	M1	RESISTANCE	39.87	1% genome	88.2	56 465 056	57 364 295	82-93	54 412 439	62 210 653
Omy21	COX	M1	RESISTANCE	12.65	1% chromosome	99	44 810 587	44 484 500	64-103	30 373 476	49 245 273
Omy2	BINARY	M1	STATUS	13.17	1% chromosome	14.5	12 591 499	12 591 593	02-36	3 023 488	21 986 126
Omy3	BINARY	M1	STATUS	39.47	1% genome	88.2	56 465 056	57 364 295	81-93	56 178 086	62 210 653
Omy21	BINARY	M1	STATUS	12.36	1% chromosome	99.5	44 810 587	44 484 500	63-104	30 373 476	49 245 273
Omy3Omy2	BINARY	M2	STATUS	35.66	1% genome	87	56 465 056	57 364 295	81-94	54 412 439	62 210 653
Omy7.1Omy2	BINARY	M2	STATUS	16.42	1% chromosome	61	34 423 571	35 347 036	32-87	15 686 817	50 989 709
Omy24Omy2	BINARY	M2	STATUS	12.71	1% chromosome	4	26 099 981	28 714 277	0-19	8 827 911	39 632 581
Omy17Omy3	BINARY	M2	STATUS	13.97	1% chromosome	61	20 188 896	20 547 393	0-92	9 634 994	71 677 141
Omy21Omy3	BINARY	M2	STATUS	15.35	0.1% chromosome	97	41 657 027	41 940 231	63-104	30 989 990	49 245 273
Omy25aOmy3	BINARY	M2	STATUS	10.41	1% chromosome	4	14 736 784	14 910 706	0-35	4 179 239	28 574 499
Omy3Omy21	BINARY	M2	STATUS	40.73	1% genome	87	56 465 056	57 364 295	52-93	54 412 439	62 012 452
Omy7.2Omy21	BINARY	M2	STATUS	11.48	1% chromosome	7	8 425 313	8 563 302	0-103	5 696 080	70 488 054
QTL	MODEL	Model	TRAIT	LRTmax	Significance	Position (cM)	start	stop	95% CI	start	stop
injection											
Omy15	Gaussian	M1	ENDURANCE	10.99	1% chromosome	11	16 062 106	17 152 475	0-78	841 533	48 546 998
Omy29	Gaussian	M1	ENDURANCE	9.9	1% chromosome	43	32 264 784	33 063 490	18-49	12 934 703	37 322 480
immersion											
Omy20	Gaussian	M1	ENDURANCE	12.54	1% chromosome	28	27 223 846	29 455 306	05-37	24 880 342	32 020 041
Omy27	Gaussian	M1	ENDURANCE	13.56	0.1% chromosome	26	11 842 149	12 118 315	10-47	6 900 755	29 806 923

Additional File 2 Table S6

Format: .xlsx

Title: List of 49 up- and down- regulated genes after *F. psychrophilum* infection in two rainbow trout isogenic lines in [46] located in the QTL associated with resistance traits identified in this study.

OMY	Position in regard to QTL	Start	Stop	Locus	Protein name	FC B57_s	FC in A3_r
2	inside Omy2-QTL 95% CI	14 213 610	14 223 283	LOC110486049	metalloreductase STEAP4-like	9.91	7.78
2	inside Omy2-QTL 95% CI	17 896 158	17 897 333	LOC110487583	uncharacterized protein LOC110487583 isoform X2	3.02	2.50
2	inside Omy2-QTL 95% CI	17 915 590	17 916 774	LOC110487583	uncharacterized protein LOC110487583 isoform X1	3.02	2.50
2	inside Omy2-QTL 95% CI	20 625 025	20 625 631	LOC100653444	hepcidin-like	13.94	7.65
2	close to Omy2-QTL 95% CI	22 544 790	22 549 788	LOC110489027	complement C3	5.41	10.40
2	close to Omy2-QTL 95% CI	24 109 452	24 111 363	LOC100301666	C type lectin receptor B	11.01	9.33
2	close to Omy2-QTL 95% CI	24 113 693	24 119 047	LOC110489499	C-type lectin domain family 4 member E-like	19.30	5.21
3	close to Omy3-QTL _{Omy29} 95% CI	34 175 002	34 177 984	cd209	CD209 molecule	9.96	6.57
3	inside Omy3-QTL 95% CI	52 194 811	52 203 522	LOC110520091	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like	5.82	4.85
3	inside Omy3-QTL 95% CI	52 499 596	52 501 646	LOC110520104	cytochrome b reductase 1	3.09	1.11
3	close to Omy3-QTL 95% CI	65 165 042	65 170 305	il-1rii	interleukin-1 receptor type II precursor	10.43	3.42
7	inside Omy7.2-QTL 95% CI	11 444 494	11 446 080	LOC110527417	retinol dehydrogenase 7-like	0.25	1.06
7	inside Omy7.2-QTL 95% CI	11 472 575	11 478 401	LOC100136260	cathepsin K isoform X1	0.25	0.87
7	inside Omy7.2-QTL 95% CI	15 615 959	15 616 665	LOC100136615	differentially regulated trout protein 1 precursor	33.97	50.52
7	inside Omy7.2-QTL or Omy7.1-QTL 95% CI	23 549 415	23 549 650	LOC110527635	microsomal glutathione S-transferase 1-like	0.27	0.80
7	inside Omy7.2-QTL or Omy7.1-QTL 95% CI	26 973 070	26 981 677	LOC110527669	syndecan-4-like	3.63	3.68
7	Omy7.1-QTL 95% CI	34 388 993	34 390 704	LOC110527800	retinoid-binding protein 7-like	2.00	7.65
7	close to Omy7.1-QTL 95% CI	52 062 146	52 065 523	LOC110528153	PAK4-inhibitor inka1-like	0.20	0.46
10	inside Omy10-QTL 95% CI	15 102 772	15 119 319	LOC110533447	neutrophil cytosolic factor 1-like	2.58	3.59
10	inside Omy10-QTL 95% CI	23 081 497	23 093 053	LOC110533570	cell surface glycoprotein MUC18-like	5.81	7.06
10	inside Omy10-QTL 95% CI	23 165 199	23 196 549	LOC110533575	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase	3.62	2.36
10	inside Omy10-QTL 95% CI	23 198 901	23 202 280	orai2	protein orai-2 isoform X2	7.02	1.13
10	inside Omy10-QTL 95% CI	29 620 150	29 624 540	LOC100136017	collagenase 3	6.75	10.46
10	inside Omy10-QTL 95% CI	42 222 917	42 224 811	LOC110534087	diamine acetyltransferase 1-like	12.96	13.59
10	inside Omy10-QTL 95% CI	48 954 856	48 981 979	LOC110534268	TBC1 domain family member 2A-like isoform X1	0.17	0.42
15	inside Omy15-QTL 95% CI	8 724 430	8 742 215	LOC110489589	uncharacterized protein LOC110489589	0.32	0.50
15	inside Omy15-QTL 95% CI	9 904 071	9 910 119	LOC110489602	protein disulfide-isomerase A4-like	2.35	3.46
15	inside Omy15-QTL 95% CI	19 648 405	19 660 295	LOC110489812	retinol dehydrogenase 12-like	3.43	2.55

15	inside 95% CI	Omy15-QTL	21 455 017	21 459 741	LOC100135826	carbonic anhydrase 1	0.21	0.22
17	inside 95% CI	Omy17-QTL	13 189 787	13 198 153	LOC110493589	protein LTV1 homolog isoform X1	3.81	5.19
17	inside 95% CI	Omy17-QTL	14 321 379	14 321 932	vig-2	VIG-2 protein	3.72	1.79
17	inside 95% CI	Omy17-QTL	18 411 584	18 412 373	iip2	interferon inducible protein 2	6.23	5.08
17	inside 95% CI	Omy17-QTL	33 113 731	33 119 171	LOC110494012	interferon-induced protein 44-like	10.43	3.42
17	inside 95% CI	Omy17-QTL	38 773 900	38 783 599	LOC110494097	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5-like	7.12	2.44
17	close to 95% CI	Omy17-QTL	39 038 735	39 040 531	LOC110494110	ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2	0.32	0.46
17	close to 95% CI	Omy17-QTL	39 041 005	39 041 916	tspo	translocator protein	0.32	0.46
20	close to 95% CI	Omy20-QTL	24 747 400	24 749 885	agt	angiotensinogen	10.07	13.41
21		Omy21-QTL _{Omy3}	41 958 476	41 962 355	LOC110500648	perilipin-2-like isoform X1	4.25	3.26
21	close to 95% CI	Omy21-QTL	50 986 065	51 006 698	tlr2	toll-like receptor 2	0.31	0.47
25	inside 95% CI	Omy25-QTL	12 764 454	12 765 257	LOC110504647	LRRN4 C-terminal-like protein	3.14	1.95
25	inside 95% CI	Omy25-QTL	19 268 449	19 269 832	LOC110504792	gastrotropin-like	2.36	4.36
25	inside 95% CI	Omy25-QTL	21 339 275	21 354 216	LOC110504834	hepatocyte cell adhesion molecule-like isoform X2	0.30	1.16
25	inside 95% CI	Omy25-QTL	21 527 625	21 531 242	LOC110504840	fructose-bisphosphate aldolase B-like	3.17	2.26
27	inside 95% CI	Omy27-QTL	8 935 655	8 937 794	LOC110507468	flavin reductase (NADPH)-like	0.33	0.48
29		Omy29.2-QTL	16 205 674	16 251 468	LOC110509730	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	3.38	1.23
29	inside 95% CI	Omy29.2-QTL	19 958 851	19 961 719	LOC100135840	78 kDa glucose-regulated protein	3.08	2.87
29	inside 95% CI	Omy29.2-QTL	19 962 834	19 970 333	rabepk	rab9 effector protein with kelch motifs isoform X1	3.08	2.87
29	inside 95% CI	Omy29.1-QTL	31 555 459	31 557 114	LOC110510096	putative defense protein Hdd11	0.21	0.43
29		Omy29.1-QTL	33 668 162	33 669 291	LOC110510168	high mobility group protein B3-like	3.96	2.94

Additional file 2 Table S7 (non include)

Format: .xlsx

Title: Reads of the 9654 polymorphic loci used in the linkage map and QTL detection.

Additional file 6

Title: Details on the immune genes induced by *F. psychrophilum* infection that map within resistance-associated QTL.

In a previous study [1] we analysed the transcriptome response to Fp in the spleen of two trout isogenic lines (B57 and A3) with contrasted susceptibility to Fp, using micro-arrays. A list of 571 genes differentially expressed after Fp injection in at least one of these lines was generated ([1] supplementary material [2, 3]). All probes corresponding to these genes were mapped on the rainbow trout genome [4], to test whether differentially expressed genes would be located close to a QTL, and to build a preliminary list of potentially relevant Fp induced genes combining expression and positional features of interest. Probes positions were compared to the rainbow trout annotation [5] to name the corresponding protein. Sixty four probes (corresponding to 49 genes) were located within or close to the 95% confidence interval of QTL detected in the present study (see Table a, Additional file 2: Tables S4 and S5).

Among those forty-nine genes, fourteen had functions suggesting that they might be directly implicated in the resistance controlled by the different QTL in (close to) which they are located (Table a). These genes can be classified in four functional categories: (1) bacterial sensors and damage associated molecular pattern (DAMP) molecules ; (2) inflammatory factors; (3) effectors killing bacteria or affecting the host; and (4) Interferon stimulated genes (ISG).

Table a. List of functional genes positioned inside or very close to the 95% confidence interval of the QTL associated with resistance to Fp

QTL	Protein name	Funct. cat.	Function
Omy2-QTL	STEAP4/ Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 9	2	A metalloredutase. Plays a role in the regulation of inflammatory cytokines and NF-κB signalling.
Omy2-QTL	complement C3	3	C3 plays a central role in the activation of the complement system known as essential to the innate immunity.
Omy2-QTL	Hepcidin	3	Antimicrobial peptide induced after bacterial infection playing an important role in regulating the systematic iron homeostasis.
Omy2-QTL	C-type lectin domain family 4 member E-like/Macrophage-inducible C-type lectin/CLEC4-like	1	Cell-surface receptor for mycobacteria and other pathogens, induces inflammatory cytokines via the NF-κB pathway.
Omy2-QTL	C-type lectin B/CLEC4-like	1	Endocytic receptor, pro-inflammatory.
Omy3-QTL	CD209/CLEC4 like	1	Pathogen-recognition receptor expressed on the surface of immature dendritic cells and involved in initiation of primary immune response.
Omy3-QTL	interleukin-1 receptor type 2 (IL1R2)	2	Receptor of interleukin-1, a major pro-inflammatory cytokine.
Omy7-QTL	Differentially regulated trout protein (DRTP1)	2	Acute phase protein induced by polyinosinic:polycytidylic acid (polyIC), lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor-alpha (TNFα)
Omy7-QTL	mmp13/collagenase 3	3	A metalloprotease. Plays a key role in degradation and remodelling of host extracellular matrix proteins.
Omy10-QTL	VHSV induced gene -2	4	Type I IFN inducible transcript.
Omy17-QTL	IFI44	4	Interferon stimulated gene.
Omy17-QTL	IFITM like	4	Interferon stimulated gene with antiviral activity, prevents viral fusion and release of viral contents into the cytosol.
Omy17-QTL	mmp13/collagenase 3	3	A metalloprotease. Plays a key role in degradation and remodelling of host extracellular matrix proteins.
Omy21-QTL	toll-like receptor 2 (TLR2)	1	A key bacterial sensor. Recognizes LPS, lipoteichoic acid, and lipoproteins, also β-glucans and a few viral glycoproteins.
Omy29-QTL	high mobility group Box3 (HMGB3)	1	Associated with nuclear chromatin or present in the cytosol. May also function as danger signal and trigger host immune activation when released from dead cells.

(1) The initiation of the antibacterial response is an obvious level at which genetic variation might condition the efficiency of the defence reaction of the host. CD209/DC-SIGN and other related lectins recognise mannose carbohydrates, which are important molecular patterns expressed by pathogens, especially bacteria. In mammals, this interaction activates phagocytosis of macrophage [6], while on dendritic cells CD209 activates CD4⁺ T cells. TLR2 is another key sensor of bacterial pathogens, binding for example LPS and lipoteichoic acids. The HMGB3-like may not be a true sensor, but HMGB proteins are inflammatory proteins also present in plants; they are expected to bind various pathogen associated molecular patterns when released from dead cells, and send strong activation signals that can amplify the immune response.

(2) IL1 is one of the most important pro-inflammatory cytokines, and its receptor is a key element of the downstream signalling; in contrast, the metalloredutase STEAP4, as known as TNF α -induced protein 9, regulates degradation of the NF- κ B inhibitory molecule I κ B α and phospho-STAT3, appearing as a negative regulator of inflammation. Thus, these two genes are important factors of the main inflammatory axes based on the cytokines IL1 and TNF α . The function of the acute phase protein DRTP1 remains unknown, but it is encoded by one of the most induced genes after polyIC, LPS or TNF α treatment, underscoring its potential importance as an inflammatory factor.

(3) The two important antibacterial effectors located close to resistance QTL regions comprise a C3 protein of the complement cascade and the antibacterial peptide hepcidin. Besides, the metalloprotease mmp13, typically induced by pro-inflammatory cytokines, is implicated in the degradation of the extracellular matrix and in tissue remodelling [7].

(4) Finally, it is interesting to note that several important ISG (vig2, IFI44, IFITM) also were upregulated by the bacterial infection. They are all located in the same genomic region linked to Omy17-QTL. They modulate multiple pathways of inflammation, which can be either favourable or detrimental to the host depending on the strength and context of the response.

The genes STEAP4, C3, hepcidin, and TLR2 were all well up-regulated in the susceptible line B57 compared to the resistant line in our transcriptome analysis [1]. Interestingly, they are located in two QTL (Omy2-QTL and Omy21-QTL), for which the favourable allele origin was from the grandparent line B57, suggesting that higher induction of those genes might favour resistance in this case.

References

- [1] Langevin C, Blanco M, Martin SAM, Jouneau L, Bernardet JF, Houel A, Lunazzi, A, Duchaud E, Michel C, Quillet E, Boudinot P. Transcriptional Responses of Resistant and Susceptible Fish Clones to the Bacterial Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. PLoS ONE. 2013; doi.org/10.1371/journal.pone.0039126.
- [2] Langevin C. Suppl. Figure 1. This excel file contains the complete list of up- and down- regulated genes in rainbow trout clonal lines B57_s and A3_r following *F. psychrophilum* JIP 02/86 infection. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039126.s001>. Accessed 2 Nov. 2017
- [3] Langevin C. Suppl. Figure 2. This table contains the list of probes for wich up- or down- regulation was significant in only one of the two fish clonal lines, while a high adj. *p* value in the other line indicated a large variation of the expression level. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039126.s002>. Accessed 2 Nov. 2017
- [4] Omyk_1.0: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002163495.1/ Accessed on 15 Sept. 2017.
- [5] NCBI Oncorhynchus mykiss Annotation Release 100: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Oncorhynchus_mykiss/100/ . Accessed 12 Dec. 2017
- [6] McGreal E, Miller J, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. Curr. Opin. Immunol. 2005; doi:10.1016/j.coi.2004.12.001
- [7] Goldring MB, Otero M, Plumb DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon mmp-13 regulation in osteoarthritis. Eur. Cell Mater. 2011; doi: 10.22203/eCM.v021a16.

Titre : Bases génétiques de la réponse à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum* chez la truite arc-en-ciel : approche expérimentale et perspectives en sélection

Mots clés : Truite arc-en-ciel, aquaculture, résistance aux maladies, *Flavobacterium psychrophilum*

Résumé : La santé des cheptels et la maîtrise des maladies est un enjeu majeur de compétitivité des élevages et de durabilité des filières. Les maladies d'origine bactérienne sont responsables de pertes économiques importantes en pisciculture. La bactérie *Flavobacterium psychrophilum*, qui touche l'ensemble des salmonidés et plus particulièrement la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), est très largement distribuée dans le monde et en France. En l'absence de vaccin commercial efficace, la maladie est jusqu'à présent systématiquement combattue à l'aide de traitements antibiotiques. Dans un contexte d'antibiorésistance croissante, il est nécessaire de trouver d'autres moyens de lutte et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constitue une priorité pour la filière trutticole française. Si le caractère héritable de la résistance à la maladie est bien démontré chez la truite, une meilleure connaissance de ses différentes composantes et des déterminismes génétiques sous-jacents est nécessaire pour optimiser les modalités d'introduction de la résistance dans les objectifs des schémas de sélection conduits par les entreprises françaises.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier le déterminisme génétique de différentes composantes de la réponse à l'infection par *F. psychrophilum* par une approche de cartographie de QTL (quantitative trait locus) ; puis

d'évaluer dans quelle mesure ces déterminismes dépendent des protocoles infectieux utilisés pour tester la résistance.

Pour ce faire, nous avons combiné les résultats obtenus avec des infections expérimentales par injection et balnéation et une infection naturelle

En utilisant, d'une part des croisements expérimentaux entre lignées isogéniques à la résistance contrastée et d'autre part, avec une lignée commerciale élevée dans une entreprise de sélection française.

Nous mettons en évidence que la réponse de la truite arc-en-ciel à l'infection par *F. psychrophilum* est un caractère complexe, contrôlé par un grand nombre de QTL d'effet modéré et en interaction. Nos résultats suggèrent également que les différentes composantes de la réponse à l'infection (résistance, endurance, résilience, portage) sont en partie contrôlées par des déterminants génétiques différents, et que certains mécanismes de défense contre l'infection par *F. psychrophilum* dépendent de la voie d'infection (infection par balnéation ou par injection). Cette étude ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires sous-jacents à la réponse de la truite arc-en-ciel à l'infection par *F. psychrophilum*, et constitue une première étape vers la mise en place de la sélection génomique pour la résistance à *F. psychrophilum* dans les populations de truites françaises.

Title: Genetic bases of rainbow trout response to infection with *Flavobacterium psychrophilum* : experimental approach and perspective for selective breeding

Keywords : Rainbow trout, aquaculture, disease resistance, *Flavobacterium psychrophilum*

Abstract : Health management and disease control are of both major economic and environmental concerns for animal production systems. Bacterial diseases are responsible for important economic losses in fish farming. *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial cold water disease (BCWD), affects particularly rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and is found worldwide where salmonids are raised. As no commercial vaccine is available at the moment, the only way to fight BCWD remains through the use of antibiotic treatments. In a context of growing antibiotic resistance threat, additional methods to tackle fish disease are highly needed. Improving the natural host defense mechanisms against infectious pathogens through selective breeding is one of the priorities for French trout farmers. Moderate heritabilities were estimated for resistance against BCWD, indicating that selective breeding is a promising approach to improve trout defense mechanisms against *F. psychrophilum*. In order to implement disease resistance in French breeding schemes, we need to better understand the genetic determinism of this trait.

In this context, the objective of this PhD is to study genetic determinism of different components of trout response to

different infection protocols with *F. psychrophilum* using a QTL (Quantitative Trait Loci) mapping approach.

To do so we used three experimental crosses between isogenic lines of trout with contrasting susceptibility. Finally, a study on a commercial line under selection in a French breeding company was performed after a natural disease outbreak to validate the interest of QTL previously detected.

In this study, we showed that an important number of interacting QTL controls rainbow trout response to infection with *F. psychrophilum*. Our results suggest that different components of response to infection (resistance, endurance, resilience, bacterial load) might be controlled by different genetic determinisms. We also showed that different infection protocols trigger different immune mechanisms that may be specific to the route of entry of the pathogen. This study paves the way toward a better understanding of underlying immune mechanisms of rainbow trout response to *F. psychrophilum*. Finally, this study is the first step toward implementing genomic selection of resistance to BCWD in French rainbow trout population.