UNIVERSITÉ DE LA POLYNÉSIE FRANÇAISE
École Doctorale du Pacifique

THÈSE DE DOCTORAT
Présentée par

CAROLINE JOUBERT

Pour l'obtention du titre de :
Docteur de l'Université de la Polynésie Française
Discipline : Biologie moléculaire

Approche transcriptomique globale pour l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *Pinctada margaritifera* et le développement de biomarqueurs appliqués à la sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons

Soutenue le 2 Septembre 2011

MEMBRES DU JURY :

Mr Gaël LECELLIER, Maître de conférences, Université de la Polynésie française	Président du jury
Mme Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN, Directrice scientifique, Ifremer	Rapporteur
Mr Fréderic MARIN, Chargé de recherche, CNRS, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mr Serge PLANES, Directeur de recherche, CNRS-EPHE, CRIOBE	Rapporteur
Mme Nathalie COCHENNEC-LAUREAU, Chargée de recherche Ifremer	Examinateur
Mr Yannick GUEGUEN, Chargé de recherche, Ifremer	Examinateur
Mr Marcel LE PENNEC, Professeur, Université de la Polynésie française	Examinateur

Table des matières

Liste des figures iv
Liste des tables vi

Chapitre I: État de l'art 1

1. **La perliculture en Polynésie française** 1
   1.1. Historique de la perliculture 1
   1.2. Contexte économique actuel 1
   1.3. La greffe des perles de *P. margaritifera* 2
      1.3.1. Choix des individus 2
      1.3.2. Découpe des greffons 2
      1.3.3. Acte de greffe 4
      1.3.4. Formation de la perle 4
      1.3.5. Elevage, contrôles post-greffe et récolte 4
   1.4. La qualité de la perle 5
   1.5. Recherche et développement en perliculture, réseau de veille zoosanitaire 7
2. **Le modèle biologique : *Pinctada margaritifera* var. cumingii (Linné 1758)** 7
   2.1. Systématique et phylogénie du genre *Pinctada* 7
   2.2. Répartition géographique 8
   2.3. Morphologie et anatomie 8
      2.3.1. La coquille 8
      2.3.2. Les parties charnues 9
      2.3.3. Nutrition 10
      2.3.4. Reproduction et cycle de développement 12
3. **Processus de biominéralisation : considérations générales** 12
   3.1. Biomineralisation(s): Définition générale d'une vaste discipline 13
   3.2. Diversité des types de biominéraux 14
   3.3. Diversité des fonctions biologiques des biominéraux 16
   3.4. Concept, définition et rôle de la matrice organique 16
   3.5. Biominéralisation induite ou controlée 17
      3.5.1. Biominéralisation induite 17
      3.5.2. Biominéralisation contrôlée 17
4. **Processus de biominéralisation de la coquille et de la perle chez les mollusques, le cas de *Pinctada margaritifera*** 19
   4.1. Les différentes étapes de la biominéralisation de la coquille et les compartiments correspondants 20
      4.1.1. Le manteau : le tissu biominéralisateur 20
      4.1.2. L'espace extra-palléal : rôle controversé de la théorie de la sursaturation et de l'existence de l'espace extrapalléal comme compartiment de la biominéralisation 22
      4.1.3. Le périostracum : le premier support de la biominéralisation 23
      4.1.4. La coquille 24
   4.2. Les composants organiques de la matrice extracellulaire, focus sur les protéines impliquées dans les processus de biominéralisation 25
      4.2.1. Les protéines très acides (« unusally acidic proteins ») 26
      4.2.2. Les protéines modérément acides 27
      4.2.3. Les protéines basiques 28
      4.2.4. Les protéines « silk-fibroin like » 29
   4.3. Formation de la coquille et modélisation des processus de biominéralisation 29
      4.3.1. Processus de biominéralisation de la nacre 29
      4.3.2. Processus de biominéralisation des prismes de calcite 31
   4.4. Structure et microstructure de la coquille de *P. margaritifera* 33
   4.5. Les processus de biominéralisation de la perle 35

4.5.1. Le sac perlier 35
4.5.2. Vers une analyse génomique de la qualité de la perle 36

Chapitre II: Introduction 38

1. Intitulé de la thèse et encadrement 39
2. Présentation des laboratoires d'accueil 40
2.1. Skuldtech 40
2.2. Le centre IFREMER du Pacifique (CIP) et le laboratoire Ecosysteme perlicole (EP) 40
3. Contexte scientifique 41
3.1. Les travaux du laboratoire « Biotechnologie et Qualité de la Perle » 41
3.2. GDR ADEQUA 42
4. Démarche et objectifs de la thèse 43
4.1. Rappels sur l'apport des banques de séquences en génomique 43
4.2. Objectifs de la thèse : mieux comprendre les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* pour l'identification des biomarqueurs de croissance et de la qualité de la perle 44
4.3. Démarche de la thèse : mise en place d'une approche transcriptomique globale et d'un dispositif de greffe expérimentale pour l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation chez *P. margaritifera* et la mise au point de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle 44
4.4. Supports techniques et conceptuels 46

Chapitre III: Matériel et méthodes 47

1. Matériel biologique : l'huître perlière *P. margaritifera* 48
2. Protocoles des greffes expérimentales 48
2.1. Greffe ADEQUA#1 : préparation du matériel biologique pour les constitutions des banques SAGE de greffons et de poches perlières 48
2.2. Greffe ADEQUA#2 : préparation du matériel biologique pour l'étude de l'effet donneuse et la validation des biomarqueurs de qualité de la perle chez *P. margaritifera* 48
3. Protocoles d'extraction des ARN, de synthèse des cDNA et de PCR quantitative 49
3.1. Extraction des ARN totaux 49
3.2. Transcription inverse des ARN 49
3.3. qPCR et qPCR haut-débit 49
3.3.1. Détermination de l'efficacité des couples d'amorces qPCR 49
3.3.2. Détermination du niveau d'expression relatif des gènes cibles biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle par qPCR haut-débit 50
4. Méthodes de génomique et de protéomique globales 50
4.1. Constitution et séquençage de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* 50
4.2. Constitution et séquençage des banques SAGE de greffons et de poches perlières de *P. margaritifera* 50
4.3. Constitution des banques de peptides des structures minéralisées de *P. margaritifera* 51
5. Outils de bioinformatique 51
5.1. Assemblage et annotation de la banque EST de manteau 51
5.2. Identification de protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* 52
6. Evaluation de la qualité et de l'épaisseur de nacre des perles récoltées dans le cadre de la greffe ADEQUA#2 et mise en évidence de l'effet donneuse 52
7. Constitution des plans d'échantillonnages de greffons et de poches perlières pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle 53
8. Analyses statistiques 53

Chapitre IV: Résultats et discussion 54
Identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* pour la sélection de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle

1. Démarche et objectifs 55
2. Constitution d'une banque EST de manteau par pyroséquençage chez *P. margaritifera* 57

2.1. Construction de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* et statistiques de description des données 57
2.2. Annotation de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* 59
2.3. Mise et en place de la base de données en ligne « Oyster » 61
2.3.1. Contexte et objectifs 61
2.3.2. Fonctionnalités et outils disponibles 62
3. Identification de gènes et de protéines potentiellement impliqués dans la biominéralisation chez *P. margaritifera* par des approches transcriptomiques et protéomique globales 64
3.1. Exploitation de la banque EST et identification d'un catalogue de gènes exprimés dans le manteau codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* 64
3.2. Identification de protéines de la matrice organique associée aux structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera* par la mise en place d'une approche protéomique globale. 65
3.2.1. Contexte et démarche 65
3.2.2. Identification des protéines des matrices organiques associées aux structures coquillières et perlières minéralisées de *P. margaritifera* 65
3.3. Identification de gènes exprimés dans les tissus biominéralisateurs de la perle chez *P. margaritifera* : Constitution de banques SAGE de greffons et de poches perlières 68
3.3.1. Méthode d'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE) : caractéristiques et avantages 68
3.3.2. Constitution de banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera* : démarche et objectifs 69
3.3.3. Identification de gènes exprimés dans les tissus biominéralisateurs de la perle (greffons et poches perlières) chez *P. margaritifera* 70
4. Sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera* 73
4.1. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation de la banque EST de manteau chez *P. margaritifera* 73
4.2. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation des banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera* 74
4.3. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation de l'approche protéomique globale réalisée sur les structures minéralisées (coquille et perles) chez *P. margaritifera* 75
4.4. Bilan de la sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation des approches transcriptomiques et protéomique globales chez *P. margaritifera* 77
5. Valorisation scientifique 78

Chapitre V: Résultats et discussion 82
Mise en évidence de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle par la mise en place d'un dispositif de greffe expérimentale et l'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats chez *P. margaritifera*

1. Objectifs et démarche mise en place 83
2. Greffe expérimentale ADEQUA#2 : Mise en évidence de l'effet donneuse et mise à disposition du matériel biologique pour la validation des biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera* 85
2.1. Résultats et statistiques de la greffe ADEQUA#2 85
2.2. Mise en évidence d'un effet donneuse chez *P. margaritifera* 86
2.2.1. Définition statistique de la qualité de la perle 86
2.2.2. Classement des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de leur potentiel minéralisateur 86
2.2.3. Mise en évidence statistique de l'effet donneuse 87
3. Constitution des plans d'échantillonnages de matériel biologique pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle 92
3.1. Identification d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels minéralisateurs contrastés 92
3.2. Constitution d'échantillonnages de greffons et de poches perlières 97
4. Validation de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera* 98
4.1. Choix de la méthode de qPCR haut-débit et sélection de gènes biomarqueurs candidats analysés 98
4.2. Choix des gènes de références pour l'analyse qPCR des biomarqueurs candidats 99
4.3. Analyse de l'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau de *P. margaritifera* par qPCR haut débit 100
4.3.1. Contexte et démarche 100

4.3.2. Mise en évidence d'un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs candidats 101
4.4. Validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* par qPCR haut débit : 104
4.4.1. Analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle au sein des échantillonnages de greffons et de poches perlières 105
4.4.2. Sélection d'un ensemble de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera* 107
5. Valorisation scientifique 110

Chapitre VI: Synthèse et perspectives 111

1. Synthèse des résultats 112
2. Perspectives 113
Bibliographie 118

Liste des figures

Figure 1 : Greffe de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, mise en place du sac perlier et minéralisation de la perle 3

Figure 2 : Élevage de *P. margaritifera* et récolte des perles 4

Figure 3 : Tailles, formes et qualité de surface des perles de *P. margaritifera* 6

Figure 4 : Répartition géographique des principaux représentants du genre *Pinctada* 8

Figure 5 : Coquille de l'huître perlière *P. margaritifera* 9

Figure 6 : Anatomie de l'huître perlière *P. margaritifera* (valve droite) 10

Figure 7 : Nutrition de l'huître perlière *P. margaritifera* 11

Figure 8 : Cycle de développement de l'huître perlière *P. margaritifera* 13

Figure 9 : Phylogénie moléculaire des organismes eucaryotes et distribution des structures minéralisées 15

Figure 10 : Exemples de biominéralisations induites 18

Figure 11 : Exemples de biominéralisations contrôlées 19

Figure 12 : Compartiments de la biominéralisation de la coquille des mollusques (bivalves) 21

Figure 13 : Coupe histologique du manteau de l'huître perlière *P. margaritifera* 22

Figure 14 : Modélisation de la formation du périostracum chez les bivalves à coquille nacro-prismatique 24

Figure 15 : Représentation graphique de la répartition des protéines de coquilles de mollusques en fonction de leur masse moléculaire et de leur point isoélectrique théoriques calculés 26

Figure 16 : Représentations schématiques des premiers modèles topographiques de la croissance de la nacre des mollusques 30

Figure 17 : Représentations schématiques des modèles topographiques les plus récents de la croissance des tablettes de nacre et des prismes de calcite des mollusques 32

Figure 18 : Structure et microstructure de la coquille de *P. margaritifera* 34

Figure 19 : Coupes histologiques du greffon et du sac perlier de *P. margaritifera* 35

Figure 20 : Expression différentielle de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de la biominéralisation, corrélation avec la qualité de la perle chez *P. fucata* 39

Figure 21 : GDR ADEQUA 43

Figure 22 : Objectifs et démarche de la thèse 45

Figure 23 : Objectifs et démarche mise en place pour la sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 56

Figure 24 : Distribution des longueurs des ESTs de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* 59

Figure 25 : Annotation fonctionnelle Gene Ontology de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* 61

Figure 26 : Base de données « Oyster » 63

Figure 27 : Hauteurs de découpe des greffons au sein du manteau de *P. margaritifera* 69

Figure 28 : Logiciels de traitement des données brutes et d'assignation des tags des banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera* 71

Figure 29 : Objectifs et démarche mise en place pour la validation de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 84

Figure 30 : Épaisseur de nacre minimale mesurée à la surface du nucléus en fonction de l'huître perlière donneuse du greffon à l'origine de la perle 88

Figure 31 : Proportion de perles à défauts récoltées en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons 89

Figure 32 : Proportion de perles observées par catégorie de qualité en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons dont elles sont issues (Classification Service de la Perliculture) 90

Figure 33 : Proportion de perles observées par catégorie de qualité en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons dont elles sont issues (Classification Manapearl) 91

Figure 34 : Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Service de la Perliculture)..... 94

Figure 35 : Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Manapearl)..... 95

Figure 36 : Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Nombres de défauts » 96

Liste des tables

Table 1. Qualité des perles de Tahiti 5

Table 2. Classification taxonomique de l'espèce *P. margaritifera* var. *cumingii* 7

Table 3. Statistiques de description des données de pyroséquençage et d'annotation de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* assemblée à 98% d'homologie 58

Table 4. Statistiques de description des données issues de l'approche protéomique globale menée sur les matrices organiques des structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera* 66

Table 5. Protéines connues identifiées par approche protéomique globale au sein des matrices organiques des structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera* 67

Table 6. Statistiques de description des banques SAGE réalisées sur les greffons et les poches perlières de *P. margaritifera* 72

Table 7. Profils d'expression des tags sélectionnés comme biomarqueurs candidats au sein des banques SAGE de greffons et de poches perlières de *P. margaritifera* 75

Table 8. Localisation des protéines assignées par des séquences uniques EST inconnues de la banque de manteau de *P. margaritifera* et sélectionnées comme biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle 76

Table 9. Biomarqueurs candidats sélectionnés dans le cadre des approches transcriptomiques et protéomique globales mises en place sur les tissus minéralisateurs et sur les matrices organiques des structures minéralisées chez *P. margaritifera* 77

Table 10. Statistiques de la greffe ADEQUA#2 85

Table 11. Démarche de classement des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de la qualité des perles récoltées pour la mise en évidence de l'effet donneuse chez *P. margaritifera* 87

Table 12. Groupes d'huîtres perlières donneuses constitués pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 93

Table 13. Échantillonnage de greffons et de poches perlières constitués sur la base de l'effet donneuse pour la validation des biomarqueurs candidats de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera* 97

Table 14. Sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* pour leur validation en qPCR haut-débit 98

Table 15. Analyse de la variabilité de l'expression des gènes de références en fonction des hauteurs de découpe de greffons et en fonction de la variabilité individuelle 100

Table 16. Différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 101

Table 17. Occurrences des tags au sein des banques SAGE des gènes biomarqueurs candidats présentant un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau 102

Table 18. Localisation des peptides codés par des gènes biomarqueurs candidats présentant un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau de *P. margaritifera* 103

Table 19. Expression des biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle identifiés chez *P. margaritifera* au sein des greffons et de poches perlières 105

Table 20. Biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 108

Table 21. Niveau d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* 109

Chapitre I: État de l'art

1. La perliculture en Polynésie française

1.1. Historique de la perliculture

La première personne à découvrir le secret de la production d'une perle de culture par une huître ne fut pas un japonais, le célèbre Kokichi Mikimoto, mais vraisemblablement un biologiste marin britannique, William Saville Kent (1845-1908), en 1890, alors employé du service des pêches d'Australie (Dickinson, 1968). Fasciné par les perles, il étudie la méthode de culture des mabés, « demi-perles » de nacre, mise au point par les chinois, qui consiste à introduire un petit objet sous le manteau et contre l'intérieur de la coquille. William Saville Kent améliore ce procédé, monte la première exploitation de perles cultivées d'Australie à Thursday Island et en 1890, ses expérimentations le conduisent à produire avec succès une perle de culture véritablement sphérique. Enthousiaste, il communique volontiers sur ses résultats et reçoit, en 1901, la visite d'employés de la flottille impériale japonaise. Parmi eux se trouvent Tokishi Nishitawa (1874-1909), biologiste marin et officier des pêcheries, ainsi que le beau-père de Tatsuhei Mise (1880-1924). Au Japon en 1902, T. Mise entreprend alors ses propres expériences, couronnées de succès en 1904 par l'obtention de la première perle ronde. En 1905, T. Nishitawa lui-même s'investit dans cette recherche et perce le secret en 1907.

C'est ainsi qu'en 1907, les deux japonais T. Mise et T. Nishitawa déposent indépendamment et à une semaine d'intervalle la première demande de brevet relative à la production de perles de culture sphériques, dont ils partageront finalement la propriété. Dans les deux cas, la méthode est la même. Elle consistait alors à envelopper complètement une bille de nacre d'un lambeau de manteau d'une nacre donneuse, et à introduire l'ensemble dans une autre huître perlière (Taburiaux, 1983). Le procédé fut repris, développé et exploité par le japonais K. Mikimoto (1858-1954), qui déposa à son tour en 1908 son propre brevet. Bien que K. Mikimoto ne puisse endosser la paternité de la découverte, il fut sans conteste le premier géant de l'industrie perlicole. Il met au point les techniques d'élevage, organise ses fermes perlières, persévère malgré les fortes mortalités. Cet homme d'affaires règne à la fin de sa vie sur un empire qu'il a réussi à maintenir malgré la Seconde Guerre mondiale, au point d'être sacré « Roi de la perle » dans un article du New York Herald du 9 octobre 1954. Les secrets des techniques de greffe et de culture sont si jalousement protégés que pendant des années, les fermes perlières ne peuvent s'implanter en dehors du Japon sans la présence de greffeur japonais.

En Polynésie française, l'huître perlière à lèvres noires *Pinctada margaritifera* est utilisée dès le 18ème siècle pour sa nacre par les polynésiens qui l'utilisent comme outil de pêche, objet d'ornement ou monnaie d'échange. Dès le 19ème siècle, les gisements naturels des lagons polynésiens sont surexploités et menacés de destruction pour alimenter un commerce mondial essentiellement tourné vers la marqueterie et la boutonnerie. Le Territoire de la Polynésie française, désireux de trouver des débouchés alternatifs à la production nacrière, confie en 1961 à Jean-Marie Domard, alors responsable du « Service de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche », un essai de culture perlière dans l'atoll de Hikueru dans les Tuamotu (Le Pennec, 2010). J. M. Domard obtient ainsi qu'un greffeur japonais, Churoku Muroi, vienne greffer 1 095 huîtres perlières, dont 827 pour des perles rondes, le reste étant greffé pour des mabés. Le projet est un succès et J. M. Domard conclut à la possibilité d'obtenir des perles de culture rondes chez l'huître perlière *P. margaritifera*. Deux autres séries de greffes en 1962 et 1963 viennent appuyer les résultats obtenus en 1961, et font l'objet de l'approbation des experts japonais en 1964, pour qui la perle de Tahiti est alors « *susceptible d'être promue au rang des bijoux de grande classe* » (Le Pennec, 2010).

1.2. Contexte économique actuel

Le savoir-faire des greffeurs japonais est repris et localement mis au point par quelques pionniers en Polynésie française dans les années 60. La perliculture commerciale voit véritablement le jour en 1968, avec la création par Jacques Rozenthal de la première ferme privée, à Manihi (Tuamotu). Il est suivi par William Reed en 1972 et Jean-Claude Brouillet en 1975, qui installent leurs fermes respectivement à Mangareva et Marutea, rapidement rachetées par Robert Wan pour fonder la société Tahiti Perles. En parallèle, le Territoire initie des travaux portant sur la récolte des naissains et la culture des larves de *P. margaritifera*, offrant aux polynésiens la possibilité de s'investir en perliculture (Le Pennec, 2010). Dans les années 80, c'est le « boom perlicole » et le nombre d'exploitations monte

en flèche. Au début des années 90, la libéralisation des concessions maritimes et la vulgarisation de l'acte de greffe aboutissent au développement anarchique de la production. Les perles inondent le marché, la qualité s'en ressent et le prix moyen des perles au gramme s'effondre. Pour tenter d'enrayer la crise, le « Service de la Perliculture » est créé par délibération n° 2001-37 APF du 30 mars 2001. Il a pour mission de réglementer l'activité perlicole et d'en contrôler l'application, mais également de promouvoir la recherche et le développement visant à améliorer la qualité de la perle. Dans les années 2000, la perliculture est devenue une activité essentielle à la Polynésie française, qui devient en 2002 le premier exportateur mondial de perles de culture, avec 26,9% (soit 111 millions de dollars) de part de marché en 2004 (comm. pers. Service de la Perliculture). Ces revenus, essentiels pour la Polynésie, occupent la deuxième place derrière les bénéfices liés au tourisme (source : Institut de Statistique de Polynésie française - ISPF).

En 2011, l'activité perlicole est exercée dans 27 atolls et 541 concessions maritimes (dont 440 producteurs de perles de culture), pour une surface totale de 9639 hectares (comm. pers. Service de la Perliculture). L'archipel des Tuamotu comprend à lui seul 70% des concessions et 80% des surfaces réparties sur 22 atolls. La grande majorité des exploitations sont de petites fermes familiales, qui ensemble ne totalisent que 20% de part de marché, tandis qu'une quinzaine de grosses entreprises à gros volume de production engendrent à elles seules 60% de part de marché (ISPF). La demande internationale est globalement en baisse, et les perliculteurs tentent d'écouler des stocks accumulés depuis plusieurs années. Les exportations et les ventes d'ouvrage en perles sont en chute libre, le prix au gramme de la perle est passé de 9500 Francs pacifiques en 1986, à moins de 500 Francs pacifiques en 2009 (ISPF). Le secteur de la perliculture en Polynésie française vit aujourd'hui des heures difficiles.

1.3. La greffe des perles de *P. margaritifera*

La perle de culture de Polynésie française provient de la greffe « allogénique » et de l'élevage en milieu naturel de l'huître perlière *P. margaritifera* var. *cumingii*. La greffe allogénique est un acte chirurgical qui consiste à introduire dans la poche perlière d'une huître perlière dite receveuse une portion de manteau (greffon) d'une huître différente dite huître perlière donneuse et une bille de nacre (nucléus) (figure 1a).

1.3.1. Choix des individus

Les huîtres perlières receveuses sont remontées des filières et nettoyées environ un mois avant la date de greffe. Cette manœuvre peut provoquer la ponte des individus matures par choc thermique. Cependant, elle permet d'avoir lors de la greffe des huîtres perlières receveuses présentant une gonade vide, restreinte et tonique, ce qui permettrait une meilleure rétention du nucléus ainsi qu'un risque moindre de présence de débris cellulaires ou de gamètes entre le nucléus et le greffon. Les huîtres perlières donneuses sont choisies avec soin par les greffeurs selon des critères d'appréciation assez personnels. Ce sont le plus souvent des animaux jeunes, sains, présentant des barbes de croissance hautes et régulières, et dont la nacre présente un fort lustre et une zone irisée colorée de qualité (figure 1b).

1.3.2. Découpe des greffons

Le greffeur sectionne le muscle adducteur et les branchies de l'huître donneuse, puis découpe le manteau sur chacune des deux valves juste sous l'insertion branchiale et en élimine les bourrelets (figure 1c). La zone de découpe du greffon est bien délimitée : elle correspond à la zone de nacre colorée et irisée du bord de la coquille. Les bandes de manteau ainsi prélevées sont étalées sur leur face externe et aplaties pour faciliter l'étalement du manteau (figure 1d). La hauteur de prélèvement de la bande de manteau dans laquelle seront découpés les greffons varie d'un greffeur à l'autre selon leur expérience personnelle, mais presque tous se repèrent grâce à la présence d'une « ligne colorée » sur la face externe du manteau. Le greffeur découpe alors dans les bandes sélectionnées des segments d'environ 3 x 4 mm et les humidifie à l'eau de mer (figure 1e). Une moyenne de trente greffons peut être ainsi prélevée sur chaque valve.

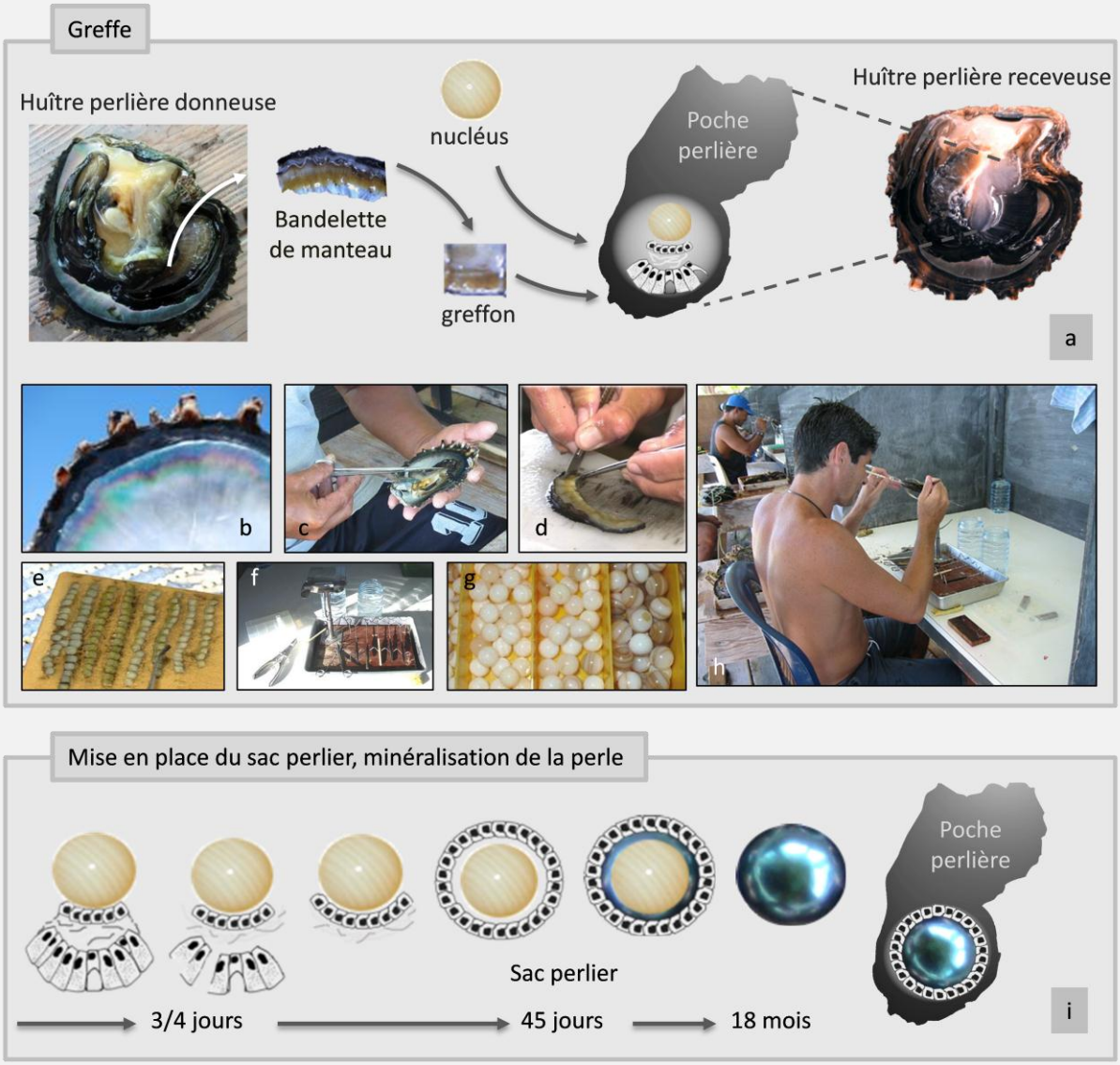

Figure 1. Greffe de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, mise en place du sac perlier et minéralisation de la perle. **a** : acte de greffe : Les perles de *P. margaritifera* de Polynésie française sont obtenues 18 mois après une greffe « allogénique » qui consiste à introduire dans une huître perlière receveuse une portion de manteau (greffon) d'une autre huître perlière (huître perlière donneuse) et une bille d'aragonite (nucléus). **b**: huître perlière présentant un fort lustre et une zone irisée de qualité. **c**: découpe du manteau sur une valve. **d**: préparation de la bandelette de manteau. **e**: greffons découpés, prêts à être greffés. **f**: outils du greffeur et poste de greffe. **g**: nucléus de tailles diverses. **h**: acte de greffe. **i :** mise en place du sac perlier et minéralisation de la perle. L'épithélium externe monostratifié du greffon au contact du nucléus va se multiplier, et totalement entourer le nucléus pour former un sac perlier au bout d'environ 45 jours. Le sac perlier est à l'origine du processus de biominéralisation qui aboutit au dépôt des couches de nacre à la surface du nucléus, et à la formation de la perle, récoltée au bout de 18 mois. (Photos: Ifremer. Schémas: C. Joubert d'après C. Montagnani).

1.3.3. Acte de greffe

La greffe est un acte très délicat, qui n'est pas encore à ce jour standardisé, tant du point de vue des conditions d'hygiène, que du déroulement de l'opération en lui-même. L'huître perlière receveuse à greffer est placée sur un porte-nacre, et les valves de la coquille sont maintenues ouvertes avec un écarteur de manière à laisser passer le nucléus et les outils de greffe (figure 1f). Une petite incision est pratiquée à la base de la poche perlière et le greffon est poussé par cette ouverture à l'intérieur. Puis un nucléus de taille adaptée à celle de la poche (figure 1g) est introduit à son tour de telle sorte qu'il soit le plus parfaitement possible au contact de la face externe du greffon (figure 1h). Si le greffon et le nucléus ne sont pas parfaitement accolés, le nucléus risque d'être rejeté, et le greffon peut évoluer sans support en produisant une concrétion de nacre plus ou moins régulière appelée « keshi ».

1.3.4. Formation de la perle

A l'issue de cette opération, l'épithélium externe monostratifié du greffon au contact du nucléus va se multiplier, et totalement englober le nucléus pour former un sac perlier (figure 1i). Ce sac perlier est composé d'une seule couche épithéliale qui conserve la fonction physiologique minéralisatrice du greffon dont il est issu et dépose des couches de nacre autour du nucléus. C'est le point de départ de la formation de la perle. Après une phase d'élevage d'environ 18 mois, la perle est récoltée.

1.3.5. Elevage, contrôles post-greffe et récolte

Les huîtres perlières receveuses greffées sont remises en élevage disposées dans une poche afin de surveiller le rejet du nucléus (figure 2a), ou directement attachées à un chapelet et mises en eau en attendant le retour sur filière en eau profonde (figures 2b). Un premier contrôle des rejets (ou checking) des huîtres perlières greffées se fait environ 45 jours après la greffe. En effet, les risques de mortalité sont importants après l'opération, et les huîtres perlières sont susceptibles de rejeter le nucléus et/ou le greffon plus ou moins précocement après la remise à l'eau. En moyenne, le taux de rejet est de l'ordre de 20% au moment de la récolte.

Une phase d'élevage d'environ 18 mois est nécessaire pour obtenir une perle d'épaisseur de nacre suffisante pour être commercialisée (supérieure à 0,8 mm, décret du Service de la Perliculture, n° 2005-42 APF du 4 février 2005). Au moment de la récolte, la perle est soigneusement retirée trop sans endommager la poche perlière (figure 2c) ni l'état de l'huître perlière receveuse (figure 2d). Si sa qualité est jugée bonne (figure 2e), le greffeur introduit un nouveau nucléus du diamètre de la perle retirée pour produire une nouvelle perle plus grosse. Cette opération, appelée « surgreffe », peut être pratiquée jusqu'à deux fois pour une même huître perlières receveuse.

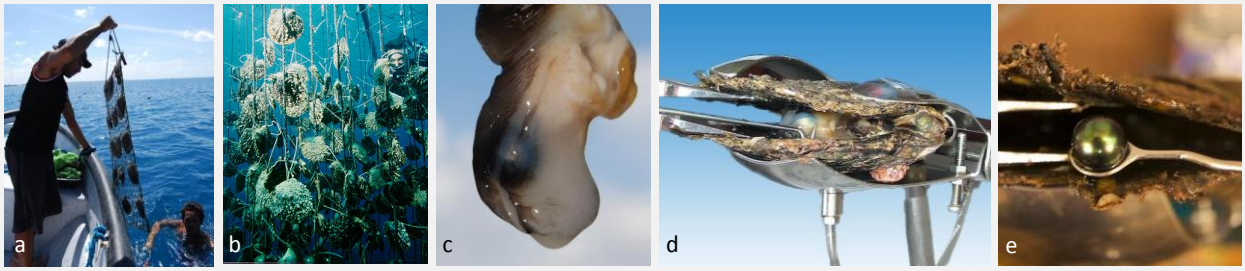

Figure 2. Élevage de *P. margaritifera* et récolte des perles. Les huîtres perlières *P. margaritifera* sont mises en élevage en poches ou en chapelets pendant une période d'environ 18 mois au bout de laquelle les perles sont récoltées. **a**: guîtres perlières en kangarous (poches individuelles). **b** : huîtres perlières en chapelets. c : poches perlière avec perle. **d**: récolte d'une perle. **e**: récolte d'une perle de qualité supérieure, huître perlière susceptible d'être surgreffée. (Photos C. Joubert et Ifremer).

1.4. La qualité de la perle

La délibération n° 2005-42 APF du 4 février 2005 portant définition des produits tirés de l'activité de la perliculture en Polynésie française fixe des règles relatives à la classification, au transport, à la commercialisation et aux formalités d'exportation de la perle de culture de Tahiti, des ouvrages et des articles de bijouterie en comportant. Ce document officiel mentionne également que la commercialisation des rebuts est interdite, leur exportation prohibée, et impose leur destruction.

La classification de la perle de culture de Tahiti s'établit selon des critères généraux que sont la taille, le poids, la forme et qualité de surface des perles, ainsi qu'en fonction d'un critère additionnel de couleur de la perle (http://www.servicedelaperliculture.pf/spip.php?rubrique31). La taille se mesure en millimètre arrondi à l'unité inférieure, et varie généralement entre 8 et 16 mm (figure 3a). Le poids se mesure en gramme. Les formes adoptées par les perles peuvent être très variables, mais sont regroupées en six formes de base : ronde, semi-ronde, goutte (ou poire ou ovale), bouton, semi-baroque et baroque. Il existe également une catégorie spéciale : la perle cerclée, quelle que soit sa forme d'origine (figure 3b à 3i).

La qualité de la perle de culture de Tahiti dépend de 2 critères : l'état de la surface, qui s'évalue en fonction de l'importance de la surface lisse (sans imperfection) (figures 3j), et le lustre (ou éclat ou brillance) (figures 3k). La surface de la perle peut présenter diverses imperfections telles que : des piqûres, des rayures, des stries, des frisures, des creux, des bourrelets, des sillons, des dépôts organiques, des dépôts de calcite ou des zones de dévitalisation. Le lustre correspond à la réflexion plus ou moins parfaite de la lumière sur la surface de la perle. Un lustre excellent correspond à une réflexion totale de la lumière, donnant un effet miroir. Une perle sans lustre correspond à un aspect mat de la perle. La qualité de la perle se codifie ainsi en 5 catégories : Parfaite (Top Gemme), A, B, C et D (Table 1). Sont définies comme rebuts des perles présentant l'un des critères suivants : plus de 20% de zones dévitalisées, plus de 20% de dépôts organiques, plus de 20% de dépôts de calcite, le nucléus visible, des piqûres profondes ou une épaisseur de la couche perlière inférieure à 0,8mm (figures 3l à 3q). L'épaisseur d'une perle est contrôlée aux rayons X (figure 3r).

Table 1. Qualité des perles de Tahiti

	Top gemme	A	B	C	D
Etat de surface	Sans imperfection	90% sans imperfection, 10% d'imperfections légères concentrée, tolérance de deux imperfections	70% sans imperfection, 30% d'imperfections légères concentrées, tolérance de deux imperfections profondes	40% sans imperfection, 60% d'imperfections légères concentrées, tolérance de 10% d'imperfections profondes	plus de 60% d'imperfections légères, tolérance de 20% d'imperfections profondes et/ou piqûres blanches
Lustre	Excellent	Très bon lustre au minimum	Bon lustre au minimum	Lustre moyen au minimum	Lustre faible au minimum

Source : *Service de la Perliculture (http://www.servicedelaperliculture.pf/spip.php?rubrique31)*

Enfin, la couleur de la perle est considérée comme un critère additionnel à sa classification. La couleur doit être la plus homogène possible, mais il est possible que la perle possède une ou plusieurs couleurs secondaires. Les perles de Tahiti diffèrent de manière importante des autres productions de perles dans le monde par leurs couleurs naturellement foncées, à dominante gris sombre. Par ailleurs, les fameuses perles noires de Tahiti offrent une palette de couleurs naturelles très variée, aux reflets bleus, verts, roses ou pourpres, cuivres, bronzes, dorés, argents … qui les rendent toutes uniques (figure 3s).

Les techniques opératoires restant pour la plupart empiriques et non standardisées, il en résulte un taux de rendement et des perles de qualité très hétérogènes d'une récolte et d'une ferme à l'autre. Néanmoins, on estime en moyenne que 43% des perles récoltées sont commercialisables, et seulement 3% sont de qualité parfaite (Top Gemme) (com. pers. Service de la Perliculture).

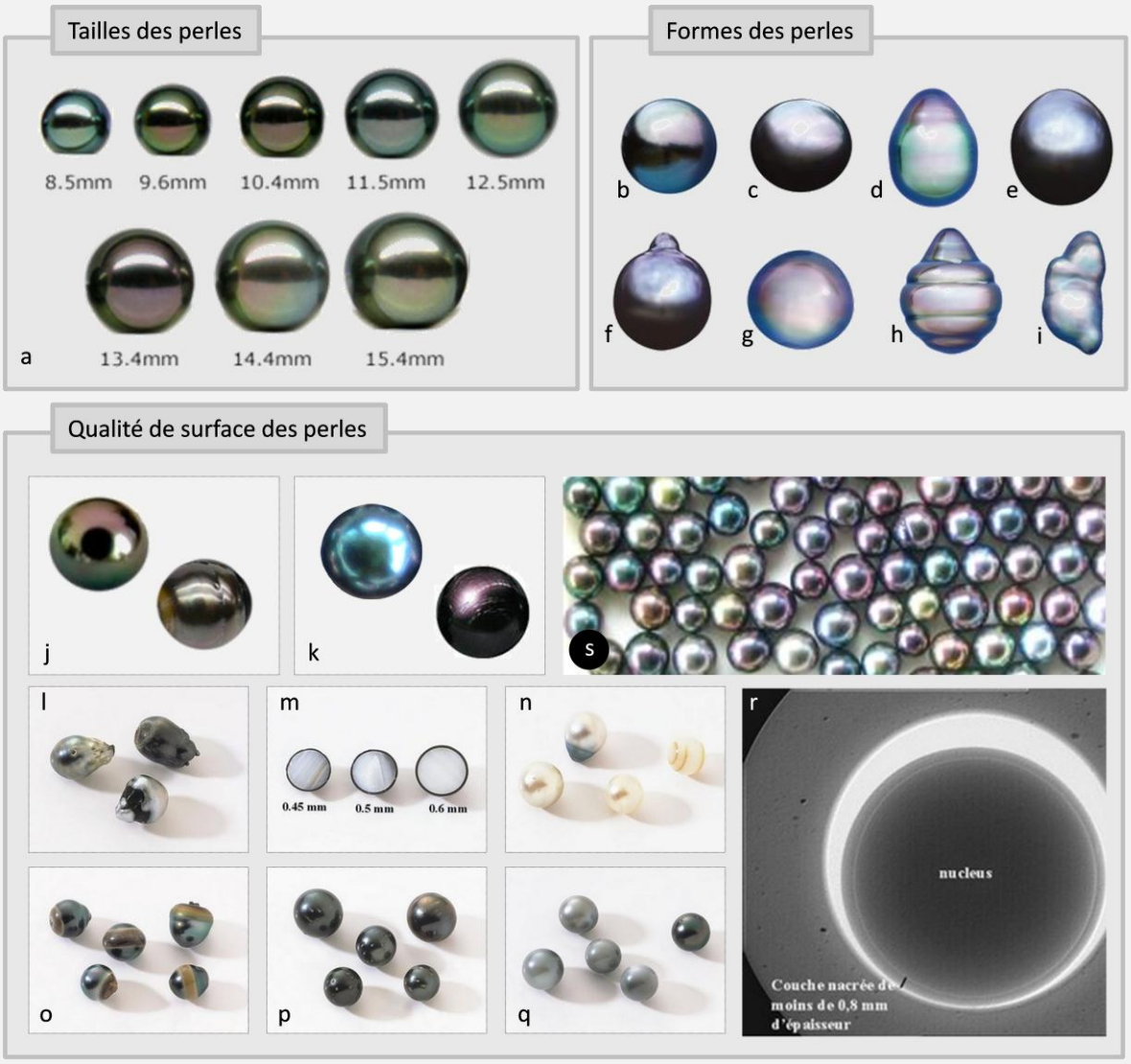

Figure 3. Tailles, formes et qualité de surface des perles de *P. margaritifera*. **a** : la taille des perles se mesure en millimètre et varie généralement entre 8 et 16 mm. Les formes des perles peuvent être très variables. **b** : la perle ronde (R) est une sphère parfaite ou assimilée, c'est-à-dire qu'elle accepte une variation de son diamètre inférieure à 2% du plus petit diamètre. **c** : la perle semi-ronde est une sphère acceptant une variation de son diamètre comprise entre 2% et 5% du plus petit diamètre. **d** et **e**: les perles goutte, poire ou ovale sont des perles présentant au moins un axe de symétrie. **f**: la perle semi-baroque au sens stricte présente au moins un axe de révolution. **g** : les perles bouton présentent au moins un axe de symétrie avec une face plate. **h** : la perle cerclée se caractérise par au moins un cercle concentrique, sous forme de bourrelet ou de sillon, situé au-delà du tiers supérieur ou inférieur de la surface de la perle, quelle que soit sa forme d'origine. **i** : la perle baroque est en général irrégulière et ne rentre pas dans les catégories précitées. Il est en de même pour les keshis. La qualité de la perle de culture de Tahiti dépend de l'état de la surface et du lustre. **j**: état de surface de la perle (perle sans défaut et perle à défauts). **k**: lustre de la perle (perle très lustrée et perle mate). La surface de la perle peut présenter diverses imperfections telles que : des piqûres, des rayures, des stries, des frisures, des creux, des bourrelets, des sillons, des dépôts organiques, des dépôts de calcite ou des zones de dévitalisation. **l** : perles rebuts à dépôts de calcite. **m**: perles rebuts d'épaisseur inférieure à 0,8 mm. **n**: perles rebuts à nucléus visible. **o**: perles rebuts à dépôts organiques. **p**: perles rebuts à piqûres profondes. **q**: perles rebuts dévitalisées. r: épaisseur d'une perle contrôlée aux rayons X, N = nucléus, flèche = épaisseur de nacre. **s**: palette de couleur des perles de *P. margaritifera*. (Photos : Ifremer et Service de la Perliculture).

1.5. Recherche et développement en perliculture, réseau de veille zoosanitaire

Dès le début des années 90, la Polynésie française a misé sur la recherche pour développer et pérenniser l'activité perlicole du pays. Le « P.G.R.N. » (programme général de recherche sur la nacre) a ainsi été mis en place en 1990. Il en a découlé des recommandations qui ont permis au Service de la Perliculture d'organiser les recherches autour de trois axes principaux : pérenniser la ressource, améliorer la rentabilité des entreprises, et sécuriser la production. Ces démarches ont été concrétisées par un certain nombre de conventions avec l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), l'Université de la Polynésie française (UPF), ou encore l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Aujourd'hui, divers programmes de recherche s'articulent autour de ces priorités, notamment le Groupement de recherche « ADEQUA » (amélioration de la qualité des perles de Tahiti, 2009-2012) dont l'objectif principal est de décrire, comprendre, améliorer les processus de greffe et la qualité des perles récoltées ; le programme de « Professionnalisation et pérennisation de la perliculture » qui vise à préserver et prédire, dans le temps et l'espace, le collectage naturel des huîtres perlières dans les lagons polynésiens; et enfin le programme « REGENPERL » (recherche sur les ressources génétiques de la perliculture Polynésienne) dont l'objectif est de préserver la biodiversité de l'huître perlière *P. margaritifera* dans les lagons et pérenniser le collectage, source d'approvisionnement de la filière perlicole.

Le Service de la Perliculture a également mis en place avec l'Ifremer à Tahiti en 2003 le réseau « REPANUI », un réseau de surveillance pathologique de l'huître perlière *P. margaritifera* (Joly *et al.,* 2007). Il répondait à une nécessité sanitaire du fait du développement rapide de la perliculture, des épisodes de mortalité massive qui ont eu lieu en 1985 (*P. margaritifera*, en Polynésie française) et en 1997 (*Pinctada fucata*, au Japon), et des enjeux importants que représentait la perliculture en Polynésie française, tant au niveau économique que social. Les objectifs de ce réseau sont d'une part de détecter rapidement les agents pathogènes exotiques, et d'autre part de prévenir leur dissémination et éliminer les foyers. Sa gestion et son fonctionnement sont, depuis 2008, sous la seule responsabilité du Service de la Perliculture.

2. Le modèle biologique : *Pinctada margaritifera* var. cumingii (Linné 1758)

2.1. Systématique et phylogénie du genre *Pinctada*

L'huître perlière *P. margaritifera* (Linné, 1758) var. *cumingi* (Jameson, 1901) est un mollusque bivalve communément appelé huître perlière à lèvres noires, nacre ou parau en Polynésie française, appartenant à la famille des *Pteriidae* (Table 2). La taxonomie du genre *Pinctada* est complexe car les espèces appartenant à ce genre sont très ressemblantes entre elles (Masaoka and Kobayashi, 2005). Il existe de ce fait peu de caractères morphologiques disponibles bien distincts disponibles pour leur détermination (Southgate and Lucas, 2008). Bien que l'espèce *P. margaritifera* soit polyphylétique entre spécimens de l'ensemble de son espace de répartition, il semble que les spécimens *P. margaritifera* de Polynésie française appartiennent bien à un même groupe monophylétique, et ce malgré la grande dispersion géographique des îles et atolls où ils vivent (Cunha *et al.,* 2010).

Table 2. Classification taxonomique de l'espèce *P. margaritifera* var. *cumingii*

Embranchement	Mollusca (Cuvier, 1795)
Classe	*Bivalvia* (Linné, 1758)
Sous-classe	*Ptériomorphia* (Beurlen, 1944)
Ordre	*Pterioida* (Newell, 1965)
Super-famille	*Pterioidea* (Gray, 1948)
Famille	*Pteriidae* (Gray, 1948)
Genre	*Pinctada* (Röding, 1798)
Espèce	*margaritifera* (Linné, 1758)
Variété	*cumingii* (Jameson, 1901)

Source : *NCBI taxonomy database. P. margaritifera* var *cumingii = Taxonomy ID: 180451*

2.2. Répartition géographique

P. margaritifera est une espèce largement répandue dans l'écosystème corallien de l'Indo-Pacifique, de la Mer Rouge à l'Amérique centrale (figure 4) (Cunha *et al.,* 2010). La variété *cumingii* est particulièrement abondante dans les lagons de Polynésie française, principalement dans les atolls des Tuamotu et des Gambier, où elle est élevée en aquaculture pour la production nacrière et perlière.

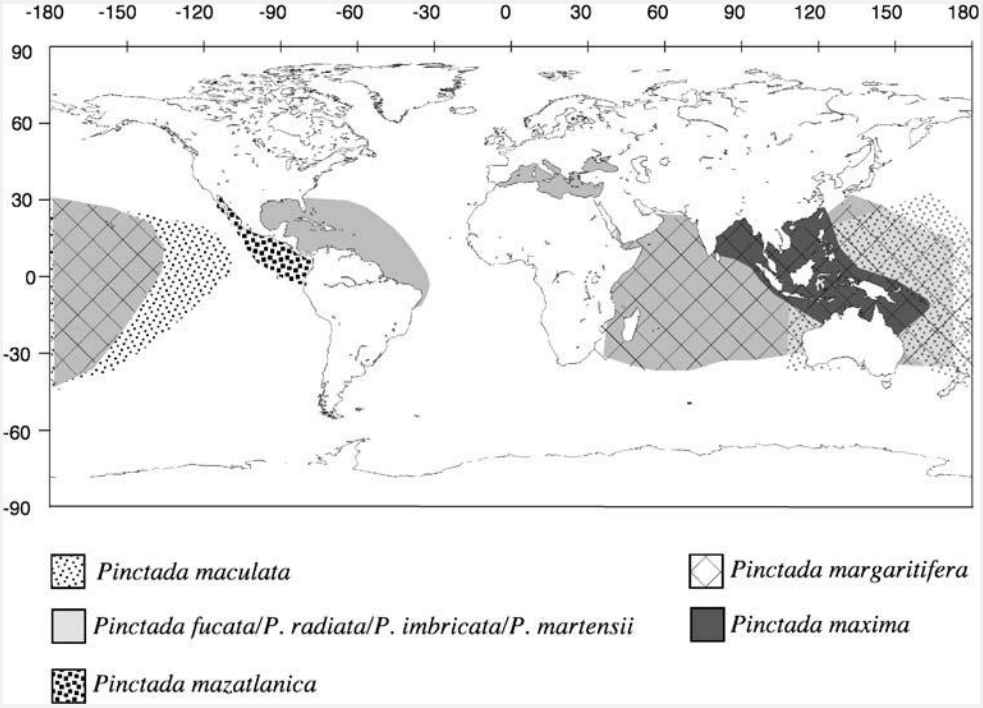

Figure 4. Répartition géographique des principaux représentants du genre *Pinctada*. Tiré de (Cunha *et al.,* 2010). L'huître perlière *P. margaritifera* est une espèce indopacifique. Elle vit dans les eaux côtières du Pérou, de Panama, de l'Indonésie, de la Micronésie, de la mer Rouge, des Philippines et d'Okinawa au Japon, ainsi qu'en Polynésie française, principalement dans les archipels des Tuamotu, des Gambier, des Cook et des îles Fidji.

2.3. Morphologie et anatomie

2.3.1. La coquille

La coquille du bivalve *P. margaritifera* se compose de deux valves symétriques (droite et gauche), dont la largeur moyenne chez un individu adulte est d'environ 12 cm, mais qui peut atteindre jusqu'à 30 cm. On distingue une zone dorsale (au niveau de la charnière), une zone ventrale, une région antérieure (du côté du byssus) et une région postérieure (figure 5a). La face externe de la coquille est de nature prismatique, de couleur foncée, et présente des stries se terminant par des barbes de croissance à la périphérie (figure 5a). La coquille de *P. margaritifera* est nacrée sur sa face interne, à l'exception de la partie périphérique, de même nature que la face externe. La bordure de la couche nacrée présente des irisations le plus souvent vertes, roses, jaunes et/ou roses (figure 5a). De l'extérieur vers l'intérieur, la coquille de *P. margaritifera* se compose successivement des trois couches suivantes : le périostracum, la couche prismatique et la couche nacrée (figure 5b).

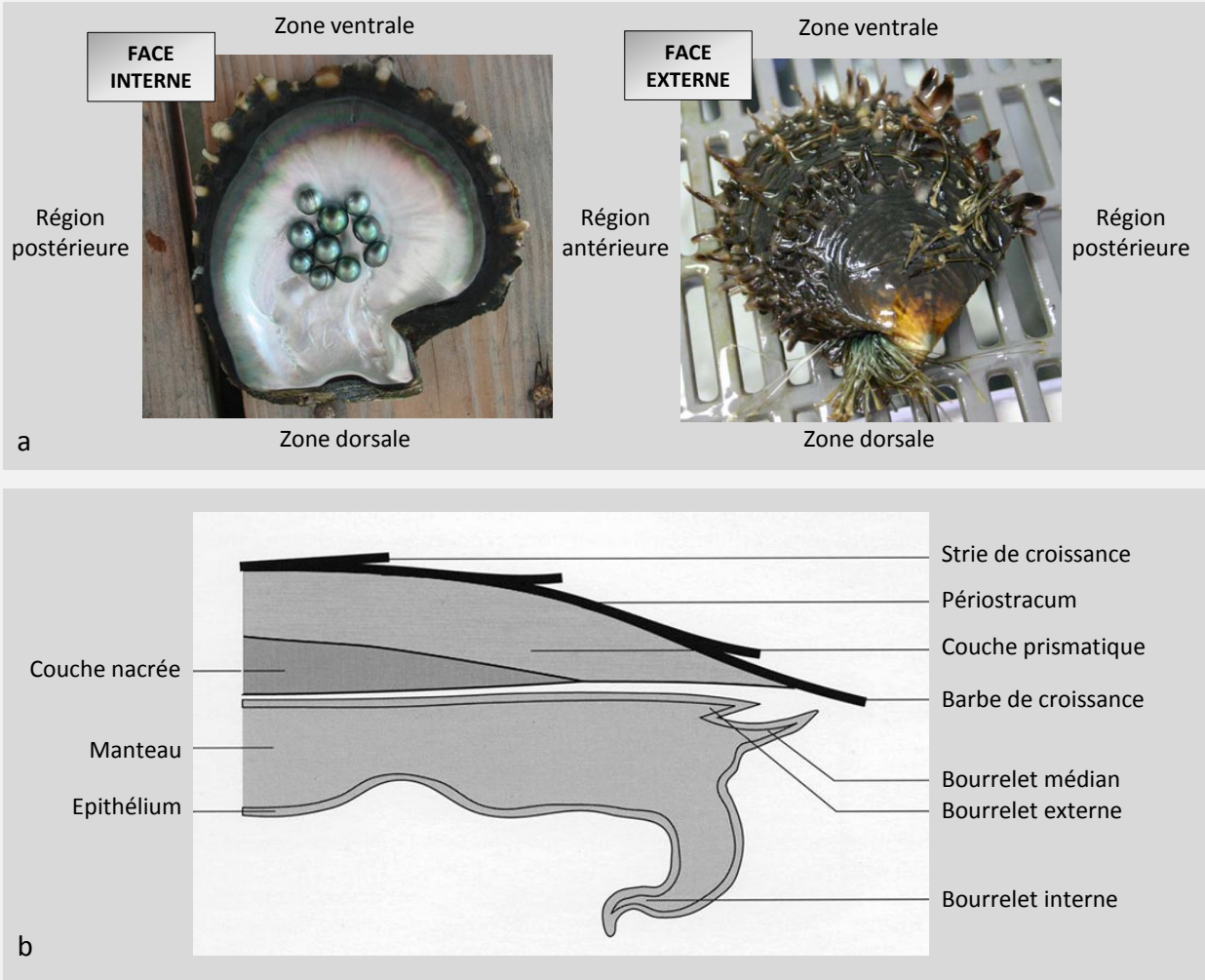

Figure 5. Coquille de l'huître perlière *P. margaritifera*. *P. margaritifera* est composée de 2 valves symétriques. **a** : face interne nacrée et face externe prismatique de la coquille. On distingue une zone dorsale (au niveau de la charnière), une zone ventrale, une région antérieure (du côté du byssus) et une région postérieure. **b**: coupe de la coquille et du manteau. De l'extérieur vers l'intérieur, la coquille de *P. margaritifera* se compose successivement du périostracum, de la couche prismatique et de la couche nacrée (Photos : Ifremer, schéma : Service de la Perliculture).

2.3.2. Les parties charnues

Les parties charnues comprennent les organes de l'animal (figure 6a) et représentent environ 20% de la masse d'un individu. Le manteau et la poche perlière sont deux organes particulièrement sollicités dans le domaine de la perliculture. Le manteau, organe le plus externe, enveloppe tous les organes de l'animal. Il est formé de deux lobes palléaux qui tapissent l'intérieur de chaque valve. Soudés à la masse viscérale et au muscle adducteur, ils se rejoignent dorsalement le long de la charnière pour former l'isthme (figure 6b). La poche perlière est située dans la partie viscérale, sous les muscles rétracteurs du pied et du byssus. Elle est une extension de la gonade d'aspect translucide et de taille variable selon les individus (figure 6c). Elle se présente sous forme d'une lame de tissu aplatie latéralement et pouvant être pigmentée. Mis à part la boucle intestinale située dans sa partie postérieure et au niveau de son attachement à la masse viscérale, la poche ne contient aucun organe vital. En période de maturité sexuelle de l'animal, elle peut être presque totalement envahie par la gonade. Des observations histologiques montrent que la poche perlière est une lame de tissu conjonctif, enveloppée de couches musculaires et limitée par un épithélium (Cochennec-Laureau *et al.,* 2010). Le tissu conjonctif très lâche renferme de nombreuses lacunes sanguines, quelques vaisseaux sanguins et quelques filets nerveux.

P.margaritifera présente un système circulatoire ouvert constitué d'un cœur et de vaisseaux sanguins (veines et artères) qui assurent la circulation de l'hémolymphe à travers les tissus conjonctifs (Southgate and Lucas, 2008). L'hémolymphe est composée de plasma et d'hémocytes circulants capables d'infiltrer les tissus. Les hémocytes jouent un rôle fondamental dans le maintien des fonctions vitales de l'huître perlière, telles que le transport de l'oxygène et des nutriments vers les tissus, ou l'élimination des déchets. Ils sont les médiateurs du système immunitaire, et sont également impliqués dans les processus de recalcification de la coquille (Cheng *et al.,* 1996).

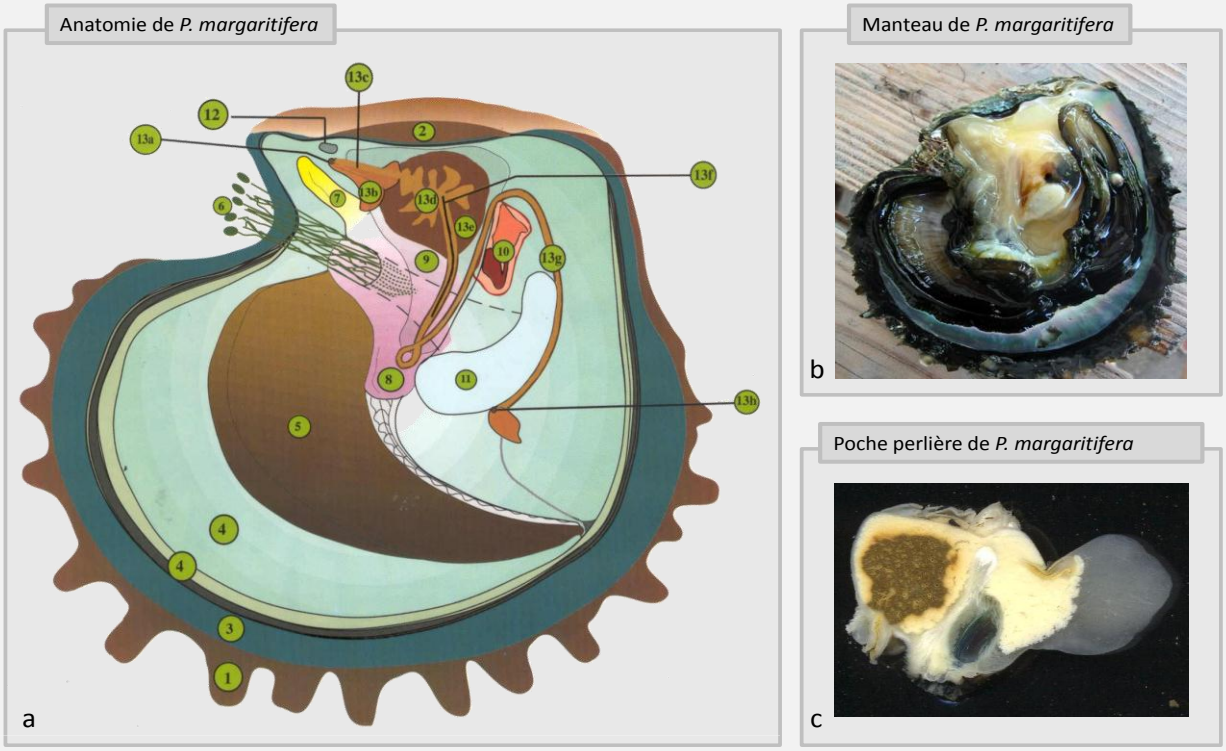

Figure 6. Anatomie de l'huître perlière *P. margaritifera* (valve droite). **a** : 1: barbe de croissance. 2: ligament. 3: couche nacrée. 4: manteau. 5: branchies. 6: byssus. 7: pied. 8: poche perlière. 9: gonade. 10: cœur. 11: muscle adducteur. 12: muscle élévateur du pied. 13: tube digestif. 13a: bouche. 13b: palpes labiaux. 13c: œsophage. 13d: estomac. 13e: glande digestive. 13f: stylet cristallin. 13g: intestin. 13h: anus. **b** : manteau. **c** : coupe transversale de la gonade et de la poche perlière. (Illustration : EVAAM-Service de la Perliculture ; Photos manteau : Ifremer ; Photos poche perlière : G. Le Moullac).

2.3.3. Nutrition

P. margaritifera, comme tous les bivalves filibranches, est un organisme filtreur suspensivore, qui se nourrit grâce à ses branchies en captant les particules en suspension dans la colonne d'eau (matière organique particulaire) (Lecointre *et al.,* 2007). Les branchies ont une surface pouvant aller jusqu'à 12000 mm², pour un poids représentant environ 30% du poids total des partie charnues d'un individu adulte (Pouvreau *et al.,* 1999). Les branchies sont formées de filaments munis de nombreux cils. Le battement synchrone de ces cils provoque un courant d'eau qui traverse les branchies, qui retiennent et dirigent les particules vers les palpes labiaux où un tri est réalisé en fonction de leur taille. Les particules d'un diamètre supérieur à 200 µm sont rejetées, enveloppées de mucus et évacuées sous forme de pseudofèces. Les particules alimentaires ingérables sont amenées à la bouche, digérées et les résidus sont rejetés sous formes de fèces (figure 7).

Afin de pallier à la pauvreté en matière organique particulaire (ou oligotrophie) du milieu lagonaire (Sournia *et al.,* 1976), les huîtres perlières ont développé une capacité de filtration très importante, de l'ordre de 22 L/h/g (Pouvreau *et al.,* 2000b). Par comparaison, les moyennes de filtration chez une autre espèce de bivalves *Crassostrea gigas* sont de l'ordre de 3,9 L/h/g (Bougrier *et al.,* 1995). Le taux de rétention d'un individu *P. margaritifera* adulte est ainsi compris entre 15% pour les particules de type picoplancton (taille comprise entre 0,2 et 2 µm), pourtant abondantes dans le milieu lagonaire, et 98% pour les particules de type nanoplancton (taille comprise entre 2 et 20 µm) (Pouvreau *et al.,* 1999). L'alimentation de *P. margaritifera* se compose ainsi à 90% de nanoflagellés (végétaux unicellulaires du phytoplancton ayant une taille comprise entre 2 et 20µm) (Dupuy *et al.,* 2009).

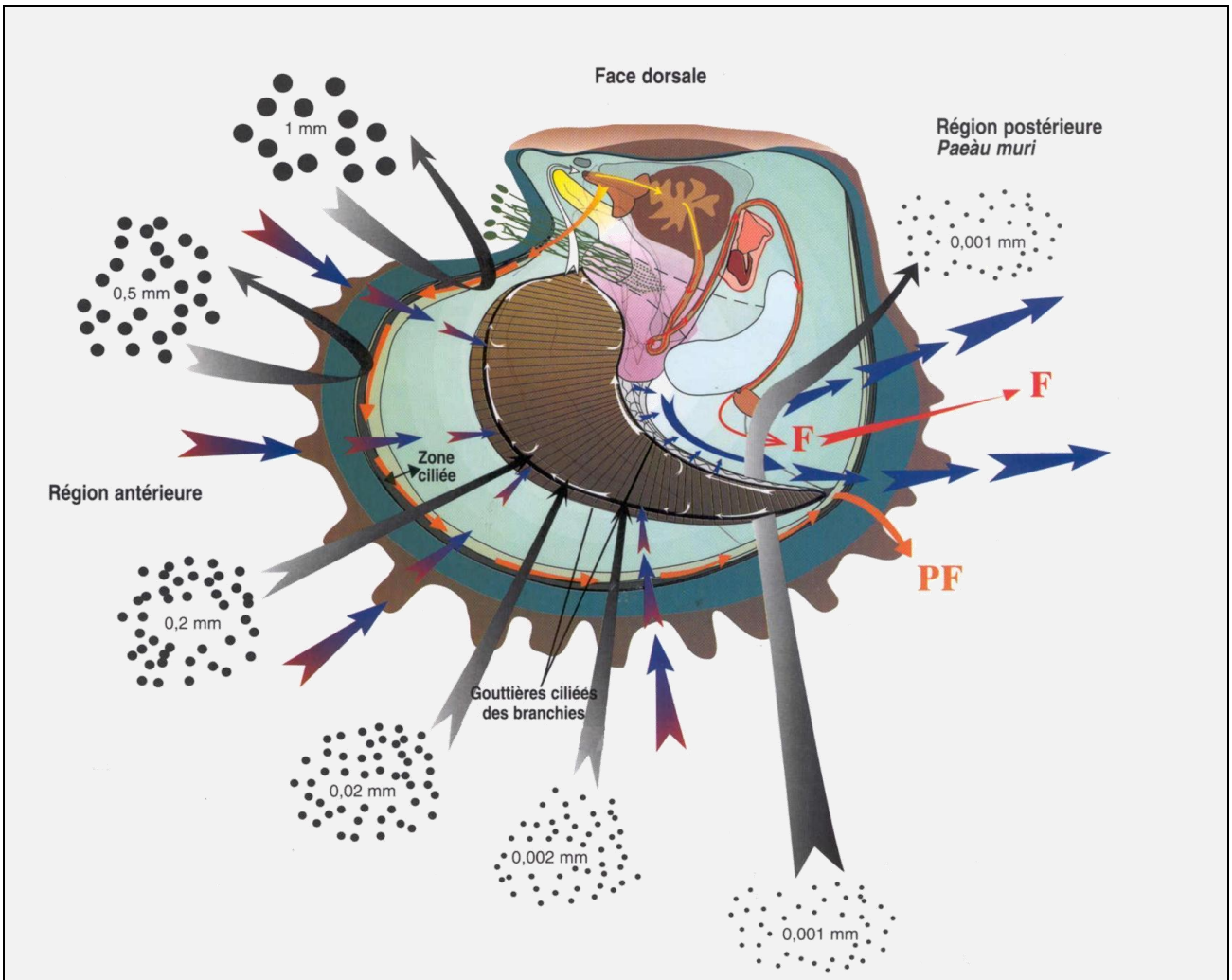

Figure 7. Nutrition de l'huître perlière *P. margaritifera*. *P. margaritifera* est un bivalve qui crée des courants grâce à ses cils et ses branchies qui captent les particules d'eau en suspension. Celles dont la taille est comprise entre 2 et 20 µm sont retenues par l'animal, puis triées. Les particules alimentaires sont ensuite ingérées. PF : pseudofèces ; F : fèces ; flèche bleue : courant d'eau entrant ; flèche rouge et bleue : courant d'eau sortant ; flèche noire : trajet des particules ; flèche blanche : trajet des particules captées ; flèche jaune : trajet des particules ingérées ; flèche orange : trajet des pseudofeces ; flèche rouge : trajet des fèces. (Illustration: EVAAM-Service de la Perliculture).

2.3.4. Reproduction et cycle de développement

P. margaritifera est un organisme hermaphrodite protandre, mâle dans les premières années de sa vie, puis femelle ensuite. Le sex-ratio s'équilibre avec l'âge. Des individus bisexués peuvent être rencontrés, mais leur petit nombre suggère que l'inversion sexuelle doit être un phénomène rapide. Cette espèce est instable sexuellement : quand les conditions du milieu sont favorables (température et nutrition notamment), le pourcentage de femelles sera plus important. En revanche, si les animaux sont stressés (mauvaises conditions de température ou de nutrition, manipulations lors du nettoyage des coquilles, transfert), la proportion de femelles diminue (Thielley *et al.,* 1993).

Le cycle biologique de *P. margaritifera* correspond au cycle classique des bivalves (figure 8). La maturité sexuelle est atteinte en 1 an ou moins, avec un développement gonadique plus important lors de la deuxième année (Thielley *et al.,* 1993; Pouvreau *et al.,* 2000c). La gamétogenèse est rapide (environ 1 mois), et s'observe toute l'année avec un asynchronisme important (Gervis and sims, 1992; Pouvreau *et al.,* 2000c). Lors d'une période de ponte, entre 500 millions et 5 milliards de gamètes mâles (spermatozoïdes de 5 µm) et 40 et 50 millions de gamètes femelles (ovules de 50 µm) sont émis dans l'eau. Ces émissions de gamètes représentent environ 10% du poids total de chair d'un individu (Pouvreau *et al.,* 2000c). La fécondation est externe, et donne naissance à des larves trochophores, véligères puis pédivéligères (ou larves oeillées) évoluant au sein des masses d'eau. Après une phase planctonique d'environ trois semaines (Doroudi *et al.,* 2003), la larve se métamorphose en post-larve puis en naissain (d'environ 250 µm) alors capable de se fixer à divers supports par l'intermédiaire d'un byssus. Dans la nature, les supports sont rares et les prédateurs nombreux, la mortalité des juvéniles est ainsi très grande. L'animal compense ce handicap par une fécondité extraordinairement élevée. En perliculture, des collecteurs sont disposés dans les lagons pour collecter les naissains de *P. margaritifera*. Une fois installées, les huîtres perlières présentent une forte croissance, particulièrement dans les premières années. Elles atteignent en moyenne 12 cm en 2 ans. La croissance reste cependant fortement variable entre les individus et entre les populations des différents atolls (Pouvreau and Prasil, 2001).

3. Processus de biominéralisation : considérations générales

La biominéralisation est un phénomène largement répandu au sein du monde vivant, et les processus de biominéralisation apparaissent extrêmement variés, à divers point de vue. En effet, les exemples pouvant illustrer ce phénomène sont très nombreux et diversifiés, tant du point de vue du type de biominéral formé et de sa fonction, que du point de vue des espèces exploitant ce processus, puisqu'on y trouve des représentants dans chacune des trois branches de l'arbre du vivant : Bacteria, Archea et Eukarya (Lecointre and Le Guyader, 2007).

Ce phénomène a passionné les scientifiques dès le 17ème siècle, dès lors qu'ils ont eu l'opportunité d'explorer « l'infiniment petit » par des observations macro- et microscopiques des structures biominéralisées (Marin, 2009). L'identification progressive des composants majeurs des structures biominéralisées a permis d'aboutir dans les années 50 à la notion de matrice organique. Cette notion fondamentale cristallise l'idée selon laquelle l'élaboration d'une structure biominéralisée est en réalité dirigée par les constituants qui la compose. Pour autant, la terminologie « Biomineralization » n'apparaît pour la première fois dans la littérature qu'en 1970 (Marin, 2009). Elle définit une discipline qui s'attache à décrire les composants de la matrice à l'origine de ce processus, ainsi que les structures biominéralisées qui en résultent. Il s'avère que l'étude de ce phénomène requiert en réalité des approches disciplinaires très variées du fait de la structure composite des biominéraux (organique et minérale), et de leur grande diversité de nature, de structure et de fonction. C'est d'ailleurs ainsi que la biominéralisation est abordée, c'est-à-dire du point de vue des biominéraux construits, et des éléments qui les composent. Mais dès les années 80, le regard change sur la biominéralisation, qui est alors abordée sous l'angle des processus physiologiques, cellulaires et moléculaires à l'origine de ce phénomène. Cette nouvelle façon d'aborder ce processus permet alors de définir deux « types » de biominéralisation : la biominéralisation induite et la biominéralisation contrôlée. Dans ce chapitre, les concepts clés qui sont évoqués ici sont décris plus en détails.

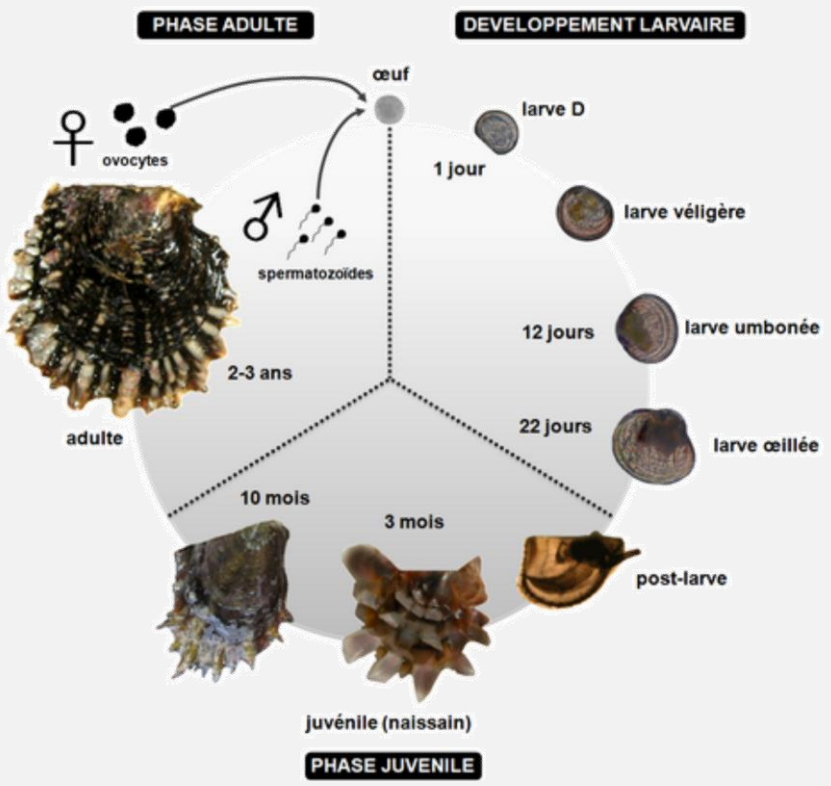

Figure 8. Cycle de développement de l'huître perlière *P. margaritifera*. Lors d'un période de ponte, entre 40 à 50 millions de gamètes femelles sont émises dans l'eau. La fécondation est externe, et donne naissance à des larves trochophores, véligères puis pédivéligères (ou larve oeillées) évoluant au sein des masses d'eau, correspondant au stade larvaire. Après une phase planctonique d'environ trois semaines, la larve se métamorphose lors de sa phase juvénile en post-larve puis en naissain alors capable de se fixer à divers supports par l'intermédiaire d'un byssus. Une fois installées, les huîtres perlières présentent une forte croissance, particulièrement dans les premières années. Elles atteignent en moyenne 12 cm en 2 ans. (Schéma : C. Linard (2010), d'après Y. Thomas (2009)).

3.1. Biomineralisation(s): Définition générale d'une vaste discipline

Selon la définition de Stephen Mann en 2001 (Mann, 2001), « la biominéralisation est l'étude de la formation, de la structure et des propriétés des solides inorganiques déposés par un système biologique » :

"Biomineralization: The study of the formation, structure and properties of inorganic solids deposited in biological systems ". In Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry (Mann, 2001).

Cette définition est ambigüe, puisque qu'elle désigne une discipline qui s'attache à décrire à la fois le processus dynamique de biominéralisation par lequel un organisme vivant élabore une structure minéralisée, et à la fois l'analyse descriptive (structurale et fonctionnelle) des tissus biominéralisés synthétisés eux-mêmes.

La définition se complique un peu plus si l'on admet que le terme de biominéralisation couvre un domaine de recherche interdisciplinaire très vaste, qui requiert des approches techniques variées issues tant de l'analyse du minéral que de l'organique : Paléontologie, Géologie, Minéralogie, Cristallographie, Biophysique, mais aussi Biochimie, Histologie, et plus récemment, Génomique et Biologie moléculaire … Il serait donc plus juste de parler de « Biominéralisations » au pluriel. Mais au-delà de ces considérations, il est également intéressant de noter que cette discipline intéresse en retour pour ses applications potentielles des domaines tels que le Biomédical (ostéologie, odontologie…) et l'Ingénierie industrielle (technologie des matériaux, construction, nanotechnologies…) via la fabrication de produits biomimétiques répliquant les propriétés des biominéraux.

3.2. Diversité des types de biominéraux

Selon la définition de Stephen Mann en 2001 (Mann, 2001), « les biominéraux sont les produits issus de captage sélectif d'éléments dans l'environnement et de leur incorporation sous contrôle biologique au sein de structures fonctionnelles » :

"Biominerals are the products of the selective uptake of elements from the local environment and their incorporation into functional structures under strict biological control". In Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry (Mann, 2001)

Cette définition met clairement l'accent sur le rôle fonctionnel des biominéraux en tant que structure, mais ne donne pas de vision très claire de leur composition. Une définition proposée en 2003 par Skinner (Skinner and Jahren, 2003) est certes plus vague quant à la fonction des biominéraux, mais précise sans ambigüité que les structures sont élaborées à partir d'ions minéraux. Sa définition est la suivante : « La biominéralisation est un processus par lequel un organisme vivant entraine la précipitation de matériel d'origine minérale » :

"Biomineralization is the process by which living forms influence the precipitation of mineral materials". In Biomineralization, Treatise on Geochemistry (Skinner, H. C. W. Jahren, A. H., 2003)

Dans leur ouvrage *On Biomineralization*, H. A. Lowensteim and S. Weiner répertorient 62 biominéraux répartis dans 55 phylums différents (Lowenstam and Weiner, 1989). Cette diversité s'explique en partie par l'abondance des ions minéraux disponibles et intégrés au sein des structures biominéralisées. En effet, parmi la vingtaine d'éléments essentiels aux organismes vivants, l'hydrogène (H), le carbone (C), l'oxygène (O), le magnésium (Mg), la silice (Si), le phosphore (P), le souffre (S), le calcium (Ca), le manganèse (Mn) et le fer (Fe) sont des constituants fréquents de ces différents biominéraux (Mann, 2001). Le calcium et le phosphore en particulier tiennent une place prépondérante, puisque qu'ils sont les constituants de respectivement 50% et 25% des biominéraux identifiés à ce jour (Lowenstam and Weiner, 1989). Le statut privilégié du calcium peut en partie s'expliquer par le fait que les mécanismes cellulaires impliquant la capacité à lier le calcium et à en réguler les concentrations intracellulaires ont été acquis très tôt au cours de l'évolution (Knoll, 2003). Le terme très longtemps repandu de « calcification » illustre d'ailleurs parfaitement cette propriété.

Les biominéraux les plus abondants sont les biominéraux carbonatés (carbonate de calcium), les biominéraux phosphatés (phosphate de calcium), les biominéraux siliceux (silica) et les biominéraux composés d'oxydes de fer (Lowenstam and Weiner, 1989). Les biominéraux carbonatés sont prédominants au sein des invertébrés et sont les plus représentés en terme de diversité taxonomique (figure 9). En revanche, il existe une plus grande diversité de type de biominéraux phosphatés (prédominants au sein des vertébrés).

Enfin, il existe des formes polymorphes d'un même minéral (Mann, 2001). Ces polymorphes ont la même formule chimique mais diffèrent de par leur structure cristalline. Ils présentent de ce fait des propriétés physiques et chimiques différentes (Morse *et al.,* 2007). Ces structures polymorphes peuvent éventuellement être biosynthétisées par un même organisme, comme par exemple la calcite et l'aragonite, respectivement formes rhomboédrique et orthorhombique du carbonate de calcium ($CaCo_3$), que l'on retrouve dans des zones bien distinctes des coquilles nacro-prismatiques de certains bivalves, tels que *P. margaritifera*.

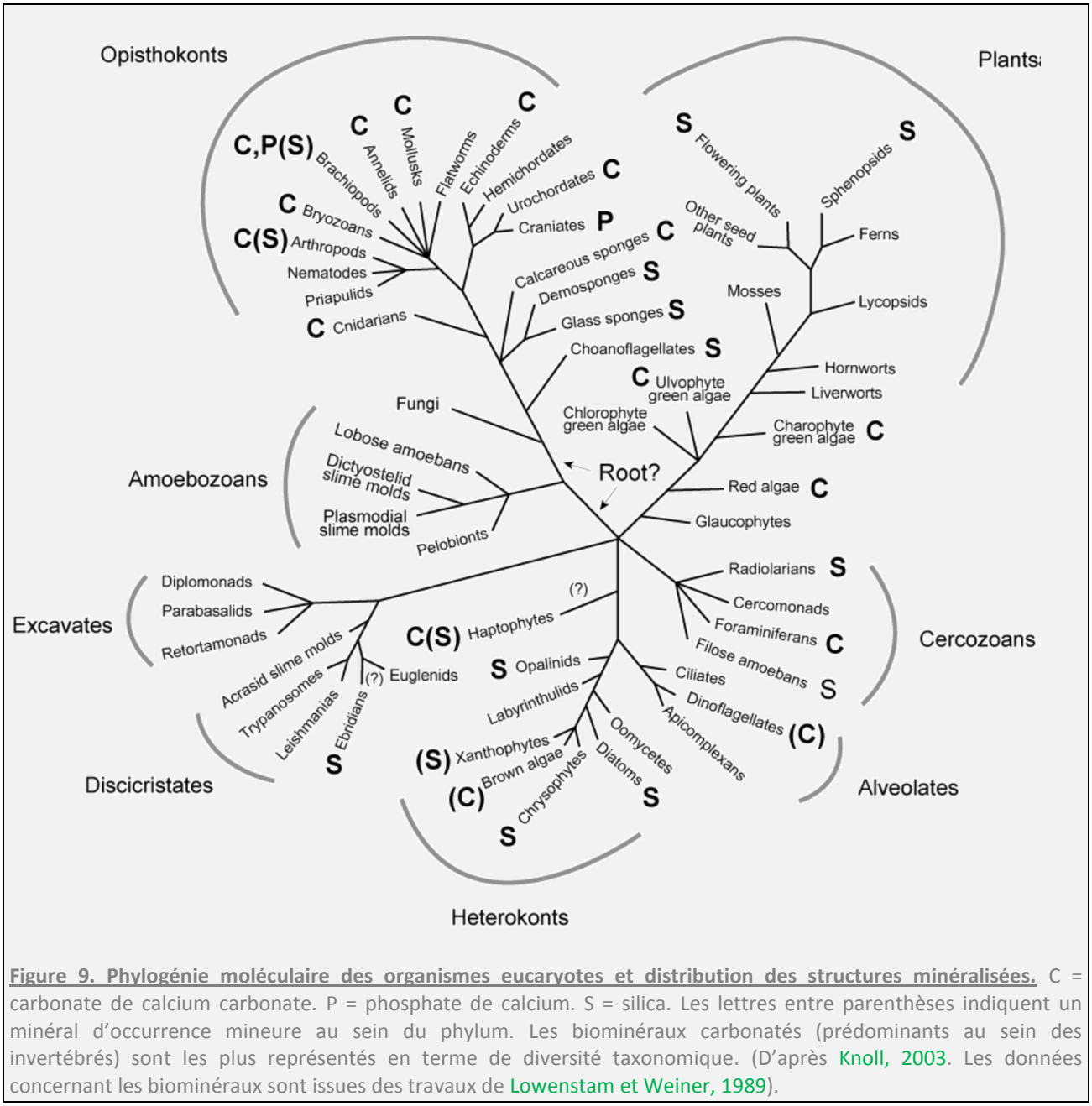

Figure 9. Phylogénie moléculaire des organismes eucaryotes et distribution des structures minéralisées. C = carbonate de calcium carbonate. P = phosphate de calcium. S = silica. Les lettres entre parenthèses indiquent un minéral d'occurrence mineure au sein du phylum. Les biominéraux carbonatés (prédominants au sein des invertébrés) sont les plus représentés en terme de diversité taxonomique. (D'après Knoll, 2003. Les données concernant les biominéraux sont issues des travaux de Lowenstam et Weiner, 1989).

3.3. Diversité des fonctions biologiques des biominéraux

Les biominéraux, de part leur structure composite organo-minérale, possèdent des propriétés mécaniques de résistance exceptionnelles. La nacre possède par exemple une pression de rupture 10 fois supérieure à celle du béton (Katti 2006). Cette propriété confère un avantage évolutif indéniable aux espèces qui développent les processus de biominéralisation. Ainsi, une des fonctions majeures des structures biominéralisées est de constituer un support mécanique à diverse fonctions biologiques, telles que le maintien ou la motion (squelette des vertébrés) ou encore la préhension ou le broyage de la nourriture (dents, lanterne d'Aristote des oursins …).

Mais la biominéralisation offre bien plus qu'un support structural. Cette construction de la nature joue un rôle dans une variété de fonctions biologiques d'importance, telles que : la protection contre les prédateurs (coquilles des mollusques), l'isolement par rapport au milieu extérieur (la coquille d'œuf), la perception de la gravité (statolithes), ou encore le stockage d'ions minéraux … (Lowenstam and Weiner, 1989). Par exemple, la perception de la gravité (ou pesanteur) est un phénomène très largement rependu au sein du vivant. Le bon fonctionnement de cette fonction assure le maintien de l'équilibre. Le statocyste (ou otocyste), organe de l'équilibre, est un mécanorecepteur stimulé par la gravitation. Il constitue une cavité renfermant un liquide interne (endolymphe) qui contient une concrétion minérale de carbonate de calcium ($CaCO_3$) (statolithes) servant à l'équilibration. La plupart des mollusques (dont les Gastéropodes, les Céphalopodes et les Bivalves) possèdent une paire de statocystes localisés à proximité de ganglions cérébroides, dont le statolithe est composé de sphérules calcaires (ou statoconies) cerclée d'une fine matrice organique (Cragg *et al.,* 1977; Williamson *et al.,* 2004; Sakakibara, 2006; Tanzarella, 2006). Un autre exemple qui peut être cité ici est le cas des biominéraux qui constituent des formes de stockages des ions. C'est le cas des ions ferreux (Fe), éléments essentiel aux organismes vivants mais néanmoins toxiques à certaines concentrations, qui nécessitent d'être pris en charge dans la cellule par un système de stockage efficace. Ce rôle est tenu par la Ferritine, une protéine intracellulaire ubiquitaire qui stocke les ions Fe et les restitue de façon contrôlée en fonction des besoins cellulaires (Iancu, 2011).

3.4. Concept, définition et rôle de la matrice organique

D'après H. A. Lowensteim and S. Weiner dans leur ouvrage *On Biomineralization*, le terme de matrice organique (*organic matrix*) apparait pour la première fois dans la littérature en 1945 (Lowenstam and Weiner, 1989), introduite par Le Gros Clark pour décrire les phénomènes de biominéralisation des os (Le Gros Clark, 1945). La matrice est définie comme un ensemble cohérent de composants organiques sécrétés lors de la mise en place du processus de biominéralisation, et dont la fonction est d'agir en synergie pour exercer un contrôle biologique sur l'élaboration d'une structure biominéralisée. Dans les années 50, des analyses biochimiques de diverses matrices organiques (os, dents, coquilles de mollusques …) permettent d'en identifier les principaux composants: ils sont essentiellement protéiques, mais également polysaccharidiques et lipidiques. Aujourd'hui, un grand nombre de composants organiques de la matrice ont pu être identifiés grâce à la mise en place d'approches biochimiques, protéomiques, et plus récemment, génomiques. Notons néanmoins que la majorité des informations recueillies sont relatives aux « modèles » de la biominéralisation, à savoir les biominéraux phosphatés que sont les os et les dents. Les informations recueillies sur les constituants des biominéraux carbonatés concernent essentiellement les coquilles des mollusques (Marin *et al.,* 2008), et l'endosquelette et les spicules des oursins (Wilt, 2002; Mann *et al.,* 2008) qui, bien qu'encore parcellaires, sont en constante augmentation.

Chez les mollusques, le manteau est l'organe à l'origine de la synthèse de la matrice organique. Ces composants, ainsi que les processus de biominéralisation qu'ils régulent, sont décris plus en détails dans le paragraphe : « Processus de biominéralisation de la coquille et de la perle chez les mollusques, le cas de *Pinctada margaritifera* ».

3.5. Biominéralisation induite ou controlée

La distinction entre la biominéralisation induite et la biominéralisation contrôlée a été introduite par S. Mann en 1983 (Mann, 1983). Elle remplace celle qui opposait les biominéralisations dites « squelettiques » aux biominéralisations « non-squelettiques » (Marin, 2009). Ce nouveau regard, plus fondamental, a permis d'aborder la biominéralisation sous l'angle du processus physiologique et moléculaire se déroulant au sein des organismes, et non plus en fonction de la structure minéralisée élaborée.

3.5.1. Biominéralisation induite

Selon Stephen Mann (2001), la biominéralisation biologiquement induite est « la précipitation fortuite d'un minéral inorganique résultant de l'interaction entre le métabolisme d'un organisme et son environnement » :

"Biologically induced mineralization: In biologically induced mineralization, inorganic minerals are deposited by adventitious precipitation, which arise from secondary interactions between various metabolic processes and the surrounding environment". In Biomineralization, *Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry (Mann, 2001).*

Ajoutons à cette définition que ce processus ne requiert pas de machinerie cellulaire ou moléculaire dédiée, et qu'il résulte du fonctionnement métabolique d'un organisme en condition physiologique. La biominéralisation induite n'entraîne donc aucun surcout énergétique pour la cellule, et le biominéral formé (de structure identique ou similaire de celle du cristal formé de façon abiotique) dépendra des conditions environnementales dans lesquelles se trouve l'organisme concerné (Lowenstam and Weiner, 1989). En outre, il convient de souligner que ces critères ne permettent pas de définir un processus biologique ou chimique bien particulier, mais regroupent un large spectre très hétérogène de processus de biominéralisation induite.

La biominéralisation induite est apparue très tôt au cours de l'histoire de la vie (Archéen inférieur, il y a 3,5 milliards d'années) avec l'apparition des stromatolites (constructions biogéniques laminaires carbonatées ou siliceuses). Elle se rencontre ainsi chez les eubactéries, notamment les cyanobactéries photosynthétiques à l'origine de la formation des fameux stromatolites ; les "algues", telles que les algues brunes du genre *Padina* (Okazaki, 1986), les algues vertes du genre *Halimeda* (Demes *et al.,* 2009), ou l'algue rouge *Galaxaura oblongata* (Mu and Rinding, 1999), dont les dépôts de carbonate de calcium extra-, inter- ou intracellulaires participent à leur maintien ; les lichens, tel *Pertusaria corallina* (Jones and Wilson, 1986) ; mais également chez certains mollusques, comme par exemple le cas du bec du Nautile (Lowenstam *et al.,* 1984) (figure 10).

3.5.2. Biominéralisation contrôlée

Selon Stephen Mann (2001), la biominéralisation biologiquement contrôlée est un « processus hautement contrôlé permettant l'élaboration de matériaux tels que les os, les coquilles ou les dents, présentant des fonctions biologiques ainsi que des structures bien spécifiques (…). Ces biomatériaux se distinguent de par leur propriétés cristallo-chimiques spécifiques à une espèce et reproductibles » :

"Biologically controlled mineralization: highly regulated process that produces materials such as bone, shell and teeth that have specific biological functions and structures (…). These biomaterials are distinguished by reproducible and species-specific crystallochemical properties". In Biomineralization, *Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry (Mann, 2001).*

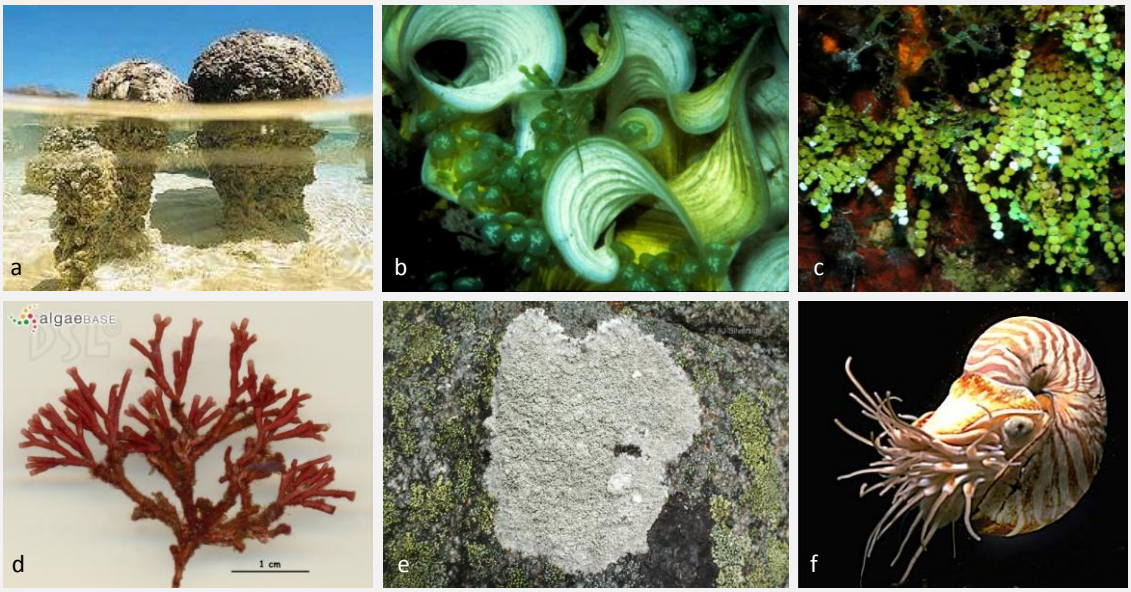

Figure 10. Exemples de biominéralisations induites. La biominéralisation induite est apparue très tôt au cours de l'histoire de la vie avec le développement des stromatolites (**a**). Elle se rencontre aussi chez les "algues", comme les algues brunes du genre *Padina* (**b**), les algues vertes du genre *Halimeda* (**c**), ou l'algue rouge *Galaxaura oblongata* (**d**), les lichens, tel *Pertusaria corallina* (**e**) mais également chez certains mollusques, comme par exemple le cas du bec du nautile (**f**). (Photos libres de droits).

Il existe un certains nombre de critères qui permettent de clairement différencier la biominéralisation induite de la biominéralisation contrôlée (Lowenstam and Weiner, 1989) :

- Contrairement à la biominéralisation induite, la biominéralisation contrôlée est un processus actif qui requiert une machinerie cellulaire et moléculaire dédiée, à la fois au sein du tissus biominéralisant, mais également à l'échelle de l'organisme entier. Elle est l'aboutissement de la mise en place d'une activité métabolique dont la mise en œuvre est couteuse en énergie. Cela implique notamment l'établissement de transports ioniques actifs et/ou le stockage d'ions, tels que le calcium (Ca^{2+}) ou le carbonate (CO_3^{2-}), contre leur propre gradient de concentration, ainsi que leur métabolisation (Fan *et al.,* 2007; Bertucci *et al.,* 2011).
- Une des conséquences directes de la mise en place d'un processus actif de biominéralisation implique que les minéraux biosynthétisés présentent une structure différente de celle des minéraux précipités de façon abiotique (Weiner and Traub, 1984). Ainsi, les organismes régulent finement le type de biominéral formé. C'est par exemple le cas des mollusques, qui contrôlent le type de polymorphe de carbonate de calcium (calcite, aragonite) qui sera intégré au sein de leur coquille.
- Les organismes ayant recours à la biominéralisation contrôlée délimitent un compartiment clos au sein duquel le minéral sera formé (Wilbur, 1984; Simkiss, 1986). Cet espace peut être intra-, inter- ou extracellulaire. Chez les mollusques, cet espace est délimité entre la coquille et l'épithélium minéralisant, scellé par le périostracum, et constitue l'espace extrapalléal.
- La biominéralisation contrôlée est dirigée par une matrice organique. Composée essentiellement de protéines, de glycoprotéines, de polysaccharides et de lipides (Marin *et al.,* 2008), elle dirige le processus séquentiel de biominéralisation (nucléation, contrôle et arrêt de la croissance des cristaux), pour être finalement incorporée au sein de la structure biominéralisée elle-même (Weiner and Traub, 1984). C'est cette caractéristique bien particulière qui confère aux structures biominéralisées des propriétés mécaniques étonnantes de solidité (Currey *et al.,* 2001; Katti and Katti, 2006).

Les biominéralisations contrôlées ont une apparition plus récente par rapport aux biominéralisations induites (apparition à la limite Protérozoïque/Cambrien) (Marin, 2009). Leur apparition constitue par ailleurs un des meilleurs indicateurs de l'explosion cambrienne de la vie. De nombreuses structures au sein de nombreux phylums illustrent ainsi ce type de biominéralisation : les squelettes des vertébrés (Zhang *et al.,* 2009), les dents (Marshall *et al.,* 1997), les spicules d'oursins (Mann *et al.,* 2008; Mann *et al.,* 2010), les coquilles des mollusques (Marin *et al.,* 2008; De Paula *et al.,* 2009), la frustule des diatomées (Brunner *et al.,* 2009) ou encore les coccolithes des coccolithophoridés (Marsh, 2003) (figure 11).

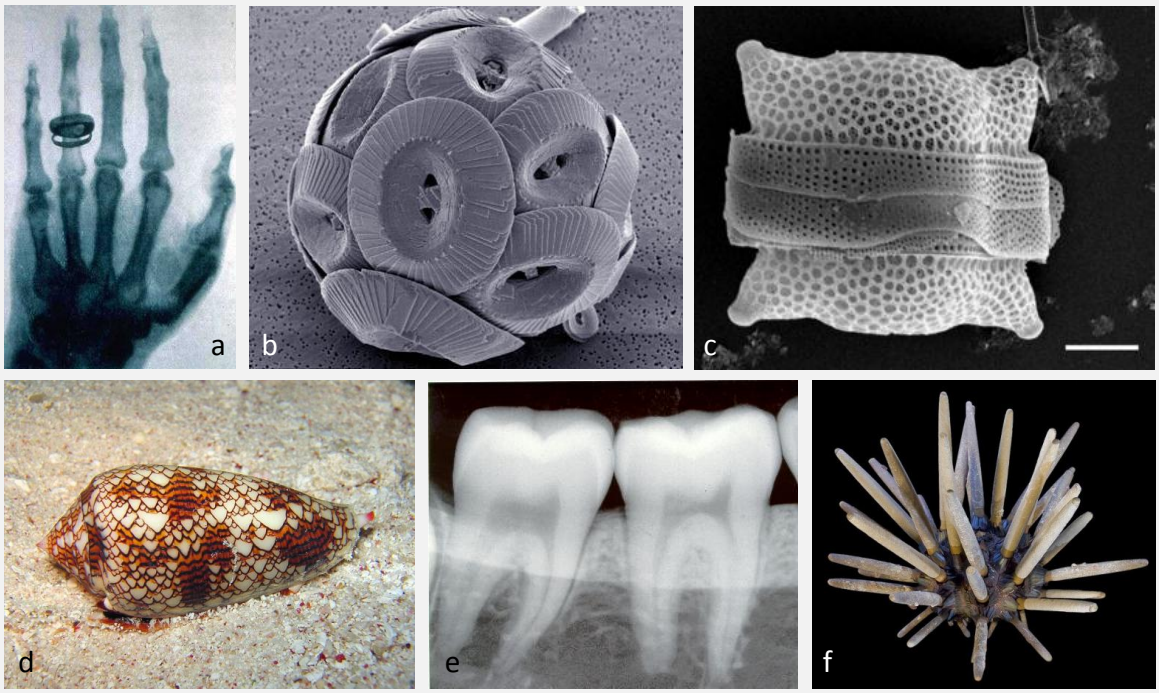

Figure 11. Exemples de biominéralisations contrôlées. De nombreuses structures au sein de nombreux phylums illustrent les phénomènes de biominéralisations contrôlées : les squelettes des vertébrés (**a**), les coccolithes des coccolithophoridés (**b**), la frustule des diatomées (**c**), les coquilles des mollusques (**d**), les dents (**e**) ou encore les spicules d'oursins (**f**). (Photos libres de droits).

4. Processus de biominéralisation de la coquille et de la perle chez les mollusques, le cas de *Pinctada margaritifera*

La formation de la coquille des mollusques est l'aboutissement de la mise en place d'un phénomène de biominéralisation contrôlée par ces organismes. Les processus de biominéralisation mis en jeu se décomposent en une série d'étapes successives qui se déroulent au sein de compartiments distincts de natures diverses (manteau, espace extrapalléal, périostracum et coquille). Ces différents compartiments ont des rôles bien spécifiques, et agissent en synergie pour élaborer la coquille. Aujourd'hui, on sait que les différents composants de la coquille s'organisent en une architecture bien précise dont l'organisation répond à une exigence structurale et fonctionnelle (Furuhashi *et al.,* 2009). En effet, les composants de la matrice constituent une structure tridimensionnelle qui sert de support à la minéralisation. Citons l'exemple de la chitine pour les mollusques (Falini and Fermani, 2004). Cependant, un certain nombre de ces composants sont eux-mêmes acteurs du processus, en jouant un rôle dans la nucléation, le contrôle et l'arrêt de la croissance des cristaux, et dans la signalisation cellulaire qui régule ces processus. Dans cette catégorie, les glycoprotéines, les protéines riches en sérine, en glycine et/ou en alanine, ainsi que les protéines acides ont fait l'objet d'un grand nombre d'études (Weiner and Addadi, 1991; Asakura *et al.,* 2006). L'analyse simultanée de l'ensemble de ces observations d'ordre physiologiques, biochimiques et microstructurales a permis d'établir des

modèles de biominéralisation de la coquille, relatifs à l'élaboration d'un polymorphe de carbonate de calcium particulier, calcite ou aragonite. Dans ce chapitre seront détaillés les différentes étapes de la biominéralisation et les différents compartiments impliqués dans l'élaboration de la coquille, les composants de la matrice organique et la structure de la coquille, ainsi que les modélisations réalisées sur les processus de biominéralisation chez les bivalves marins.

4.1. Les différentes étapes de la biominéralisation de la coquille et les compartiments correspondants

Classiquement, si l'on aborde la formation de la coquille des mollusques sous l'angle de la physiologie, le processus de biominéralisation peut se décomposer en une série d'étapes successives, à savoir : la délimitation de l'espace clos au sein duquel se déroulera le processus de biominéralisation, la synthèse de la matrice organique et, enfin, la nucléation des cristaux et la croissance contrôlée des biominéraux constituant la coquille. Ces différents étapes se déroulent au sein de compartiments distincts et de natures diverses (milieu cellulaire, liquide et solide), dont les rôles sont bien spécifiques (Wilbur and Saleuddin, 1983). L'élément central de cette mécanique est le manteau, tissu minéralisateur de la coquille, dont les cellules de l'épithélium externe (du côté de la coquille) sont le siège d'une activité génique intense aboutissant à la synthèse des composants de la matrice organique (Gong *et al.,* 2008; Jackson *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2011). Les autres compartiments sont l'espace extrapalléal, localisé entre la coquille et le manteau et délimitant l'espace de la biominéralisation, en enfin le périostracum et la coquille en elle-même où s'effectue la croissance contrôlée des biominéraux.

4.1.1. Le manteau : le tissu biominéralisateur

Le manteau est le tissu à l'origine de la formation de la coquille. C'est un tissu polarisé constitué d'un épithélium interne en contact avec les organes, et d'un épithélium externe minéralisateur (figure 12). Le fait que l'épithélium externe du manteau soit en contact direct avec la coquille est un point qui reste encore largement débattu, et qui sera développé plus loin (cf. 4.1.4). La structure interne du manteau, comprise entre les épithéliums interne et externe, est constituée de tissu conjonctif, de fibres musculaires et nerveuses, et de vaisseaux sanguins. L'extrémité du manteau (zone ventrale), se caractérise par la présence de bourrelets, qui sont au nombre de deux chez les gastéropodes (bourrelet interne et externe), et de trois chez les bivalves (bourrelets interne, médian et externe) (figure 13). Le repli entre le bourrelet le plus externe et le bourrelet interne (ou médian) constitue le sillon périostracal, à l'origine de la sécrétion du périostracum.

L'épithélium externe du manteau est à l'origine de la synthèse des constituants protéiques qui dirigent la biominéralisation et composent la coquille. Or, il existe une zonation fonctionnelle bien distincte selon un axe dorso-ventral de cet épithélium. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la biominéralisation par hybridation *in situ* (HIS) et PCR quantitative sur des cellules de l'épithélium externe de manteau a montré que ces zones étaient adjacentes et corrélées à des profils d'expression géniques bien distincts qui semblent directement liés à la nature du biominéral (polymorphe de carbonate de calcium) synthétisé au niveau de la coquille (Sudo *et al.,* 1997; Jolly *et al.,* 2004; Takeuchi *et al.,* 2006). Ainsi, chez les mollusques à coquille nacro-prismatique, les cellules minéralisatrices de la zone ventrale de l'épithélium externe du manteau sont impliquées dans la synthèse de la calcite, tandis que les cellules minéralisatrices de la zone dorsale sont impliquées dans la synthèse de l'aragonite (figure 12).

Les ions calciums et carbonates précurseurs de la biominéralisation sont puisés dans l'environnement par l'épithélium interne ou les branchies. Ils peuvent également être issus du métabolisme alimentaire où ils sont absorbés par le système digestif. Ils transitent au sein des tissus conjonctifs du manteau via l'hémolymphe (le fluide sanguin et interstitiel) et sont dirigés vers l'épithélium externe du manteau. Les ions calciums et carbonates sont exportés en solution vers l'espace extrapalléal par l'épithélium externe par l'intermédiaire de transports actifs. La présence de pompes à calcium a été montré sur le manteau de l'huître perlière *P. fucata* (Fan *et al.,* 2007). En revanche, la présence de pompes à ions carbonates n'a jamais été démontrée à ce jour chez les mollusques.

Dans certains cas, les ions calciums peuvent être temporairement stockés dans le tissu conjonctif sous forme de granules amorphes (Istin, 1970; Fleury *et al.,* 2008). Ces granules peuvent être intracellulaires (Fournié and Chétail, 1982) ou inter- et extracellulaires (Istin, 1970). Il a notamment été observé une co-localisation de l'enzyme Anhydrase carbonique et des granules (Istin and Girard, 1970). Ces granules constituent une source de calcium rapidement disponible par la cellule (Simkiss, 1993), mais également une méthode de détoxification du cytosol par piégeage des métaux toxiques dans la cellule (Simkiss, 1977). La possibilité que l'épithélium externe du manteau puisse relarguer des granules de calcium directement dans l'espace extrapalléal par exocytose est envisagée mais à l'heure actuelle non documentée.

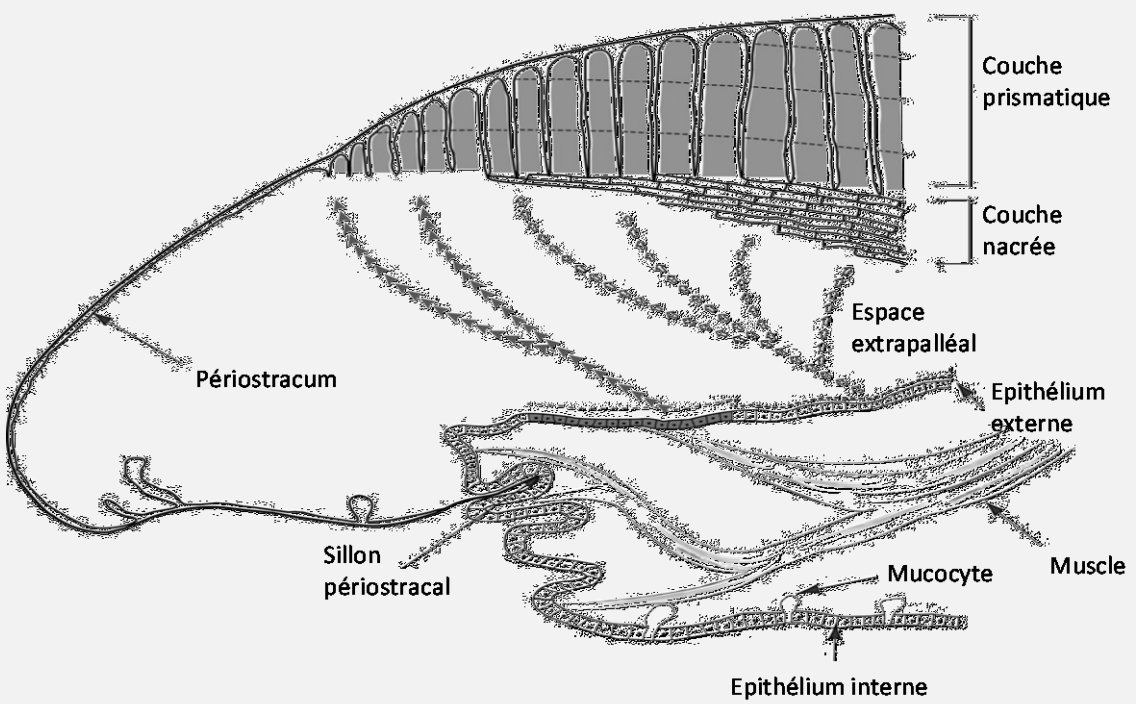

Figure 12. Compartiments de la biominéralisation de la coquille des mollusques (bivalves). Dans cette représentation, la synthèse des biominéraux est réalisée au sein de l'espace extrapalléal. Cette vision est aujourd'hui controversée puisque selon des observations récentes, l'épithélium externe du manteau serait en contact avec la coquille lors des processus de biominéralisation. Les cellules de l'épithélium externe du manteau sont à l'origine de la synthèse des composants de la matrice organique, dont l'agencement avec les ions calciums aboutissent à la synthèse des polymorphes de carbonate de calcium qui composent la coquille. Il existe une zonation fonctionnelle des cellules minéralisatrices de l'épithélium externe du manteau, aboutissant à la synthèse des différents polymorphes de carbonate de calcium, la calcite de la couche prismatique (zone grisée de l'épithélium externe) et l'aragonite de la couche nacrée (zone blanche de l'épithélium externe). Les prismes et les tablettes ne sont pas représentés à l'échelle. (Schéma : C. Joubert, d'après Marin *et al*., (2008), adapté de Saleuddin and Petit (1983)).

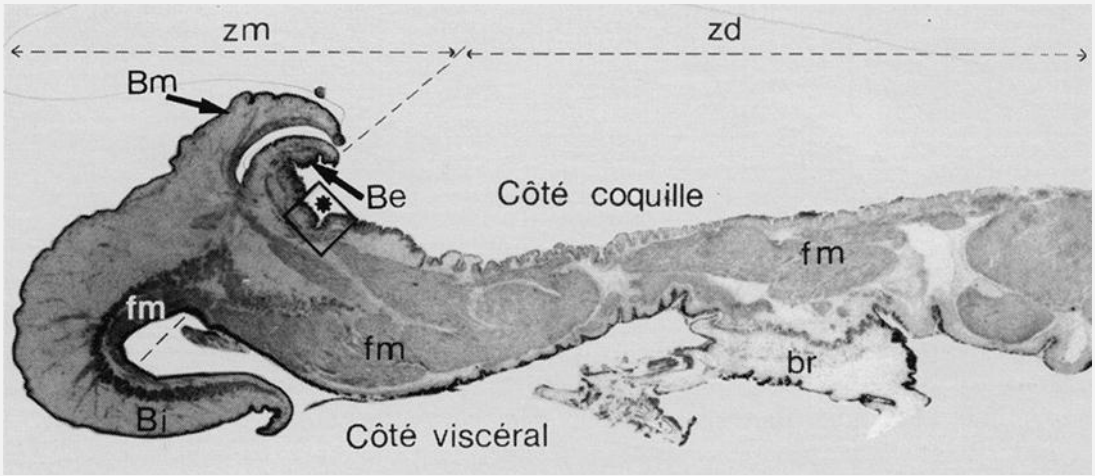

Figure 13. Coupe histologique du manteau de l'huître perlière *P. margaritifera*. zm : zone marginale ; zd : zone distale ; Be : bourrelet externe ; Bm : bourrelet médian ; Bi : bourrelet interne ; fm : faisceaux musculaires ; br : branchies. La zone annotée d'un astérisque indique la zone traditionnellement utilisée par les perliculteurs pour les découpes des greffons. (Cliché A. Fougerouse, Atlas Anatomique de l'huître perlière *P. margaritifera* (Fougerouse, 1994))

4.1.2. L'espace extra-palléal : rôle controversé de la théorie de la sursaturation et de l'existence de l'espace extrapalléal comme compartiment de la biominéralisation

Chez les mollusques, l'espace extrapalléal est un espace délimité entre la coquille et l'épithélium minéralisant, scellé par le périostracum (figure 12). Cet espace clos contient le fluide extrapalléal qui présente les conditions biochimiques requises au bon déroulement du processus de biominéralisation, que sont d'une part l'établissement d'un environnement ionique saturé en ions calciums et carbonates, et d'autre part la présence d'une matrice organique guidant et structurant ce processus. La vision classique de la biominéralisation de coquille confère alors à l'espace extrapalléal le statut de « zone intermédiaire » où s'effectue un phénomène « d'auto-assemblage » contrôlé des ions minéraux et de la matrice organique pour former un biominéral (la coquille), selon l'équation suivante :

$$HCO_3^- + Ca_2^+ \rightarrow CaCO_3 + H^+$$

Cette réaction chimique de cristallisation libère des protons (H^+) qui acidifient le fluide extrapalléal, et doivent impérativement être réabsorbés par l'épithélium externe du manteau par des pompes à protons sous peine de re-dissolution des minéraux cristallisés. Ce phénomène est très peu documenté, et n'a pas encore été mis en évidence. Il a également été suggéré que ces pompes à protons puissent fonctionner à l'inverse, en acidifiant le fluide extrapalléal par libération de protons (Moura *et al.,* 2003).

Des analyses chimiques du fluide extrapalléal ont montré qu'il était saturé en ions précurseurs de la biominéralisation, les ions calciums et carbonates (Misogianes and Chesteen, 1979; Moura *et al.,* 2000), grâce à l'existence de transports actifs au niveau de l'épithélium externe du manteau. Cette saturation tendrait à faire naturellement précipiter le carbonate de calcium en solution de façon anarchique, mais ce phénomène ne se produit pas du fait de la présence au sein du fluide extrapalléal d'inhibiteurs organiques et minéraux de la minéralisation (Wilbur, 1984). L'espace extrapalléal est également la zone où la matrice organique est sécrétée par l'épithélium externe du manteau. A ce jour, la composition protéique du fluide extrapalléal reste encore mal connue. Seules quelques protéines ont été identifiées comme composant le fluide extrapalléal, comme par exemple la protéine EP, chez la moule *Mytilus edulis* (Hattan *et al.,* 2001) (Yin *et al.,* 2005), ou la protéine ACCBP chez *P. fucata* (Ma *et al.,* 2007). Cette pauvreté d'information concernant les composants protéiques du fluide extrapalléal peut s'expliquer par la difficulté technique de prélever ce type de fluide chez les mollusques (Marin, 2009), mais peut également relever d'un phénomène chimique d'assemblage rapide des composés organiques et minéraux qui le composent.

Enfin, il est important de préciser ici que cette vision « classique » d'auto-assemblage et que l'existence même de l'espace extrapalléal sont aujourd'hui mis à mal par certains auteurs qui pensent que le manteau serait en contact direct avec la coquille, et que la matrice organique serait sécrétée directement par le manteau sous la forme d'un gel au sein duquel se déroulent la biominéralisation et la formation de la coquille (Addadi *et al.,* 2006; Nudelman *et al.,* 2007). Bien sur, il est évident que le manteau est mobile par rapport à la coquille, et il est même tout à fait possible qu'il s'en décolle, formant ainsi un espace entre ce dernier et la coquille. C'est l'attribution d'un rôle à cet espace dans les processus de biominéralisation qui est aujourd'hui discuté. En effet, les phénomènes de transit des ions et des composants de la matrice sont avant tout supposés, ne reposent grand nombre d'observations tangibles, et n'apportent pas de réponses satisfaisantes à la question centrale : « comment se forme la coquille ? ». Selon Addadi *et al.* (2006), la formation d'un cristal à partir d'une solution sursaturée est un phénomène rare et, s'il en est, un processus simple et spontané uniquement gouverné par des paramètres physico-chimiques relatifs à la concentration et la solubilité des ions en solution. Selon cet auteur, il est donc très peu probable que l'espace extrapalléal réunisse l'ensemble des conditions nécessaires à ce phénomène.

4.1.3. Le périostracum : le premier support de la biominéralisation

La coquille est structurée en trois couches principales, dont la plus externe est le périostracum (figure 5b) (Petit *et al.* 1979), majoritairement composée de chitine et de polysaccharides (Hunt and Oates 1984). C'est une structure très solide qui isole efficacement la coquille de l'environnement extérieur (Isaji, 1995), en protégeant des attaques de poissons prédateurs par exemple, ou comme pour *P. margaritifera*, en limitant les phénomènes de dissolution de la coquille pour les espèces évoluant dans des eaux acides. Par rapport à la formation de la coquille en elle-même, le rôle du périostracum est d'une part de fournir le premier support de la biominéralisation, et d'autre part de délimiter et sceller un espace clos, l'espace extrapalléal, au sein duquel se déroulera la biominéralisation.

Le périostracum joue un rôle essentiel dans la mise en place des différentes couches de la coquille (Taylor and Kennedy, 1969; Checa *et al.,* 2000). Chez les bivalves, des études ont été menées sur *Amblema* (moule d'eau douce de la famille des *Unionidae*) afin de modéliser la formation du périostracum (Petit *et al.* 1979). Les résultats ont été étendus à l'ensemble des bivalves à coquille nacro-prismatique (Saleuddin and Petit, 1983) (figure 14). Dans ce modèle, la synthèse du périostracum est initiée par le sillon périostracal (figure 12), au niveau duquel est sécrété un film liquide contenant des précurseurs protéiques riches en tyrosine, qui deviennent rapidement insolubles en se polymérisant par un processus de « quinone-tanning » (tannage quinonique) (Waite, 1983). La pellicule alors formée constitue la couche la plus externe du périostracum, ainsi que la couche intermédiaire. La bi-couche alors formée est extrudée du sillon périostracal et glisse le long de cellules spécialisées de l'épithélium externe du manteau, qui déposent à leur tour la couche la plus interne du périostracum. Les trois couches du périostracum formées sont relativement allongées, et scellent alors un vaste espace extrapalléal distal entre la coquille et le manteau. Lors du repliement du périostracum, de petites cavités apparaissent au sein de la couche intermédiaire, et se remplissent de structures cristallines constituant la première couche prismatique de la coquille. De manière similaire, la couche interne du périostracum est capable de lier les ions calciums, et sert de support à la formation et au dépôt des premières couches nacrées (aragonitiques) de la coquille. Des protéines riches en glycine et acide aspartique sont impliquées dans ces phénomènes de biominéralisation précoces (Cariolou and Morse, 1988). Les premières couches prismatiques et aragonitiques respectivement déposées sur les couches intermédiaires et internes du périostracum servent de support à la synthèse des couches suivantes, dont les dépôts sont alors structurés par les composants protéiques de la matrice organique synthétisée par l'épithélium externe du manteau.

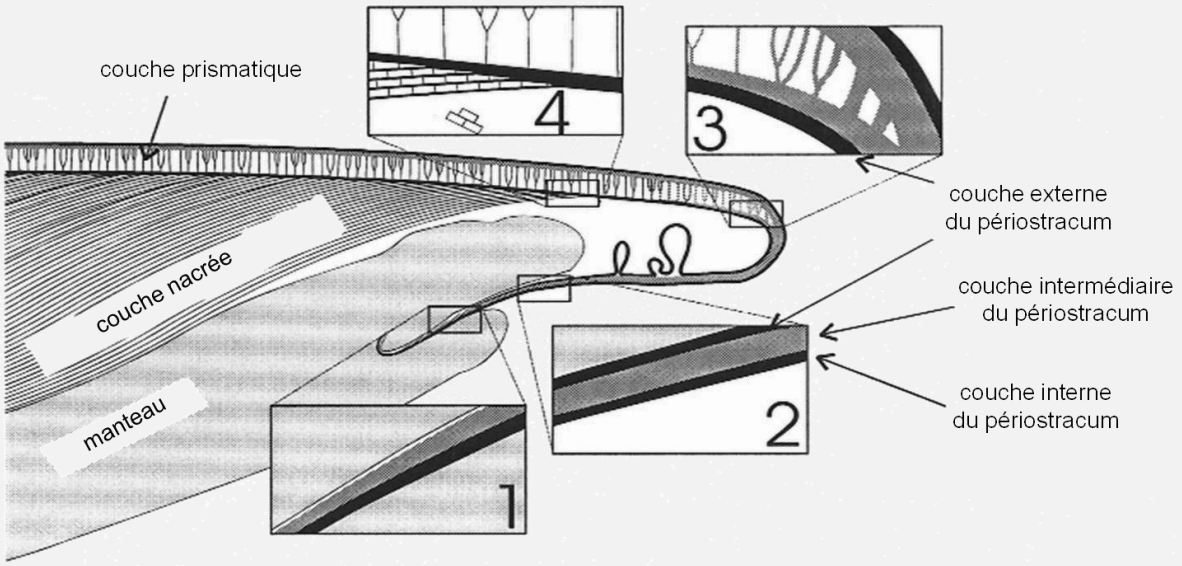

Figure 14. Modélisation de la formation du périostracum chez les bivalves à coquille nacro-prismatique. **Encart 1** : la synthèse du périostracum est initiée par le sillon périostracal. La pellicule alors formée constitue la couche la plus externe du périostracum, ainsi que la couche intermédiaire. **Encart 2** : la bi-couche formée est extrudée du sillon périostracal et glisse le long de cellules spécialisées de l'épithélium externe du manteau, qui déposent à leur tour la couche la plus interne du périostracum. **Encart 3** : lors du repliement du périostracum, de petites cavités apparaissent au sein de la couche intermédiaire, et se remplissent de structures cristallines constituant la première couche prismatique de la coquille. **Encart 4 :** de manière similaire, la couche interne du périostracum est capable de lier les ions calciums et sert de support à la formation et au dépôt des premières couches nacrées (aragonitiques) de la coquille. (D'après Checa *et al.,* 2000).

4.1.4. La coquille

La coquille des mollusques est à la fois le dernier compartiment où se déroule le processus de biominéralisation, et le produit fini issu de ce processus. La coquille est une structure solide composite biominérale constituée d'une fraction minérale et d'une fraction organique. La fraction minérale compose l'essentiel de la coquille, tandis que la fraction organique ne représente qu'une faible fraction, variant de 0,1 à 5% (Weiner, 1986). Cette fraction organique qui compose la coquille correspond aux constituants de la matrice organique synthétisée par le manteau. Elle confère au biominéral ses propriétés mécaniques de résistance, et interagit avec les cristaux minéraux pour orienter la nature et la structure de la fraction minérale. Cette fraction organique est finalement intégrée au sein de la structure minérale qu'elle structure. Chez les bivalves nacriers, la fraction minérale de la coquille est spatialement organisée en deux couches de microstructures distinctes de polymorphes de carbonate de calcium : une couche externe de prismes de calcite (recouverte du périostracum), et une couche interne nacrée de tablettes d'aragonite.

La croissance de la coquille est continue au cours de la vie de l'animal. Néanmoins, elle est corrélée à l'activité métabolique et dépendante des principaux paramètres environnementaux du milieu au sein duquel l'animal évolue, tels que la ressource trophique et la température (Linard, 2010; Linard *et al.,* 2011). La coquille, bien qu'étant considérée comme un tissu « mort », est néanmoins capable de remaniements par modification de la capacité sécrétoire du manteau. Des phénomènes de réparations coquillières suite à des cassures, des perforations ou des infestations bactériennes ont en effet été observés chez les mollusques (Fleury *et al.,* 2008; Trinkler *et al.,* 2010). Les mollusques, et en particulier les bivalves, sont également capables de redissolution coquillière des dernières couches minérales synthétisées lors de phases anaérobies pour remobiliser les ions calciums et les réintégrer au métabolisme de l'animal lors des conditions environnementales d'hypoxie ou de ressources trophiques faibles (Greenaway, 1971; Lutz and Rhoads, 1977).

4.2. Les composants organiques de la matrice extracellulaire, focus sur les protéines impliquées dans les processus de biominéralisation

Comme nous l'avons vu précédemment, la matrice organique peut être définie comme un ensemble cohérent de composants organiques sécrétés lors de la mise en place du processus de biominéralisation, et dont la fonction est d'agir en synergie pour exercer un contrôle biologique sur l'élaboration d'une structure biominéralisée. En effet, la matrice dirige le processus séquentiel de biominéralisation (nucléation, contrôle et arrêt de la croissance des cristaux), pour être finalement incorporée au sein de la structure biominéralisée elle-même (Weiner and Traub, 1984). La matrice organique est un ensemble de protéines, de glycoprotéines, de polysaccharides, de chitine et de lipides. Chez les mollusques, le manteau est l'organe à l'origine de la synthèse de la matrice organique.

Afin de mieux comprendre leur rôle dans les processus de biominéralisation, la caractérisation des composants de la matrice a été entreprise. Un des premiers composants à avoir été identifié au sein des coquilles de mollusques est la chitine (un polysaccharide) par Fremy en 1855 (Fremy, 1855), à la suite de ses recherches sur l'os, et dont il obtient la composition chimique élémentaire à partir des cuticules de crustacés. A partir des coquilles de mollusques, Frémy met également en évidence la « conchioline », la substance organique de la matrice. Ce terme n'est plus usité aujourd'hui, mais a constitué le point de départ de l'analyse des composants protéiques de la matrice organique (protéines, glycoprotéines).

L'analyse des protéines de la matrice et en particulier la détermination de leur composition chimique a été réalisée par voie biochimique, en procédant à l'extraction de protéines des coquilles du biominéral par décalcification à l'aide de divers réactifs, la plupart du temps de l'EDTA, mais aussi de l'acide acétique, des résines d'échanges de cations, ou encore tout simplement de l'eau. Ces procédés permettent de récolter deux fractions organiques : une phase soluble et une phase insoluble dans la solution de décalcification. Dans certains cas, la fraction insoluble peut en partie être dissoute par l'usage de dénaturant puissants (urée) et/ou par la chaleur. La fraction soluble peut être purifiée par dialyse ou ultrafiltration, avant d'être fractionnée selon les propriétés physico-chimiques des constituants par des méthodes de biochimie classique, de type électrophorèse ou chromatographie. Cependant, un certain nombre de protéines solubles de coquille de mollusques sont particulièrement acides, ou présentent des modifications post-traductionnelles pour lesquelles les méthodes de séparation classiques sont inefficaces. C'est cet obstacle technique qui explique la découverte et la publication relativement tardive de la première séquence partielle (Rusenko *et al.,* 1991) puis complète (Miyamoto *et al.,* 1996) de protéines acides de la coquille. Par la suite, l'identification de la séquence primaire des protéines a largement bénéficié des avancées techniques en matière de séquençage offertes par la spectrométrie de masse MS/MS (séquençage direct de peptides) et la biologie moléculaire (clonage et séquençage d'ADN complémentaire).

Aujourd'hui, un grand nombre de protéines de la matrice a donc été identifié (Marin *et al.,* 2008). En fonction des techniques utilisées, il a été montré que ces dernières étaient constitutives de la coquille, ou exprimées dans les tissus biominéralisateurs. Pour autant, leur rôle dans la biominéralisation reste hypothétique, et essentiellement basé sur la localisation de l'expression des gènes au sein du manteau (ventrale ou dorsale) ou la localisation de la protéine au sein des différents types de polymorphes de la coquille (couche nacrée et couche prismatique) (Gotliv *et al.,* 2005; Takeuchi *et al.,* 2006; Yano *et al.,* 2007; Marie *et al.,* 2008; Kong *et al.,* 2009; Marie *et al.,* 2009; Takagi and Miyashita, 2010). En effet, en dehors des expériences de cristallisation *in vitro*, aucune des protéines identifiées n'a réellement fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle. Une seule protéine fait exception : la protéine PIF (Suzuki *et al.,* 2009), pour laquelle il a été montré qu'elle était impliquée dans la biominéralisation de la coquille chez *P. fucata*.

Les protéines de la matrice dont la séquence primaire a été identifiée sont assez hétérogènes. En l'absence de l'existence de familles de protéines clairement établies, tant du point de vue de leur séquence que de leur fonction, certains auteurs ont pris le parti de les regrouper en fonction de leur point isoélectrique (*pI*) théorique (Marin *et al.,* 2008) (figure 15). Selon cette représentation, les protéines de la matrice coquillère peuvent être divisées en 3 groupes : Les protéines très acides dont le *pI* est inférieur à 4,5, les protéines modérément acides dont le *pI* est compris entre 4,5 et 7, et les protéines basiques dont le *pI* est supérieur à 7. Mais il est également possible de les regrouper en fonction de leurs structures primaires et secondaires, et des propriétés biochimiques et structurales qui en découlent (Levi-Kalisman *et al.,* 2001; Addadi *et al.,* 2006; Nudelman *et al.,* 2007). On distingue ainsi deux grand groupes au sein des protéines de la matrice, à savoir les protéines très acides riches en acide aspartiques (que

l'on retrouve également dans la catégorie des protéines très acides dont le *pI* est inférieur à 4,5), et les protéines insolubles riches en glycine et alanine dont la composition rappelle celle de la fibroïne de la soie, et que l'on appelle donc les protéines « silk-fibroin like». Dans ce chapitre, les composants de la matrice organiques seront décrits en tenant compte des propriétés mises en avant par ces deux types de regroupement.

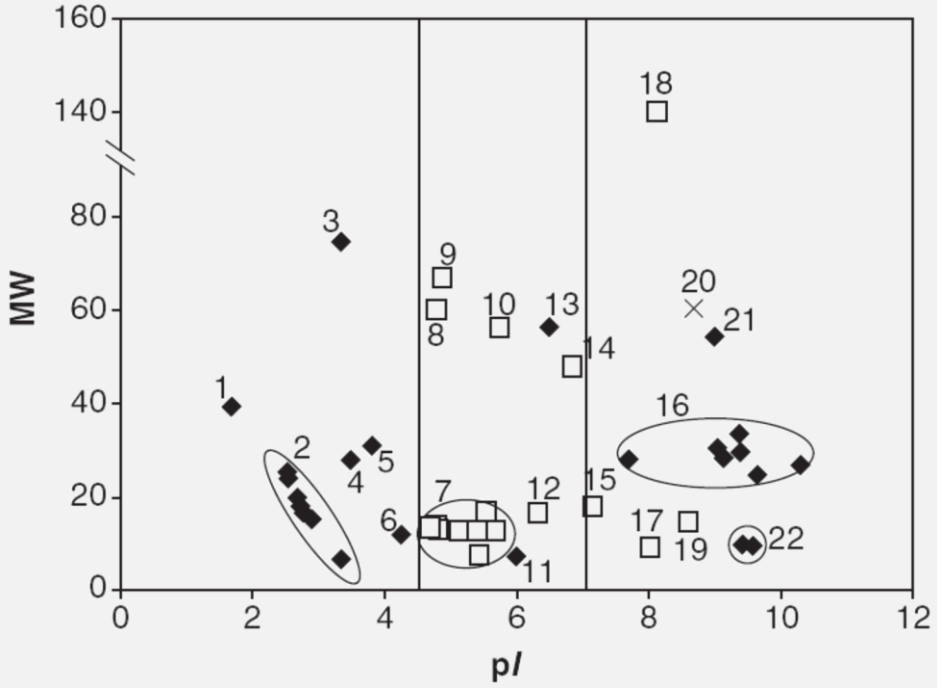

Figure 15. Représentation graphique de la répartition des protéines de coquilles de mollusques en fonction de leur masse moléculaire et de leur point isoélectrique théoriques calculés. Selon ce mode de représentation, les protéines de la matrice coquillère peuvent être divisées en 3 groupes : les protéines très acides dont le pI est inférieur à 4,5, les protéines modérément acides dont le *pI* est compris entre 4,5 et 7, et les protéines basiques dont le pI est supérieur à 7. ◆ : Protéines associées à la calcite ; ☐ : Protéines associées à l'aragonite. **1** : Aspein. **2** : famille Asprich. **3** : MSP-1. **4** : MSP-2 (ou SP-S). **5** : MSI31. **6** : Prismalin-14. **7** : N14/N16/pearlin/*Pmarg*-pearlin, masquant AP7 et AP24. **8** : MSI60. **9** : Mucoperlin. **10** : Nacrein de *P. fucata*. **11** : MSI7. 12 : Dermatopontin. **13** : Tyrosinase-like1. **14** : Nacrein de *T. marmoratus*. **15** : Perlucin. **16** : famille des Shematrins. **17** : Perlustrin. **18** : Lustrin A. **19** : Perlwapin. **20** : N66. **21** : Tyrosine-like2. **22** : famille des KRMP. (Tiré de Marin *et al.*, 2008).

4.2.1. Les protéines très acides (« unusally acidic proteins »)

Dans le monde vivant, la majorité des protéines ont un *pI* neutre ou légèrement acide. Les protéines ayant un *pI* inférieur à 4,5 peuvent donc être considérées comme très acides (« unusally acidic proteins »). Chez les mollusques, leur existence est connue depuis longtemps (Weiner and Hood, 1975), mais leurs propriétés physico-chimiques ont rendu leur étude difficile. Les premières séquences protéiques complètes (obtenue à partir de la séquence d'ADN complémentaire) sont MSI31 chez *P. fucata* (Sudo *et al.,* 1997) et MSP-1 chez *Patinopecten yessoensis* (Sarashina and Endo, 2001). Les autres protéines très acides identifiées sont l'Aspein (Tsukamoto *et al.,* 2004) et la Prismalin-14 (Suzuki *et al.,* 2004) chez *P. fucata*, MSP-2 chez *Patinopecten yessoensis* (Hasegawa *et al.,* 2005) et la famille des Asprich protein (protéines riches en résidus aspartiques) chez *Atrina rigida* (Gotliv *et al.,* 2005).

Les protéines peuvent être acides pour plusieurs raisons. Bien évidemment, leur séquences primaire en acides aminés détermine un *pI* dépendant de l'abondance relatives des acides aminés acides (acide aspartique et acide glutamique) et basiques (histidine, lysine et arginine). Mais les protéines peuvent devenir acides du fait de modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations, les phosphorylations ou les sulfatations (Marin and Luquet, 2007).

Les protéines très acides de la matrice partagent plusieurs caractères communs. Tout d'abord, elles semblent préférentiellement associées à la calcite plutôt qu'à l'aragonite. En effet, MSI31, l'Aspein, la Prismalin-14 et les protéines Asprich ont toutes été identifiées à partir des couches calcitiques prismatiques. Les protéines MSP-1 et MSP-2 ont été identifiées à partir de la couche calcitique foliée. Un autre caractère commun à ces protéines est qu'elles sont particulièrement riches en résidus acide aspartique, mais pas en résidus acide glutamique. Cette orientation pourrait en partie être imposée par des impératifs stéréo-chimiques, puisque la chaine des résidus acide aspartique ($-CH_2COOH$) est plus courte (et donc moins encombrante) que celle des résidus acide glutamique ($-C_2H_4COOH$). La présence au sein de la calcite des protéines très acides de la matrice et le « choix » préférentiel de l'acide aspartique plutôt que celui de l'acide glutamique restent à ce jour inexpliqués.

De part les caractéristiques qui viennent d'être décrites, différentes fonctions sont attribuées aux protéines très acides de la matrice organique. Elles ont la capacité de lier les ions calciums par interactions électrostatiques avec leur groupements anioniques et peuvent ainsi servir de support à la nucléation (Marxen *et al.,* 2000; Miyashita *et al.,* 2000; Marin *et al.,* 2005). Il a d'ailleurs été remarqué que la distance atomique entre deux ions calciums au sein de la nacre des coquilles correspondait à la distance entre les deux charges négatives de résidus acide aspartique consécutifs au sein de la séquence primaire d'une protéine (Weiner and Hood, 1975). Elles ont aussi la capacité de précipiter le carbonate de calcium (Wheeler *et al.,* 1981) et auraient également la capacité de stabiliser le carbonate de calcium amorphe (CCA, ou ACC pour amorphous calcium carbonate), la forme acheminée sur les sites de biominéralisation avant la précipitation (Gower, 2008) (cf. 4.3). A l'échelle moléculaire, les interactions entre les protéines acides et le carbonate de calcium ont été explorées grâce à un grand nombre de techniques complémentaires qui ont permis de mettre en évidence deux rôles antagonistes des protéines acides. Dans le premier modèle de biominéralisation développé par Weiner et Traub (Weiner and Traub, 1984), les protéines acides liées à un support organique insoluble induisent la nucléation des cristaux. En revanche, libres en solution, elles joueraient un rôle opposé en inhibant la croissance des cristaux. Ces mécanismes sont développés en détails dans le paragraphe : « Formation de la coquille et modélisation des processus de biominéralisation ».

4.2.2. Les protéines modérément acides

Les protéines modérément acides ont un *pI* compris entre 4,5 et 7. Chez les mollusques, la première famille de protéines identifiée, et de loin la plus étudiée dans cette catégorie, est la Nacrein identifiée pour la première fois chez le bivalve *P. fucata* (Miyamoto *et al.,* 1996; Miyamoto *et al.,* 2003; Matsushiro and Miyashita, 2004). La Nacrein est associée à la fois à la couche nacrée (Miyamoto *et al.,* 1996) et à la couche prismatique (Miyashita *et al.,* 2002). La séquence nucléotidique de la Nacrein contient deux sous-domaines « carbonic anhydrase » entrecoupés d'un domaine répété Gly-Xaa-Asn (Xaa = Asp, Asn, ou Glu). Des analyses par HIS montrent que l'expression de la Nacrein est ubiquitaire dans l'épithélium externe biominéralisateur (Miyamoto 2005; Takeuchi *et al.,* 2006). La Nacrein recombinante inhibe la précipitation du carbonate de calcium *in vitro*, et la délétion du domaine répété Gly-Xaa-Asn entraine la perte de cette activité (Miyamoto *et al.,* 2005). Cette protéine a donc été considérée comme un régulateur négatif de la précipitation du carbonate de calcium lors de la formation de la coquille. Au sein de cette famille, la Nacrein a également été identifiée chez *Pinctada maxima* (N66, dont le *pI* est basique) (Kono *et al.,* 2000) et chez le gastéropode *Turbo marmoratus* (Miyamoto *et al.,* 2003).

Les protéines modérément acides constituent un groupe relativement disparate où, en dehors de la famille des Nacreins, se trouvent PIF (Suzuki *et al.,* 2009), MSI60 (Sudo *et al.,* 1997), MSI7 (Zhang *et al.,* 2003), la famille N14/N16/Pearlin (Samata *et al.,* 1999; Kono *et al.,* 2000; Miyashita *et al.,* 2000; Matsushiro *et al.,* 2003; Montagnani *et al.,* 2011), une protéine Tyrosinase-like (Nagai *et al.,* 2007), et la Prismin (Takagi and Miyashita, 2010) chez les huîtres perlières *P. margaritifera* et *P. fucata*, la Mucoperlin (Marin *et al.,* 2000), AP7 et AP27 (Michenfelder *et al.,* 2003) chez les bivalves *Pinna nobilis* et *Haliotis rufescens*, et une Dermatopontin chez le gastéropode *B. glabrata* (Marxen *et al.,* 2003).

Ces protéines sont majoritairement identifiées comme étant associées à la couche nacrée, sauf MSI7, la protéine Tyrosinase-like et la Pprismin, identifiées comme étant associées à la couche prismatique. La Prismin est une protéine purifiée à partir de la couche prismatique de coquille de *P. fucata*. Des expériences de cristallisation *in vitro* et d'immunoblot ont révélé que cette protéine était constitutive de la partie prismatique de la coquille uniquement,

et qu'elle induisait la croissance de cristaux de calcite *in vitro*. De plus, des expériences d'HIS ont montré et que les ARNm codant pour cette protéine étaient exprimés dans la zone ventrale de l'épithélium minéralisateur. Les auteurs ont ainsi conclu que la prismin était impliquée dans la biominéralisation des prismes de la coquille chez *P. fucata*. La dernière protéine identifiée en date est la protéine PIF, une protéine acide purifiée à partir de la couche nacrée de la coquille *P. fucata*. PIF est la seule protéine à voir été fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle grâce à des expériences de knockdown par RNA interférence (RNAi) qui ont permis de montrer *in vivo* que cette protéine était impliquée dans la biominéralisation de la nacre de la coquille chez *P. fucata*. Cependant, son rôle précis dans la formation de la nacre reste à découvrir.

4.2.3. Les protéines basiques

La présence de protéines à *pI* basiques (supérieur à 7) était prévisible au vu des résultats obtenus sur l'étude des spicules d'oursins (Killian and Wilt, 1996). La première protéine basique identifiée est la Lustrin A, associée à la couche nacrée chez le gastéropode *H. rufescens* (Shen *et al.,* 1997). Cette protéine est organisée en domaines riches en acides aminés serine (16%), proline (14%), glycine (13%), ou cystéine (9%), et présente des homologies avec des protéines de matrices organiques des os, des dents, des coquilles d'œuf et des frustules de diatomées. La Lustrin A a fait l'objet d'analyses permettant d'élucider les structures secondaires à l'origine de sa conformation (Zhang *et al.,* 2002; Wustman *et al.,* 2003). La structure modulaire de la Lustrin A suggère que cette protéine est multifonctionnelle, et serait impliquée dans des interactions avec d'autres macromolécules et les biominéraux.

Chez les bivalves, des protéines ou des familles de protéines basiques ont également été identifiées, notamment les KRMP (Lysine Rich Matrix Protein) (Zhang *et al.,* 2006), les Shematrins (Yano *et al.,* 2006), et la Prisilkin-39 (Kong *et al.,* 2009) chez *P. fucata*. Les KRMP forment une famille de protéines constituées de domaines riches en lysine et de domaines riches en glycine et en tyrosine, susceptibles d'interagir avec des ions ou des résidus chargés négativement, tels que les bicarbonates ou les protéines acides. Les Shematrins ont été identifiées grâce à la construction d'une banque d'ADNc de manteau. Elles forment une famille de sept protéines constituées de domaines similaires riches en glycine. Certains membres présentent des homologies avec MSI31 ou la partie C-terminale des KRMP, ou encore, pour la Shematrin 5 (la seule séquence présentant un domaine acide) des homologies avec l'Aspein. Les ARN messagers (ARNm) codant pour les KRMP et les Shematrins sont exprimés dans la partie ventrale du manteau, indiquant qu'elles semblent être impliquées dans la formation des prismes de calcite. La Prisilkin-39 est une protéine présentant de nombreux domaines répétés riches en glycine, en tyrosine et en serine, dont la séquence a été déduite par séquençage d'un ADN complémentaire identifié au sein du manteau de *P. fucata*. Des expériences de PCR et d'immunodétection (HIS, Immunofluorescence indirecte –IFI) ont montré que le gène codant pour la Prisilkin-39 est exprimé dans la partie ventrale de l'épithélium biominéralisateur, et que la protéine se localise au niveau de la couche prismatique de la coquille en se liant au squelette de chitine. Enfin des expériences de cristallisation *in vitro* ont également montré que la Prisilkin-39 inhibe la cristallisation de l'aragonite.

D'autres protéines basiques ont été identifiées associées à la couche nacrée chez le gastéropode *Haliotis laevigata* (ormeau), parmi lesquelles la Perlustrin (Weiss *et al.,* 2000; Weiss *et al.,* 2001), la Perlucin (Mann *et al.,* 2000; Weiss *et al.,* 2000; Blank *et al.,* 2003), la Perlwapin (Treccani *et al.,* 2006) et la Perlinhibin (Mann *et al.,* 2007). La Perlustrin est une petite protéine, la première identifiée présentant des homologies avec des protéines de liaison « insulin-like growth factor binding protein » (IGF-BP), contenues dans les os des mammifères. Des analyses de cristallisation *in vitro* ont montré que la Perlucin provoque la nucléation des cristaux de carbonate de calcium en solution. Des analyses par microscopie de force atomique (AFM) ont également montré que la perlucin entraine la nucléation des cristaux à la surface des prismes de calcite (Blank *et al.,* 2003). La Perlwapin, qui présente des homologies avec la partie C-terminale de la séquence de la Lustrin A, contient trois domaines WAP (constitués de 8 résidus cystéines conservés impliqués dans des liaisons disulfides (Hennighausen and Sippel, 1982). Des analyses par microscopie de force atomique (AFM) suggèrent que la Perlwapin serait un inhibiteur potentiel de la précipitation du carbonate de calcium en se liant avec les cristaux selon certains plans particuliers. Enfin, la Perlinhibin inhibe la croissance de la calcite et induit la formation d'aragonite *in vitro*.

4.2.4. Les protéines « silk-fibroin like »

Les protéines « silk-fibroin like» sont des protéines insolubles riches en glycine et alanine dont la composition rappelle celle de la fibroïne de la soie (Addadi *et al.,* 2006; Furuhashi *et al.,* 2009). Etablir une liste détaillée des protéines présentant ces caractéristiques serait redondant avec les descriptions des protéines établies plus haut, puisque ces dernières peuvent présenter des profils acides ou basiques. Parmi les protéines « silk-fibroin like» les mieux étudiées, on distingue notamment MSI60 et MSI31 (Sudo *et al.,* 1997), des protéines acides identifiées chez *P. fucata*, et la Prisilkin-39, une protéine basique identifiée chez *P. fucata* également (Kong *et al.,* 2009).

MSI60 a été purifiée à partir de la couche nacrée de la coquille de *P. fucata*. Cette protéine acide présente 11 motifs riches en alanine dispersés dans toute la séquence qui lui confèrent sa caractéristique de protéine « silk-fibroin like». La partie N-terminale de la protéine contient un domaine riche en acide aspartique. MSI31 a été purifiée à partir de la couche prismatique de la coquille de *P. fucata.* Cette protéine acide présente 10 courts motifs riches en glycine majoritairement répartis dans la partie N-terminale, hydrophobe. Un domaine acide dans sa partie C-terminale pourrait être impliqué dans la liaison ou la nucléation du calcium. L'expression des gènes codant pour les protéines MSI60 et MSI31 ont été étudiés par PCR et par HIS (Takeuchi *et al.,* 2006) au sein du manteau de *P. fucata*. Ces expériences ont montré que MSI60 était exprimé dans la partie dorsale de l'épithélium biominéralisateur (impliquée dans la formation de la couche nacrée), tandis que MSI31 était exprimé dans la partie ventrale de l'épithélium biominéralisateur (impliquée dans la formation de la couche prismatique).

4.3. Formation de la coquille et modélisation des processus de biominéralisation

La modélisation des processus de biominéralisation n'a pu voir le jour que grâce aux avancées parallèles et complémentaires réalisées dans les domaines de la caractérisation des structures minéralisées (notamment grâce à divers techniques de microscopies) d'une part, et de la caractérisation de leurs compositions chimiques par voie biochimique d'autre part. Les connaissances acquises dans ces domaines respectifs permettent, lorsqu'elles sont mises en commun, de comprendre l'organisation tridimensionnelle des structures minéralisées et d'établir des modèles de biominéralisation où chaque composant de la matrice joue un rôle bien particulier.

4.3.1. Processus de biominéralisation de la nacre

Dans un premier modèle proposé en 1969 par Bevelander et Nakahara (Bevelander and Nakahara, 1969) sur la croissance de la nacre, les cristaux de nacre se déposent sur une structure tridimensionnelle constituée de protéines insolubles. Weiner et Hood (Weiner and Hood, 1975), puis Wheeler (Wheeler *et al.,* 1981) et Addadi (Addadi *et al.,* 1987) complémentent ce modèle en y introduisant des protéines acides solubles riches en acide aspartique. Ils proposent que ces protéines acides se fixent sur la matrice insoluble en adoptant une conformation en feuillet-β, et se lient grâce à leurs résidus aspartate aux polysaccharides sulfatés de la matrice. Les ions calciums (chargés positivement) seraient attirés par les polysaccharides sulfatés (chargés négativement) au contact des protéines acides, qui serviraient alors de support de nucléation aux biominéraux en formation. L'interaction entre les différents composants de la matrice permettrait d'orienter de façon coordonnée la croissance des cristaux, qui s'apparente ainsi à un processus d'hétéro-épitaxie (croissance orientée d'un cristal par un support organique insoluble). Il est également observé que les protéines de la matrice acide soluble libres en solution ont la capacité d'inhiber la précipitation du carbonate de calcium *in vitro* de façon dose-dépendante (Wheeler *et al.,* 1981).

Ces observations aboutissent en 1984 à l'établissement d'un nouveau modèle par Weiner et Traub (Weiner and Traub, 1984), basé sur l'observation de la nacre et mettant en jeu les principaux composants de la matrice organique des coquilles, à savoir la chitine, les protéines hydrophobes de type « silk-fibroin » et les protéines acides. Dans ce modèle, un squelette de chitine est bordé d'une matrice insoluble hydrophobe (les protéines « silk-fibroin ») à laquelle il sert de support. La matrice insoluble est elle-même bordée des protéines solubles acides riches en acides aspartiques en contact avec le minéral (figure 16a). Dans ce modèle dit «en sandwich », la nacre présente une structure lamellaire constituée de tablettes de nacre et d'une matrice organique entourant les tablettes. Il est également suggéré que la croissance des cristaux pourrait être facilitée par l'existence de trous au sein de la matrice

inter-lamellaire, sortes de ponts minéraux, qui permettrait la diffusion des ions minéraux et faciliteraient ainsi la minéralisation de la couche supérieure (Nakahara, 1991).

En 2001, Levi-Kalisman *et al.*, revisitent le modèle en étudiant la nacre du bivalve *Atrina rigida* par cryo-TEM (observations microscopiques à transmission en mode hydraté) qui présente l'avantage de ne pas dénaturer la structure tridimensionnelle des biominéraux par déshydratation (Levi-Kalisman *et al.,* 2001). Ce nouveau modèle suggère que la chitine, organisée en feuillet-β, est seule à l'origine de la structuration de l'édifice, et par conséquence, à l'origine de l'orientation des cristaux au sein de la matrice. Les protéines « silk-fibroin » hydrophobes sécrétées forment un gel entre les fibres de chitine. Les protéines acides riches en acide aspartique forment des « clusters » au sein du gel, ou sont directement en contact avec les fibres de chitine, mais sans former de couches homogènes à leur surface (figure 16b). La nucléation des cristaux se déroule au sein du gel de protéines « silk-fibroin » contenant des macromolécules acides, sous la forme d'une phase amorphe par la suite organisée en une véritable structure cristalline. Ce nouveau modèle bouscule la façon de concevoir le processus de biominéralisation, et invite notamment à repenser les phénomènes de nucléation des cristaux et leur croissance lors de la formation de la coquille de mollusques.

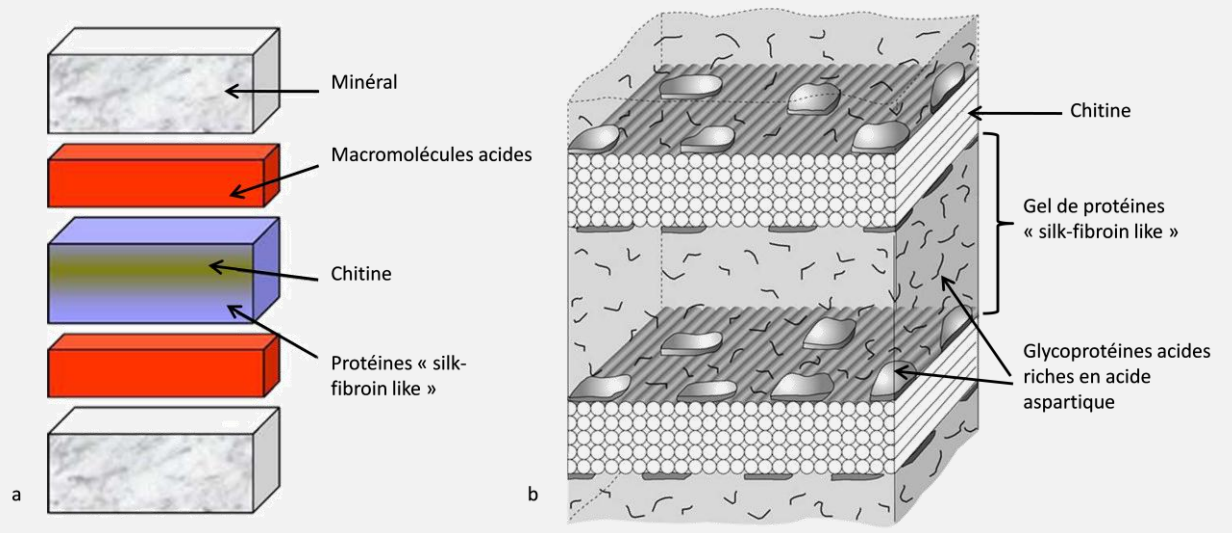

Figure 16. Représentations schématiques des premiers modèles topographiques de la croissance de la nacre des mollusques. La caractérisation de la structure de la nacre et des macromolécules qui composent sa matrice organique ont permis de modéliser les processus de biominéralisation des couches nacrées au sein des coquille de mollusques. **a** : Modèle de croissance de la nacre par Weiner and Traub (1984). Dans ce modèle, un squelette de chitine est bordé d'une matrice insoluble hydrophobe (protéines « silk-fibroin like »). La matrice insoluble est elle-même bordée des protéines solubles acides (macromolécules acides) riches en acides aspartiques en contact avec le minéral. **b** : Modèle de croissance de la nacre chez *Atrina rigida* par Levi-Kalisman *et al.,* (2001). Dans ce modèle, la chitine, organisée en feuillet-β, est à l'origine de la structure tridimentionnelle de l'édifice et de l'orientation des cristaux au sein de la matrice. Les protéines « silk-fibroin » hydrophobes sécrétées forment un gel entre les fibres de chitine. Les protéines acides riches en acide aspartique forment des « clusters » au sein du gel, ou sont directement en contact avec les fibres de chitine, mais sans former de couches homogènes à leur surface. La nucléation des cristaux se déroule au sein du gel de protéines « silk-fibroin » contenant des macromolécules acides, sous la forme d'une phase amorce par la suite organisée en une véritable structure cristalline. (D'après Furuhashi *et al.,* (2009) (16a) et Levi-Kalisman *et al.,* (2001) (16b)).

Des réponses sont en grandes parties apportées en 2006 par Addadi *et al.*, (Addadi *et al.,* 2006), qui s'attachent à décomposer de façon dynamique la formation de la nacre en quatre étapes successives (figure 17a) :

1. Assemblage de la matrice : la chitine, sécrétée par l'épithélium minéralisateur, s'organise en un réseau tridimensionnel de fibres en feuillet-β. L'étape ultime de cette organisation est l'introduction d'un gel de protéines hydrophobes de type « silk-fibroin » entre les fibres de chitine qui les maintiennent à des distances uniformes les unes des autres, et qui contient des protéines acides riches en acide aspartique impliquées dans la nucléation des cristaux.

2. Premières étape de formation d'un minéral : les premiers minéraux qui apparaissent sont sous la forme d'une phase amorphe (ACC). Ces minéraux pourraient être acheminés sur le site par des vésicules (à bicouche lipidique) qui stabiliseraient la phase amorphe en isolant les minéraux de l'environnement aqueux. La structure en gel hydraté fournie par les protéines de type « silk-fibroin » constitue un environnement hydrophobe qui inhibe la biominéralisation et prévient des phénomènes de biominéralisation incontrôlés. La présence d'autres inhibiteurs (magnésium, phosphate) pourrait accentuer ce rôle inhibiteur. Ce scénario n'accorde que peu d'importance à l'espace et au fluide extrapalléal. En effet, selon Addadi *et al*. (2006), il est plus probable que le manteau soit en contact direct avec la coquille au moment ou ce dernier synthétise les composants de la matrice, car il est difficile de concevoir comment la matrice organique pourrait s'auto-assembler avec une telle précision au sein de l'espace extrapalléal sans une intervention directe d'un contrôle cellulaire.

3. Nucléation d'une tablette d'aragonite : pour que la nucléation des cristaux s'opère de façon contrôlée en un point précis, la matrice doit présenter des sites de nucléation permettant d'induire la formation des cristaux de façon plus efficace en ce point plutôt qu'à d'autres localisations. Ces sites, co-localisés avec le centre d'une tablette de nacre, correspondent à une zone constituée de résidus acides (groupement carboxylates -COOH) entourés d'un anneau de groupements sulfatés, portés par les protéines acides riches en acide aspartique. Les groupements sulfatés permettent d'attirer les ions calciums sur le site, où la nucléation des cristaux est réalisée à partir des minéraux en phase amorphe grâce aux résidus acides.

4. Croissance des tablettes d'aragonite : la croissance des cristaux s'effectue verticalement à partir du point de nucléation (croissance centrifuge). Lorsque la couche supérieure de chitine est atteinte, la croissance des cristaux d'effectue alors de manière latérale. Lors du processus de croissance de la nacre, les protéines acides en suspension dans le gel (figure 16b) sont incorporées aux cristaux, leur conférant alors leur remarquable propriété mécanique et leur robustesse. Le gel hydrophobe est expulsé au fur et à mesure de la croissance latérale des cristaux, et se retrouve finalement coincé entre les tablettes de cristaux et les couches de chitine. Les protéines de type « silk-fibroin » constituant le gel ne sont pas incorporées aux cristaux, certainement en raison de leur hydrophobicité.

4.3.2. Processus de biominéralisation des prismes de calcite

Le modèle de croissance de la nacre a été complété par Nudelman *et al.*, en 2007 par un modèle de croissance des primes de calcite chez *Atrina rigida* (Nudelman *et al.,* 2007). Les prismes de calcite sont structurés par certains composants de même types que ceux de la nacre, à savoir la chitine, des protéines acides. En revanche, les protéines de type « silk-fibroin » formant un gel hydrophobe ne sont pas retrouvées dans les prismes de calcite. Des protéines riches en glycine, mais dont la structure ne s'apparente pas à celle des protéines de la fibroïne de la soie, ont néanmoins été identifiées.

Dans les prismes de calcite, la chitine forme un réseau dense intra-cristallin sans orientation ou organisation apparente, contrairement à la nacre où les fibres de chitine sont alignées avec les tablettes d'aragonite et localisées entre les tablettes. Dans le cas des prismes de calcite, la chitine est distribuée sur toute la hauteur du prisme, mais sa densité est variable, reflétant ainsi le mode de croissance des prismes (figure 17b) : les zones de forte densité en chitine constituent des « zones de transition » d'une couche de calcite à l'autre. Les zones de faible densité en chitine constituent une « couche minérale » au sein de laquelle sont intégrées des fibres de chitine intra-cristallines. Les protéines acides des prismes de calcite présentent une localisation à la fois inter- et intra-prismatique, et sont

certainement associées à la chitine. Les protéines acides des prismes sont considérablement plus acides que celle identifiées au sein des cristaux de nacre. Bien que les polymorphes de carbonate de calcium, calcite et aragonite, soient tous les deux composés de protéines acides, ces dernières diffèrent à la fois en composition en acides nucléiques et en localisation au sein de l'édifice tridimensionnel qui dirige la nucléation. Il est d'ailleurs fort probable que ces différences soient à l'origine des processus de biominéralisation différentiels qui induisent et régulent la formation d'un polymorphe de carbonate de calcium particulier. Enfin, les protéines riches en glycine sont les composants majeurs de la matrice des couches inter-prismatiques. Comme pour les protéines de type « silk-fibroin », leur présence est observée avant la mise en place des processus de nucléation, leur conférant alors un rôle similaire a celui du gel hydrophobe observé dans le modèle de biominéralisation de la nacre, bien que les protéines riches en glycine des prismes de calcite ne forment pas de gel hydraté.

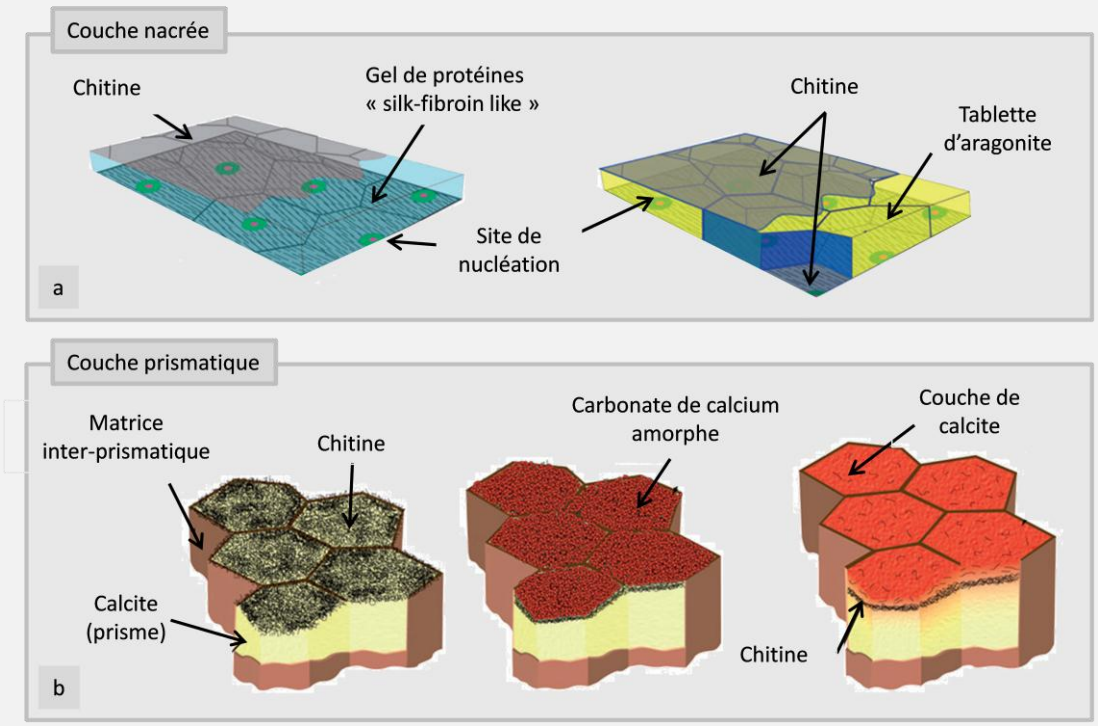

Figure 17. Représentations schématiques des modèles topographiques les plus récents de la croissance des tablettes de nacre et des prismes de calcite des mollusques. a : modélisation de la croissance des tablettes de nacre des mollusques par Addadi (2006). **a. Encart de gauche** : assemblage de la matrice organique avant la minéralisation. Un gel de protéines hydrophobes « silk-fibroin » est bordé par deux couches de chitines. Des protéines acides sont en contact avec la chitine et constituent des sites de nucléation. Les formes polygonales à la surface de la couche de chitine délimitent le futur emplacement des cristaux de nacre, centrés autour du site de nucléation. **a. Encart de droite :** minéralisation de la couche nacrée. La nucléation des cristaux d'aragonite est induite par les protéines acides. Lors de la croissance du minéral, les protéines acides en suspension dans le gel sont incorporées aux cristaux. Le gel de protéines hydrophobes « silk-fibroin » est expulsé et coincé entre les tablettes et les couches de chitine à la fin du processus de biminéralisation. **b** : modélisation de la croissance des prismes de calcite des mollusques par Nudelman (2007). **b. Encart de gauche** : la croissance des prismes débute par le dépôt d'un dense réseau de chitine à la surface de la couche minérale précédente. **b. Encart central** : le réseau de chitine nouvellement déposé sert de support au dépôt de particules minérales sous la forme d'une phase amorce (ACC), stabilisées par les protéines acides de la matrice. **b. Encart de droite** : la formation de la matrice inter-prismatique (protéines riches en glycine) précède la nucléation des cristaux. La croissance des cristaux de calcite s'effectue en une couche identique entre tous les prismes, au sein desquels sont inclus des fibres de chitine intra-cristallines et des protéines acides. Ce processus de croissance se répète et aboutit à la constitution de couches de calcite plus ou moins denses en chitine, organisées en prismes délimités par une matrice de protéines riches en glycine. (D'après Addadi *et al.*, 2006 (20a) et Nudelman *et al.*, 2007 (20b)).

D'un point de vue mécanistique, le réseau de chitine est déposé à la surface de la couche minérale précédente, et sert de support au dépôt de particules minérales sous la forme d'une phase amorce (ACC), stabilisées par les protéines acides de la matrice. La formation de la matrice inter-prismatique précède la nucléation des cristaux. La croissance des cristaux de calcite s'effectue en une couche identique entre tous les prismes, au sein desquels sont inclus des fibres de chitine intra-cristallines et des protéines acides. Ce processus de croissance se répète et aboutit à la constitution de couches de calcite plus ou moins denses en chitine, organisées en prismes délimités par une matrice de protéines riches en glycine.

4.4. Structure et microstructure de la coquille de *P. margaritifera*

La coquille des mollusques nacriers est souvent schématisée par une structure organisée en une bi-couche de carbonate de calcium, recouverte sur sa face externe par le périostracum (figure 5). La couche de carbonate de calcium la plus externe est composée de prismes de calcites (la structure rhomboédrique carbonate de calcium), tandis que la couche la plus interne, ou couche nacrée, est composée de cristaux d'aragonite (la structure orthorhombique du carbonate de calcium). L'usage de techniques telles que la diffraction aux rayons X, les techniques de microscopie en lumière polarisée, la microscopie électronique en transmission (TEM) ou à balayage (SEM), ou encore la microscopie de force atomique (AFM) ont permis de caractériser les microstructures et la composition chimique des différents biominéraux et de leurs polymorphes au sein des coquilles.

La couche nacrée la plus interne de la coquille est toujours constituée d'aragonite. Chez les mollusques, il existe deux types d'arrangements de nacre : le modèle de nacre en « mur de brique » chez les bivalves, et le modèle « en colonne » spécifiques des gastéropodes (Watabe, 1988) (figure 18a). Chez les bivalves, les cristaux s'organisent en couches parallèles à la surface de la coquille d'environ 500 nm d'épaisseur, composées de tablettes d'aragonite (briques). Chaque tablette d'aragonite est totalement entourée d'une enveloppe organique inter-lamellaire, à la fois horizontale qui la sépare des tablettes supérieures et inférieures, et à la fois latérale qui la sépare des autres tablettes au sein d'une même couche. Les couches de matrice organique inter-lamellaire (d'environ 30 nm d'épaisseur) sont essentiellement composée de chitine et de protéines de type « silk-fibroin » (figure 18b). Les couches latérales contiennent également de protéines de type « silk-fibroin », mais ne sont en revanche pas composées de chitine. Enfin, il existe au sein d'une tablette une matrice intra-cristalline, également appelée « trame organique », essentiellement composée de protéines acides incorporées aux cristaux de nacre lors du processus de biominéralisation (figure 18c).

Chez les mollusques, il a été identifié quatre catégories de structures prismatiques : simples, fibreuses, sphéruliques et composites (Carter, 1980). Pour la majorité des bivalves marins, et en particulier chez *P. margaritifera*, les structures prismatiques sont constituées de calcite sous forme « simple », c'est-à-dire que l'axe de croissance des prismes (axe c) est perpendiculaire à la surface de la coquille (Taylor and Kennedy, 1969). Chaque prisme fait environ 1 mm de haut et présente une surface polygonale (le plus souvent héxagonale) de 20 à 50 µm de largeur (De Paula *et al.,* 2009) (figure 18d). Les prismes sont parallèles entre eux, et sont orientés verticalement par rapport au periostracum (figure 18e). La matrice inter-prismatique (ou enveloppe), est essentiellement composée de protéines riches en glycine et de protéines acides. En revanche, au sein de chaque prisme, l'existence de couches de calcite ne correspond en réalité qu'à une alternance de zones de faibles et de fortes densités en chitine organisée en un réseau dense, et formant une matrice intra-prismatique et inter-cristalline, contenant également des protéines acides (Nudelman *et al.,* 2007).

Récemment, une analyse chimique, minéralogique et microstructurale a permis d'identifier une couche dite « de transition » chez *P. margaritifera* entre la couche prismatique et la couche nacrée de la coquille (Dauphin *et al.,* 2008). Cette couche, d'épaisseur variable, est constituée d'aragonite fibreuse, dont la composition chimique est identique à celle de la nacre (figure 18f, 18g, 18h). Des images obtenues par microscopie de force atomique (AFM) ont montré que l'aragonite fibreuse est constituée de nanograins de formes irrégulières de quelques nanomètres de diamètre. Etant donné que la croissance de la coquille s'effectue à la fois en longueur et en épaisseur tout au long de la vie de l'animal (Linard *et al.,* 2011), l'observation de cette couche de transition suggère que le passage des prismes de calcite aux tablettes d'aragonite lors des processus de biominéralisation n'est pas un phénomène direct. Il est vraisemblable que la fin du processus de biominéralisation des prismes de calcite soit en premier lieu marqué par un

changement dans la composition chimique et biochimique du biominéral qui entraine alors peu à peu un changement de microstructure conduisant à l'apparition de l'aragonite fibreuse, avant d'aboutir à la formation de nacre sous la forme de tablettes d'aragonite.

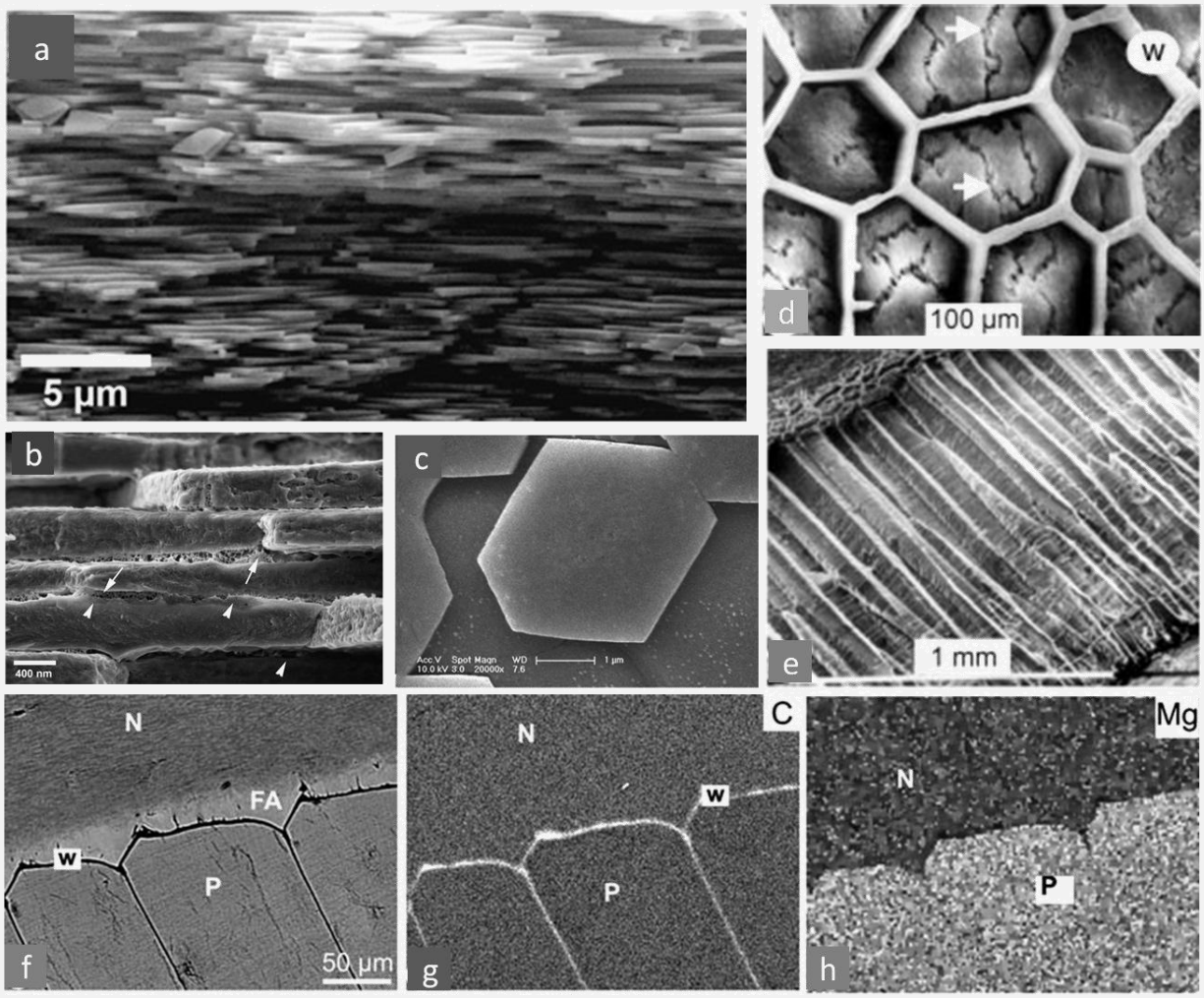

Figure 18. Structure et microstructure de la coquille de *P. margaritifera*. **a** : modèle de nacre en mur de briques. **b** : nacre, couches de matrice organique inter-lamellaire composée de chitine et de protéines de type « silk-fibroin ». **c** : cristaux de nacre contenant une « trame organique », essentiellement composée de protéines acides. **d** : un prisme fait environ 1 mm de haut et présente une surface polygonale de 20 à 50 µm de largeur. **e** : prismes de calcite parallèles entre eux, orientés verticalement par rapport au periostracum. **f, g, h** : couche d'aragonite fibreuse (FA) entre la couche prismatique (P) et la couche nacrée de la coquille (N). (Photos : **a**, **b** d'après (Nudelman *et al.,* 2008) ; **c** d'après (Gong *et al.,* 2008) ; **d**, **e**, **f**, **g**, **h** d'après (Dauphin *et al.,* 2008))

4.5. Les processus de biominéralisation de la perle

La perle de culture de Polynésie française provient de la greffe « allogénique » de l'huître perlière *P. margaritifera* qui consiste à introduire dans la poche perlière d'une huître perlière dite receveuse une portion de manteau (greffon) d'une huître perlière différente dite donneuse et une bille de nacre (nucléus) (figure 1a) (Southgate and Lucas, 2008) (cf. 2.3). L'épithélium externe monostratifié du greffon au contact du nucléus se multiplie et forme un sac perlier autour du nucléus (figure 1i). Le sac perlier sécrète la matrice organique guidant les dépôts de biominéraux (polymorphes de carbonate de calcium) à la surface du nucléus (Aoki, 1966; Dix, 1973).

4.5.1. Le sac perlier

L'étude du sac perlier a majoritairement été entreprise par des méthodes histologiques et histochimiques (Aoki, 1966; Dix, 1973; Velayudhan *et al.,* 1992; Herbaut *et al.,* 2000; Hui, 2001; Chatchavalvanich *et al.,* 2010; Cochennec-Laureau *et al.,* 2010). Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir observer directement la structure et la formation du sac perlier à partir du greffon au sein de la poche perlière (figure 19). Pour autant, l'origine cellulaire précise du sac perlier est longtemps restée floue du fait que les cellules du greffon de l'huître perlière donneuse fusionnent avec les tissus de la poche perlière de l'huître perlière receveuse, phénomène susceptible de faire intervenir un grand nombre de processus cellulaires de type dédifférenciation et prolifération cellulaire (Herbaut *et al.,* 2000). L'utilisation de marqueurs génétiques de type DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) développés chez *P. margaritifera* (Arnaud-Haond *et al.,* 2002) a néanmoins permis de démontrer la persistance du génome (ou cellules) de l'huître perlière donneuse au sein de l'huître perlière receveuse, et ce jusqu'à la fin de la formation de la perle, au moment de la récolte (Arnaud-Haond *et al.,* 2006). Des observations récentes ont également permis de montrer que la mise en place et la structure du sac perlier étaient déterminantes quant au succès de l'acte de greffe (Cochennec-Laureau *et al.,* 2010). En effet, il semble que les phénomènes de rejets, bien que certainement d'origines multifactorielles, soient essentiellement liés à la présence de lésions ou de débris au niveau des tissus de l'huître perlière receveuse et à la mise en place d'une réaction inflammatoire suite à l'acte de greffe.

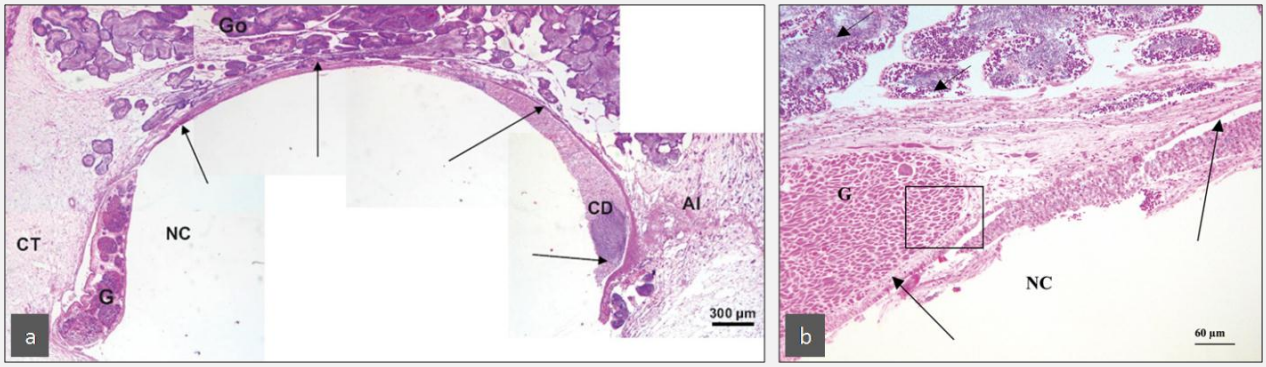

Figure 19. Coupes histologiques du greffon et du sac perlier de *P. margaritifera*. **a** : coupes histologiques du sac perlier. L'épithélium monostratifié biominéralisateur constituant le sac perlier peut être observé en continu tout le long des coupes (flèches). **b** : coupe histologique du greffon. Le sac perlier est issu de la prolifération des cellules de l'épithélium externe du greffon (flèches). CT: Tissus conjonctif. NC: Cavité du nucléus. G: Greffon. Go: Gonade. CD: Débris cellulaires. AI: Zone d'incision de la poche. (Cochennec-Laureau *et al.,* 2010).

Le recours à la génomique pour étudier les processus de biominéralisation au sein du sac perlier est très récent. Certains travaux préliminaires ont permis d'observer un « effet donneuse » (influence d'une huître perlière donneuse sur les caractéristiques des perles), notamment sur la couleur et le lustre des perles (Wada and Komaru, 1996). Il a logiquement été supposé que les protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille, et notamment celles identifiées comme étant constitutives de la nacre, seraient également à l'origine de la formation de la nacre des perles. La question a donc été de savoir si les gènes exprimés dans le manteau, et donc dans le greffon, étaient également exprimés dans le sac perlier. En 2009, Wang *et al.* étudient pour la première fois le niveau d'expression de six gènes codant des protéines constitutives de la nacre des coquilles par qPCR au sein de poches perlières de *P. fucata* (Wang *et al.,* 2009), à savoir la Nacrein (Miyamoto *et al.,* 1996; Miyamoto *et al.,* 2005), EFCBP (extracellular EF-hand calcium-binding protein) (Huang *et al.,* 2007), N16 (Samata *et al.,* 1999), ACCBP (amorphous calcium carbonate-binding protein) (Ma *et al.,* 2007), MSI60 (Sudo *et al.,* 1997) et N19 (Yano *et al.,* 2007). Les résultats montrent qu'un an après la greffe, l'ensemble des gènes étudiés sont exprimés au sein du sac perlier. Les niveaux d'expression variables des gènes les uns par rapport aux autres, mais également par rapport à leurs niveaux d'expression au sein du manteau, suggèrent l'existence de mécanismes de régulation des gènes tout au long de l'activité de biominéralisation du sac perlier, où l'influence de l'huître perlière receveuse ne saurait être écartée. En 2010, Inoue *et al.*, complètent cette approche en étudiant par qPCR la cinétique du niveau d'expression de six gènes impliqués dans la biominéralisation au sein de poches perlières de *P. fucata*, 4, 10, 15 et 48 jours après la greffe (Inoue *et al.,* 2010). Ces gène codent les protéines MSI60 (Sudo *et al.,* 1997) et N16, impliquées dans la formation de la couche nacrée de la coquille, MSI31 (Sudo *et al.,* 1997), la Prismalin-14 (Suzuki *et al.,* 2004) et l'Aspein (Tsukamoto *et al.,* 2004), impliquées dans la formation de la couche prismatique de la coquille, et enfin la Nacrein impliquée à la fois dans la formation de la couche nacrée et de la couche prismatique de la coquille. Les résultats montrent que le niveau d'expression des gènes diminue dans les 15 jours qui suivent la greffe, puis augmente entre 15 et 48 jours après la greffe. Il a été émis l'hypothèse que les cellules épithéliales n'induisent pas la transcription des gènes de la biominéralisation lors des premiers jours qui suivent la greffe afin de concentrer leur énergie vers la mise en place du sac perlier. Les processus de biominéralisation ne débuteraient que lorsque la mise en place du sac perlier serait suffisamment avancée dans le temps, soit aux alentours de 45 jours (figure 1i).

4.5.2. Vers une analyse génomique de la qualité de la perle

La question de la qualité de la perle par rapport aux processus de biominéralisation dépend d'un grand nombre de facteurs encore peu documentés dans la littérature. Différentes hypothèses environnementales et infectieuses ont été avancées pour tenter d'expliquer l'apparition des défauts à la surface des perles : une étude détaillée de l'acte chirurgical de greffe a montré que celui-ci est décisif pour la réussite de la greffe (Cochennec-Laureau *et al.,* 2005; Montagnani *et al.,* 2006). La qualité des perles récoltées est directement liée aux conditions sanitaires, à la qualité de découpe du greffon et sa position par rapport au nucléus et à la poche perlière au moment de la greffe. Des analyses histologiques et ultrastructurales suggèrent également que les défauts observés à la surface des perles seraient attribuables à une malformation du sac perlier, entraînant un dysfonctionnement de l'épithélium et une diminution de ses qualités minéralisatrices (Hui, 2001). Enfin, des études de cristallographie suggèrent que les défauts seraient associés à la présence de dépôts minéraux hétérogènes soit en épaisseur soit en structure (calcite ou aragonite) (Caseiro, 1993; Comps *et al.,* 2000).

La qualité de la perle à proprement parler n'a été abordée sous l'angle de la génomique que très récemment, puisqu'elle n'a fait l'objet que de deux publications, dont la première date de 2010 (Inoue *et al.,* 2010; Inoue *et al.,* 2011). Dans ces travaux, Inoue *et al.* étudient le niveau d'expression de six gènes (codant les protéines MSI60, N16, la Nacrein, MSI31, la Prismalin-14 et l'Aspein), au sein de poches perlières ayant donné des perles de bonne ou de mauvaise qualité récoltées au bout de deux mois chez *P. fucata* ; les perles de bonne qualité étant uniquement recouvertes de nacre, tandis que les perles de mauvaise qualité présentent à la fois une surface nacrée et une surface prismatique (Inoue *et al.,* 2010). Ces auteurs ont montrés que ces six gènes étaient exprimés au sein de toutes les poches perlières étudiées, venant confirmer les résultats obtenus par Wang *et al.*, (2009) et Inoue *et al.*, (2010), et que l'expression du gène codant MSI31 (impliqué dans la biominéralisation de la couche prismatique de la coquille) était surexprimé dans les poches perlières ayant donné des perles de mauvaise qualité. Ces résultats

constituent la première démonstration que le niveau d'expression d'un gène impliqué dans les processus de biominéralisation peut être corrélé à la qualité de la perle.

Dans un second article, ces mêmes auteurs ont étudié le niveau d'expression de cinq des six gènes précédents (codant les protéines MSI60, la Nacrein, MSI31, la Prismalin-14 et l'Aspein), cette fois au sein du manteau des huîtres perlières receveuses ayant donné des perles de bonne ou de mauvaise qualité récoltées au bout de deux mois chez *P. fucata* (Inoue *et al.,* 2011). Des études précédentes avaient montré que le gène codant MSI60 (impliqué dans la formation de la couche nacrée de la coquille) était surexprimé dans la zone dorsale de l'épithélium externe du manteau, alors que les gènes codant les protéines MSI31, Prismalin-14 et Aspein (impliqués dans la formation de la couche prismatique de la coquille) étaient surexprimés dans la zone ventrale (Takeuchi *et al.,* 2006) (figure 5a). Les résultats de Inoue *et al.*, (2011) confirment les observations réalisées par Takeuchi *et al.*, (2006). En effet, tant au sein des poches perlières ayant donné des perles de bonne qualité qu'au sein des poches perlières ayant donné des perles de mauvaise qualité, il existe un différentiel d'expression des gènes entre les zones ventrales et dorsales de l'épithélium externe du manteau. En revanche, en comparant le niveau d'expression des gènes entre poches perlières ayant donné des perles de bonne et de mauvaise qualités, ces auteurs montrent que le niveau d'expression du gène codant l'Aspein (au niveau de la zone ventrale de l'épithelium) est plus important chez les huîtres perlières receveuses ayant donné les perles de mauvaise qualité (figure 20). De manière similaire, le niveau d'expression du gène codant MSI60 (au niveau de la zone dorsale de l'épithelium) est plus important chez les huîtres perlières receveuses ayant donné les perles de bonne qualité. Autrement dit, les gènes impliqués dans la formation des prismes sont surexprimés au sein du manteau de l'huître perlière receveuse ayant donné les perles de mauvaise qualité, et les gènes impliqués dans la formation de la nacre sont surexprimés au sein du manteau de l'huître perlière receveuse ayant donné les perles de bonne qualité. Ces résultats constituent la première démonstration que le niveau d'expression d'un gène impliqué dans les processus de biominéralisation au sein de manteau l'huître perlière receveuse peut être corrélé à la qualité de la perle. L'origine de cette corrélation reste cependant non élucidée. Bien que l'existence d'un effet donneuse soit aujourd'hui admise, l'impact du rôle de l'huître perlière receveuse, notamment au niveau des régulations qui peuvent être mises en place lors des processus de biominéralisation de la perle, est une question nouvelle qui reste à explorer.

Chapitre II: Introduction

1. Intitulé de la thèse et encadrement

Ce projet de thèse s'intitule :

« Approche transcriptomique globale pour l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *Pinctada margaritifera* et le développement de biomarqueurs appliqués à la sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons »

Les travaux ont commencé en mai 2008 (Convention 8.0062 du 21 février 2008), et sont financés pour une durée de trois ans par le Service de la Perliculture. Cette thèse est réalisée sous la direction du Docteur Yannick Gueguen (Ifremer) et du Professeur Marcel Le Pennec (Université de la Polynésie Française). Les docteurs, Caroline Montagnani (Ifremer), Nathalie Cochennec-Laureau (Ifremer) et David Piquemal (Société Skuldtech) participent à l'encadrement de la thèse. Les travaux ont été réalisés dans les laboratoires de la société Skuldtech (Montpellier) et dans le Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle de Ifremer (Tahiti), nouvellement équipe fonctionnelle « Qualité de la perle » du laboratoire EP.

A l'Ifremer, ces travaux s'intègrent au sein du projet « Développement durable de la perliculture », et au sein de l'action 3 (Analyse du processus complet de la greffe, du choix du greffon à la minéralisation de la perle) du GDR ADEQUA « Groupement De Recherche pour l'Amélioration de la qualité des perles de Polynésie française ».

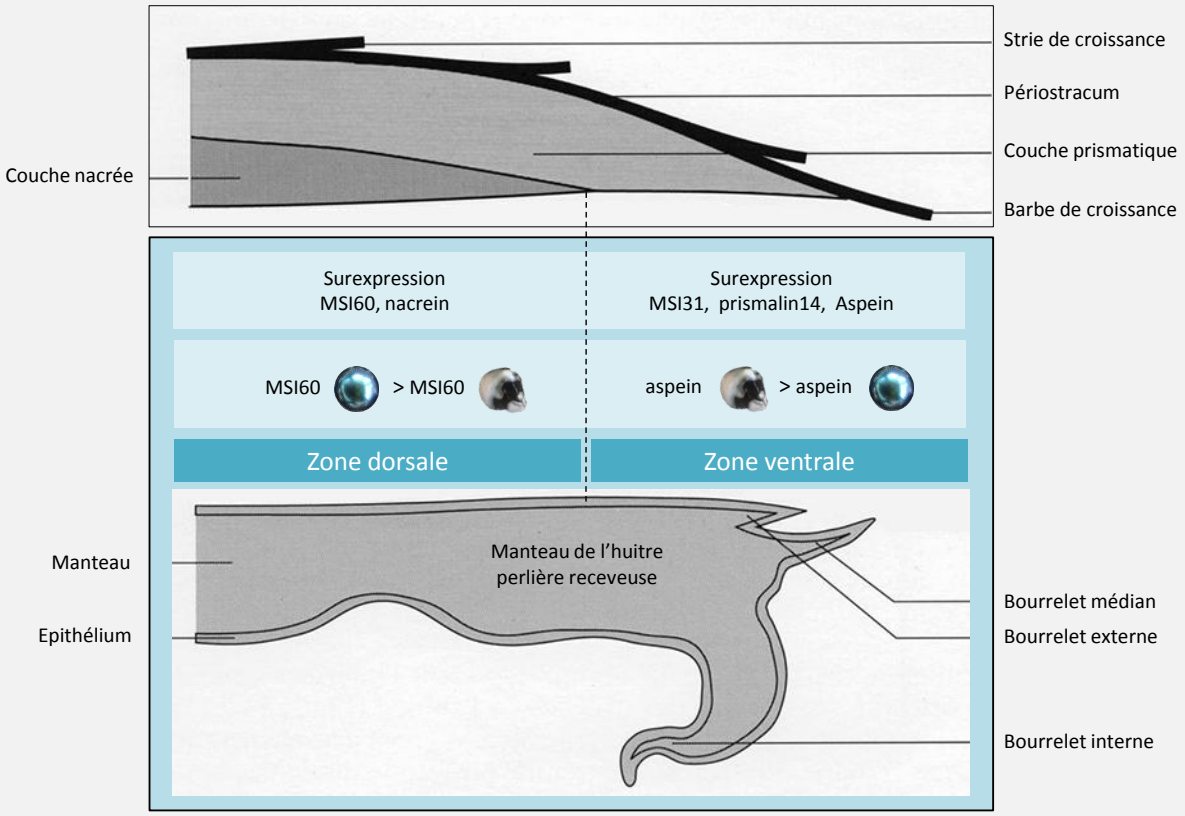

Figure 20. Expression différentielle de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de la biominéralisation, corrélation avec la qualité de la perle chez *P. fucata*. Les gènes codant les protéines MSI60 et Nacrein (impliqués dans la formation de la couche nacrée de la coquille) sont surexprimés dans la zone dorsale de l'épithélium externe du manteau, alors que les gènes codant les protéines MSI31, Prismalin-14 et Aspein (impliqués dans la formation de la couche prismatique de la coquille) sont surexprimés dans la zone ventrale. Le niveau d'expression du gène codant l'Aspein est plus important chez les huîtres perlières receveuses ayant donné les perles de mauvaise qualité, et le niveau d'expression du gène codant MSI60 est plus important chez les huîtres perlières receveuses ayant donné les perles de bonne qualité. (Schéma C. Joubert).

2. Présentation des laboratoires d'accueil

2.1. Skuldtech

Skuldtech est une société de biotechnologie innovante spécialisée dans la découverte et l'exploitation de marqueurs biologiques caractéristiques d'une maladie ou d'une situation physiopathologique déterminée. La société possède un savoir-faire technologique unique en Europe pour extraire et traiter l'information biologique en associant expression génique par séquençage haut-débit, bioinformatique et analyse et interprétation de données biologiques. Ce savoir-faire de plus de 10 ans permet d'identifier et de quantifier de manière précise et exhaustive l'ensemble des gènes impliqués dans chaque situation physiopathologique, que ces gènes soient connus ou non, que le génome de l'organisme étudié ait été séquencé ou non. Skuldtech peut donc caractériser les biomarqueurs spécifiques de toute condition physiopathologique ou de tout organisme. Les produits et services proposés par la société couvrant un large spectre d'applications dans le domaine des Sciences de la Vie, ils sont proposés dans le cadre de prestations de services, de contrat de recherche ou de partenariats. Enfin, Skuldtech est partenaire de plusieurs bioclusters régionaux : le Canceropole Grand Sud Ouest, le pôle de compétitivité Eurobiomed et son groupe thématique Euromediag, ainsi que le groupement d'entreprises Biomeridies.

2.2. Le centre IFREMER du Pacifique (CIP) et le laboratoire Ecosysteme perlicole (EP)

L'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) est un établissement public à caractère industriel et commercial né de la fusion de deux organismes, le CNEXO (Centre National pour l'EXploitation des Océans) et l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes) par décret du 5 juin 1984. Localisé à Tahiti (Polynésie française) sur la commune de Vairao, le Centre Ifremer du Pacifique (CIP) regroupe les délégations Ifremer de Polynésie française et de Nouvelle-Calédonie. L'unité de recherche de Polynésie française héberge actuellement une trentaine de chercheurs et techniciens bénéficiant d'un support logistique et administratif. Elle a pour vocation essentielle la recherche en appui au développement des filières locales : la perliculture, la crevetticulture, la pisciculture et les énergies marines renouvelables. Les recherches portent également sur l'environnement et la biodiversité des écosystèmes marins exploités.

Une grande partie des moyens dont dispose l'unité de recherche de Polynésie française est aujourd'hui tournée vers l'étude de l'huître perlière *P. margaritifera* (Domestication, Ecologie larvaire, Pathologie et Veille Sanitaire, Optimisation de la greffe et Amélioration de la Qualité de la Perle). A l'origine, deux laboratoires ont étudié et travaillé sur ce modèle biologique au sein du CIP : le Laboratoire de Domestication de l'huître perlière (LDHP) crée en 2004, et le Laboratoire de Biologie et de Qualité de la Perle (LBQP) créé en 2006. Depuis le 1er Mars 2011 et dans le cadre de la réorganisation de l'Ifremer, ces deux laboratoires ont été fusionnés en un seul, le laboratoire « Ecosystème Perlicole » (EP). Ce laboratoire appartient à l'Unité de Recherche « Ressources Marines en Polynésie Française » (RMPF) au sein du département « Ressources Biologiques et Environnement » (RBE). Le laboratoire EP est constitué de trois équipes opérationnelles : « Domestication », « Qualité de la perle » et « Gestions des lagons ».

La mission principale de l'équipe opérationnelle « Qualité de la perle » est de contribuer au développement des recherches sur l'optimisation de la greffe des huîtres perlières, l'étude des processus de minéralisation de la perle de culture (recherche et caractérisation de marqueurs moléculaires de biominéralisation) et l'amélioration de la qualité de la perle. Cette équipe apporte également un soutien au Service de la Perliculture dans le fonctionnement d'un réseau de veille zoo-sanitaire des huîtres perlières des lagons polynésiens (histopathologie, microbiologie). L'équipe opérationnelle « Domestication » étudie les mécanismes physiologiques de la reproduction et les besoins nutritionnels en relation avec la dynamique de la gamétogenèse de l'huître perlière *P. margaritifera*. Ces travaux ont pour objectif la mise au point des techniques de reproduction de cette espèce en écloserie. La maîtrise de la reproduction permet d'engager un processus de sélection génétique des huîtres perlières basé sur des critères de couleur et de croissance de la perle. Deux axes ont ainsi été privilégiés, à savoir l'étude du déterminisme familial des critères de sélection et l'étude du polymorphisme de la couleur de la nacre. A terme, ces acquis permettront de constituer des stocks fondateurs à la sélection.

3. Contexte scientifique

La perliculture occupe une place primordiale dans l'économie polynésienne. Mais la diminution de la qualité des perles suite à l'augmentation rapide de la production au début des années 90 a entrainé une diminution de la rentabilité des fermes perlières, comme en témoigne une chute du prix moyen du gramme de perle à l'exportation observée dès le début des années 2000. Face à la crise économique que cette filière connait depuis une dizaine d'années, et conscient du poids de l'activité perlicole dans l'économie polynésienne, le Service de la Perliculture a instauré une classification officielle des perles afin d'en garantir la qualité à l'exportation. En moyenne, sur une récolte, seul 3 à 5% de perles sont de très bonne qualité. Dans ce contexte, développer des outils permettant d'augmenter le pourcentage de perles de qualité constitue un atout considérable pour la profession.

Le Service de la Perliculture a donc développé un certain nombre de projets de recherche, en collaboration avec l'Ifremer, visant à améliorer la qualité de la perle. Du fait du manque de données disponibles sur la formation des perles chez *P. margaritifera*, les premiers travaux se sont essentiellement concentrés sur l'optimisation de l'acte de greffe et l'identification des facteurs à l'origine de l'apparition des défauts. Les résultats ont permis de mettre en évidence des causes plurifactorielles à l'apparition des défauts des perles, révélant alors toute la complexité sous-jacente aux processus de biominéralisation. Dans ce contexte, l'étude des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et la minéralisation de la perle est apparue comme un préalable à toute idée d'amélioration de la qualité des perles. Des travaux ont donc été menés au LBQP dans l'objectif d'apporter des éléments nouveaux menant à une meilleure compréhension des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et la minéralisation de la perle. La nécessité d'aborder l'étude du processus complet de formation d'une perle par une approche globale a abouti en 2008 à la mise en place d'un réseau de collaboration pluridisciplinaire, le « Groupement De Recherche pour l'Amélioration de la Qualité des Perles de Polynésie française » (GDR ADEQUA).

3.1. Les travaux du laboratoire « Biotechnologie et Qualité de la Perle »

Depuis sa création, le LBQP collabore avec le Service de la Perliculture afin de développer des travaux visant à optimiser la technique de greffe et à améliorer la qualité des perles. L'analyse des processus de biominéralisation et de formation de la perle au sein des différents compartiments de la greffe (greffon, sac perlier) sont abordés par des approches techniques complémentaires (cytologiques, moléculaires et fonctionnelles). Des premiers travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois chez *P. margaritifera* trois gènes codant pour des protéines de la matrice organique impliquées dans les processus de biominéralisation par approche gène candidat (recherche de gènes présentant des homologies pour des séquences connues chez d'autres organismes). Ces gènes présentent d'importantes conservations avec des molécules impliquées chez d'autres espèces d'huîtres perlières (*P. fucata* et *P. maxima*) dans la biominéralisation de la coquille (Miyamoto *et al.,* 1996; Samata *et al.,* 1999; Miyamoto *et al.,* 2003; Matsushiro and Miyashita, 2004; Tsukamoto *et al.,* 2004). Ces gènes (*pmarg*-Pearlin, *pmarg*-Nacrein et *pmarg*-Aspein), impliqués dans la synthèse de l'aragonite et de la calcite, sont parmi les premières données moléculaires disponibles relatives aux processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* (Montagnani *et al.,* 2011). Ils constituent de fait de bons outils pour l'étude des processus de biominéralisation chez cette espèce :

- La localisation des transcrits de ces gènes par HIS a permis de mettre en évidence qu'ils étaient localisés de façon spécifique au niveau de l'épithélium minéralisateur du manteau chez *P. margaritifera*. L'expression de *pmarg*-Pearlin est spécifique à la zone dorsale du manteau traditionnellement impliquée dans la production de nacre, tandis que l'expression de *pmarg*-Aspein est spécifique à la zone ventrale du manteau traditionnellement impliquée dans la formation de la couche calcitique de la coquille. Les transcrits de ces gènes sont donc localisés dans des zones spécifiques et distinctes du manteau, définissant une limite fonctionnelle précise de l'épithélium, au niveau duquel sont découpés les greffons. Le sac perlier issu de ce type de greffon peut donc avoir une double fonction associée à la nature et à la qualité des dépôts de nacre autour du nucléus.
- La localisation de ces transcrits par HIS a également permis de mettre en évidence qu'ils étaient exprimés au niveau de l'épithélium minéralisateur des sacs perliers chez *P. margaritifera*. Le niveau d'expression de ces transcrits est hétérogène au sein d'une même poche, mais également entre les poches de différents individus.

- La quantification de l'expression de *pmarg*-Pearlin par qPCR au niveau de l'épithélium du manteau a montré qu'il existait une variation dorso-ventrale importante de l'expression de ce gène dans ce tissus, *pmarg*-Pearlin étant comparativement moins exprimée au niveau de la zone ventrale du manteau qu'au niveau de la zone dorsale. L'expression de *pmarg*-Pearlin présente également une forte variabilité individuelle, suggérant que les huîtres perlières donneuses et les greffons préparés ne présenteraient pas une activité cellulaire identique.
- Enfin, des analyses biochimiques des protéines codées par les gènes *pmarg*-Pearlin et *pmarg*-Nacrein ont permis de les localiser au sein des structures minéralisées de *P. margaritifera*. La protéine codée par le gène *pmarg*-Pearlin est exprimée au niveau des couches nacrées de la coquille, tandis que la protéine codée par le gène *pmarg*-Nacrein est exprimée à la fois au niveau des couches nacrées et prismatiques de la coquille. Ces observations suggèrent l'implication de ces protéines dans la formation des structures minéralisées de la coquille chez *P. margaritifera*.

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'activités minéralisatrices hétérogènes des épithéliums composant le manteau, les greffons et les sacs perliers. Les hétérogénéités des profils d'expression observés pourraient donc avoir des incidences sur les propriétés de minéralisation des tissus à l'origine des perles : greffons et sacs perliers.

3.2. GDR ADEQUA

Etant donné le manque de connaissances sur les processus menant à la formation de perles de qualité et la pression socio-économique engendrée par le déclin de la perliculture, la nécessité de développer une dynamique de recherche et de collaboration s'est fait ressentir, et a abouti en 2006 à la création du « Groupement De Recherche pour l'Amélioration de la Qualité des Perles de Polynésie française » (GDR ADEQUA), mis en place par l'Ifremer et le Service de la Perliculture. Ce projet de recherche, qui se veut appliqué et finalisé, a pour but d'aborder l'étude du processus complet de formation d'une perle par une approche globale. Il a pour ambition de décrire précisément et de mieux comprendre les mécanismes biologiques de la greffe et d'acquérir des connaissances sur les processus cellulaires et moléculaires de minéralisation des perles, afin d'en améliorer leur qualité. Ce projet, d'une durée de quatre ans (2008-2012), repose sur la mise en place d'une approche globale et pluridisciplinaire et fait intervenir de façon coordonnée 10 partenaires, à Tahiti (l'Ifremer Tahiti, le Service de la Perliculture, l'Université de la Polynésie française, le Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement) et en France (Ifremer Montpellier, Université Paris Sud, Université de Bourgogne, Université de Caen Basse-Normandie et les sociétés Skuldtech et Texinfine).

Les objectifs principaux du GDR sont :
- Développer des recherches répondant aux problématiques de la perliculture
- Augmenter le pourcentage de perles de qualité produites
- Disposer d'un nucléus de qualité respectant l'environnement
- Développer des biomarqueurs de qualité des perles et produire des huîtres sélectionnées
- Acquérir des connaissances sur les mécanismes biologiques de la greffe et de la minéralisation

Pour ce faire, le GDR s'articule autour de 6 axes de recherche (figure 21) :
- Action 1 : Influence des facteurs externes sur la réussite de la greffe et la qualité de la perle.
- Action 2 : Amélioration de la qualité du nucléus.
- Action 3 : Analyse du processus complet de la greffe, du choix du greffon à la minéralisation de la perle.
- Action 4 : Caractérisation de la couleur de la coquille et des perles.
- Action 5 : Amélioration génétique de l'huître donneuse de greffons.
- Action 6 : Description précise et recensement des défauts observés à la surface de la perle.

A terme, l'objectif est de fournir de nombreuses applications utilisables par les professionnels. Toutes ces données permettront à la Polynésie française de valoriser au mieux sa production en augmentant le pourcentage de perles de bonne qualité.

4. Démarche et objectifs de la thèse

4.1. Rappels sur l'apport des banques de séquences en génomique

Le séquençage de l'ADN (ou du génome), s'il fournit une masse précieuse d'informations, n'apporte en lui-même aucun renseignement sur l'expression et la fonction des gènes dans les cellules. Pour répondre à une question biologique précise, il faut s'intéresser au transcriptome, c'est-à-dire aux gènes spécifiquement exprimés dans les différents tissus d'un individu d'une espèce donnée, à leurs niveaux d'expression, et aux conditions dans lesquelles ils sont exprimés. De plus, quand on sait que la différence d'expression individuelle et spatio-temporelle des gènes est très variable en fonction des diverses conditions étudiées, alors le séquençage du transcriptome et la constitution de banques de données transcriptomiques s'avère une façon efficace d'identifier des gènes chez une espèce en réponse à une question biologique bien précise.

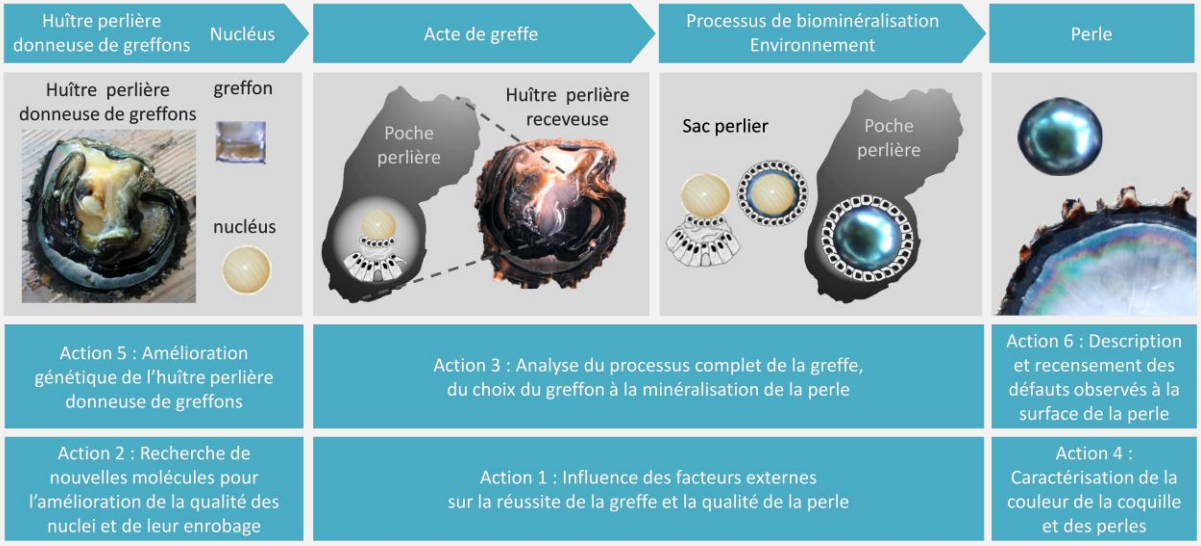

Figure 21. GDR ADEQUA. Le GDR s'articule autour de 6 axes de recherche. **Action 1** : influence des facteurs externes sur la réussite de la greffe et la qualité de la perle. **Action 2** : amélioration de la qualité du nucléus. **Action 3** : analyse du processus complet de la greffe, du choix du greffon à la minéralisation de la perle. **Action 4** : caractérisation de la couleur de la coquille et des perles. **Action 5** : amélioration génétique de l'huître donneuse de greffons. **Action 6** : description précise et recensement des défauts observés à la surface de la perle. (Photos : Ifremer, C. Montagnani, C. Joubert ; Schéma, C. Joubert d'après C. Montagnani).

On distingue, parmi les banques de données transcriptomiques les plus couramment utilisées, les banques EST (Expressed Sequence Tag, ou étiquettes de séquences transcrites), les banques SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, ou analyse en série de l'expression des gènes, désormais appelées Digital Gene Expression ou DGE) (Velculescu *et al.,* 1995; Anisimov, 2008), et plus récemment, la méthode RNAseq, ou WTSS (Whole Transcriptome Shotgun Sequencing) (Wang *et al.,* 2009). En fonction de ces différentes techniques utilisées, le séquençage des transcrits permet d'établir des catalogues de gènes et/ou des profils d'expression géniques spécifiques des conditions étudiées, en fournissant une image instantanée des gènes exprimés dans un organe ou un tissu, et à un stade de développement donné. Enfin, il est important de mentionner que ces méthodes ont pu voir le jour grâce à l'avènement des méthodes de séquençage haut-débit (Next Generation Sequencing ou NGS), permettant ainsi l'analyse simultanée de plusieurs milliers de séquences. En ce sens, ces nouvelles méthodes NGS se démarquent des méthodes de biologie moléculaire antérieures (séquençage par la méthode Sanger) dont les limitations techniques ne permettaient jusqu'alors de s'intéresser qu'à un petit nombre de séquences à la fois.

4.2. Objectifs de la thèse : mieux comprendre les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* pour l'identification des biomarqueurs de croissance et de la qualité de la perle

A la lumière de l'ensemble des travaux entrepris jusqu'alors, il est certain que les causes d'imperfections à la surface des perles sont d'origines multifactorielles (technique de greffe, mécanismes cellulaires et génétiques…). De plus, bien que la structure des cristaux ou la nature des protéines composant les coquilles des huîtres perlières soient aujourd'hui bien étudiées, les bases moléculaires de la formation et la structure des perles restent largement méconnues. Dans ce contexte, ce projet de thèse a pour ambition d'approfondir les connaissances concernant les processus de biominéralisation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera*. L'objectif fondamental est ici d'avoir une vision intégrée des évènements de transcriptomique ayant lieu au niveau des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille (manteau) et de la perle (greffon, poche perlière) afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place dans le cadre de l'élaboration des différentes structures minéralisées chez *P. margaritifera*. Cette approche fondamentale constitue le préalable à l'objectif appliqué de développer des outils d'évaluation, ou gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle, pour la sélection d'huîtres donneuses de greffons de « haute qualité minéralisatrice ». Les biomarqueurs de qualité de la perle ainsi identifiés pourront alors être directement exploités dans le cadre des travaux d'amélioration génétique des huîtres donneuses menés par l'équipe fonctionnelle « Domestication » du laboratoire EP de l'Ifremer à Tahiti.

4.3. Démarche de la thèse : mise en place d'une approche transcriptomique globale et d'un dispositif de greffe expérimentale pour l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation chez *P. margaritifera* et la mise au point de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle

Dans un premier temps, la démarche mise en place dans le cadre de cette thèse a consisté à développer une approche globale d'analyse du transcriptome afin d'identifier des gènes exprimés au sein des cellules épithéliales des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille (manteau) et de la perle (greffons et poches perlières) (figure 22). Cette approche a été menée grâce à la constitution d'une banque EST de manteau et de quatre banques SAGE de greffons et de poches perlières.

La constitution de la banque EST de manteau nous a permis d'identifier un catalogue de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille chez *P. margaritifera*. La quantité de données expérimentales récoltées par cette approche étant très importante, le traitement, la capitalisation et l'exploitation des données EST a été réalisée par bioinformatique, via la mise en place d'une base de données bioinformatique (database Oyster). La constitution des banques SAGE a été réalisée sur la base des résultats déjà obtenus au LBQP sur la caractérisation de zones fonctionnelles distinctes du manteau, et a permis d'identifier un ensemble de gènes potentiellement corrélés à la qualité du dépôt à la surface des perles. En parallèle, une approche protéomique globale des constituants de la coquille et des perles a également été menée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire UMR 5561 Biogéosciences de l'Université de Bourgogne, partenaires de l'action 3 du GDR ADEQUA. Cette approche a permis d'identifier une série de protéines qui, mise en parallèle aux données de la banque EST de manteau, a abouti à obtention d'un ensemble de gènes et de protéines respectivement exprimés à la fois au sein des tissus minéralisateurs et des structures minéralisées chez *P. margaritifera.*

L'ensemble des gènes identifiés par la mise en place en parallèle des approches transcriptomiques et protéomique globales ont fait l'objet d'une annotation et/ou d'un criblage par approche gène candidat afin d'identifier ceux potentiellement impliqués dans les processus de biominéralisation, et ont servi de base à une sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité des perles. Ces travaux font l'objet du chapitre III : « Identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* pour la sélection de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle ».

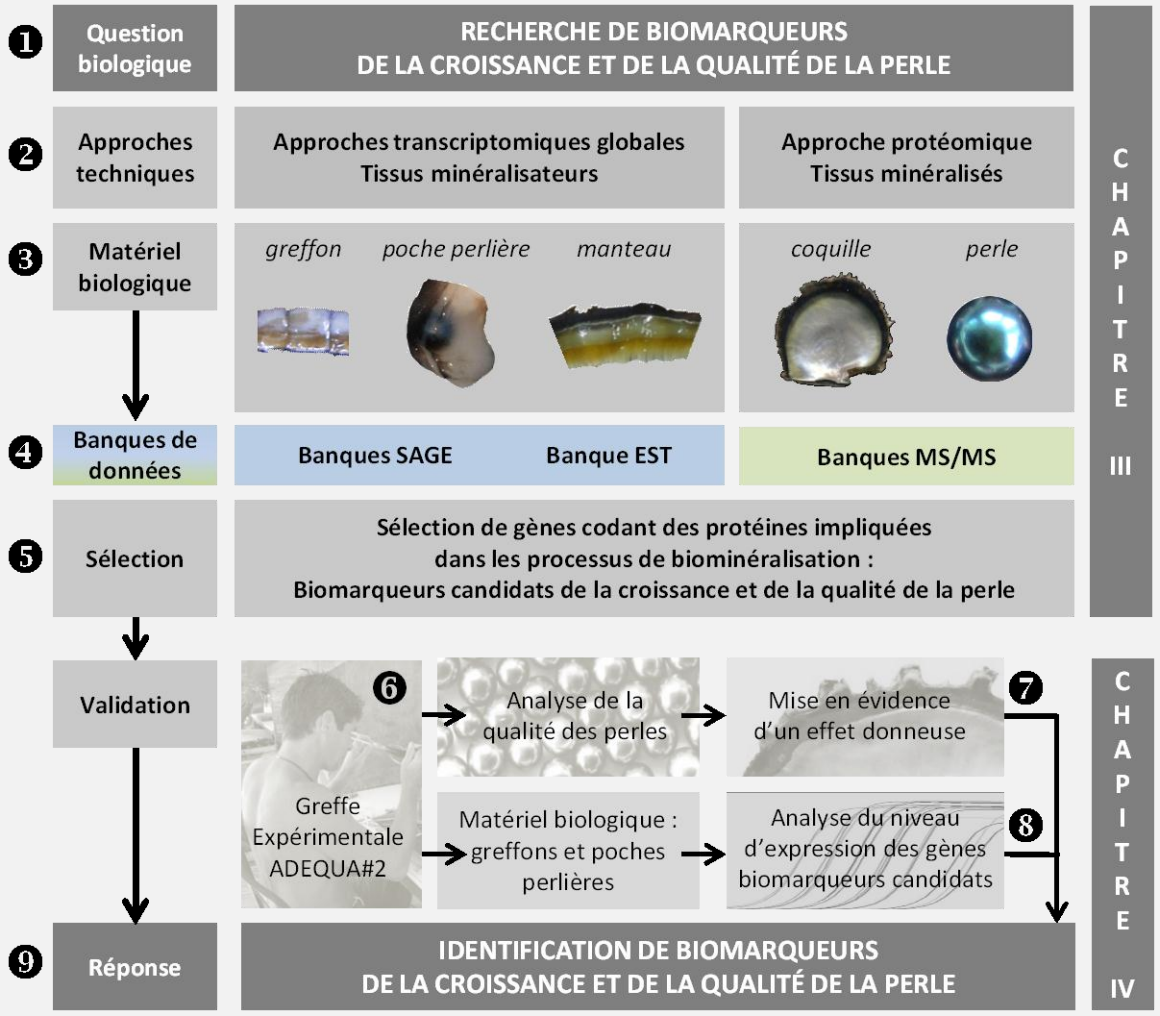

Figure 22. Objectifs et démarche de la thèse. ❶ : l'objectif de la thèse est d'identifier des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. ❷ : la démarche a consisté à développer deux approches transcriptomiques complémentaires sur les tissus minéralisateurs et une approche protéomique globale en parallèle sur les tissus minéralisés de *P. margaritifera*. ❸ et ❹ : des banques de données SAGE ont été mise en place sur des tissus minéralisateurs de la perle, greffons et poches perlières, dans l'objectif d'identifier des gènes différentiellement exprimés en fonction de zones fonctionnelles potentiellement associées à des qualités de perles contrastées. Afin de combler ces lacunes et ainsi faciliter l'annotation des données issues des banques SAGE, une banque EST de manteau a également été développée en parallèle par pyroséquençage sur du manteau, le tissu biominéralisateur de la coquille. Enfin, l'approche protéomique globale a été développée en parallèle sur les tissus minéralisés *P. margaritifera* afin d'identifier les protéines qui composent la coquille et la perle. ❺ : La mise en place des approches transcriptomiques et protéomique globales ont permis d'aboutir à la sélection par « approche candidat » ou « en aveugle » de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*. ❻ : La validation des biomarqueurs a été entreprise grâce à la réalisation d'une greffe expérimentale (la greffe ADEQUA#2) qui a permis d'une part d'évaluer la qualité des perles récoltée et de mettre en évidence un « effet donneuse » (❼), et de disposer de matériel biologique (greffons et poches perlières) à l'origine de la production de perles de qualité contrastées d'autre part. ❽ : la validation des biomarqueurs candidat a par la suite été entreprise par qPCR haut-débit et a consisté à corréler statistiquement le niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats à une réalité biologique (la qualité des perles). ❾ : l'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein des greffons des huîtres perlières donneuses et des poches perlières des huîtres perlières receveuses, mise en relation avec l'effet donneuse a abouti à l'identification de biomarqueurs de qualité des perles. (Photos Ifremer).

Dans un second temps, la validation des biomarqueurs candidats en tant que biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle a été entreprise. Elle a consisté à corréler l'expression des biomarqueurs candidats à une réalité biologique, c'est-à-dire relier le profil et/ou le niveau d'expression des gènes à la qualité des perles.

Cette validation a été réalisée par qPCR haut-débit à partir d'échantillons de greffons d'huîtres perlières donneuses et de poches perlières d'huîtres perlières receveuses sélectionnés dans le cadre d'une greffe expérimentale (la greffe ADEQUA#2) au cours de laquelle ont également été récoltées les perles. Grâce à l'analyse physique et l'évaluation de la qualité des perles, l'influence des huîtres perlières donneuses sur les caractéristiques des perles a pu être démontrée. L'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein des greffons des huîtres perlières donneuses et des poches perlières des huîtres perlières receveuses, mise en relation avec la qualité des perles et l'effet donneuse, a abouti à l'identification de biomarqueurs de qualité des perles chez *P. margaritifera*. L'ensemble de ces travaux fait l'objet du chapitre IV « Mise en évidence de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle par la mise en place d'un dispositif de greffe expérimentale et l'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats chez *P. margaritifera* ».

4.4. Supports techniques et conceptuels

- Les données de transcriptomiques ont été traitées par la société Skuldtech. Les données de la banque EST de manteau sont intégrées dans une base de données (« Oyster ») disponible via une interface Web protégée.
- Les analyses du niveau d'expression des gènes au sein des tissus minéralisateurs par qRT-PCR et qPCR haut-débit ont respectivement été réalisées au sein des laboratoires du LBQP et de la Plateforme de Génomique Génotoul (Toulouse, France).
- La greffe expérimentale ADEQUA#2 permettant de disposer du matériel biologique destiné à la validation des biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle a été réalisée au Centre des Métiers de la Nacre et de la Perliculture de Rangiroa (CMNP), Polynésie française.
- L'analyse de la qualité commerciale des perles récoltées et leur classification ont réalisées en collaboration avec le Service de la Perliculture et les professionnels de la société Manapearl.

Chapitre III: Matériel et méthodes

1. Matériel biologique : l'huître perlière *P. margaritifera*

Dans le cadre des analyses transcriptomiques globales, les huîtres perlières de Polynésie française *P. margaritifera* utilisées pour la fabrication de la banque EST de manteau ont été élevées en lagon à l'Ifremer de Vairao (Tahiti, Polynésie française). Des huîtres perlières *P. margaritifera* en provenance d'Apataki (Tuamotu, Polynésie Française) puis élevées à Rangiroa (Tuamotu, Polynésie Française) ont été utilisées comme huîtres perlières donneuses et receveuses au cours de la greffe ADEQUA #1 pour la constitution des banques SAGE de greffons et de poches perlières. Des huîtres perlières *P. margaritifera* en provenance de Takaroa (Tuamotu, Polynésie Française) puis élevées à Rangiroa ont été utilisées comme huîtres perlières donneuses et receveuses au cours de la greffe ADEQUA #2 pour la validation des biomarqueurs de qualité de la perle. Dans le cadre de l'analyse protéomique globale, 10 huîtres perlières *P. margaritifera* (Polynésie Française) ont été utilisées.

2. Protocoles des greffes expérimentales

2.1. Greffe ADEQUA#1 : préparation du matériel biologique pour les constitutions des banques SAGE de greffons et de poches perlières

La greffe expérimentale ADEQUA #1 avait pour objectif d'obtenir des échantillons de greffons et de poches perlières 59 jours après greffe pour la constitution des banques SAGE. Cette greffe a été mise au point par Nathalie Cochennec-Laureau et Caroline Montagnani (Ifremer, LBQP, Tahiti) et a été réalisée au centre des métiers de la Nacre et de la Perle (CMNP) à Rangiroa par les enseignants Teiva Teriiamarama et Alexander Matarere, du 18/11/2007 au 15/01/2008. 24 huîtres perlières de Polynésie française *P. margaritifera* ont été utilisées comme huîtres donneuses de greffons. 30 greffons ont été découpés à partir du manteau de chaque valve de chaque huître perlière donneuse. Les greffons obtenus à partir de la valve gauche sont issus d'une découpe de type « 10/90 », et les greffons obtenus à partir de la valve droite sont issus d'une découpe de type « 90/10 ». 10 greffons en provenance de chaque valve de chaque donneuse ont été conservés pour être analysés dans le cadre de l'étude transcriptomique SAGE, soit 240 greffons « 10/90 » et 240 greffons « 90/10 » (480 greffons au total). 20 greffons en provenance de chaque valve de chaque donneuse ont été greffés dans des huîtres receveuses avec des nucléus de taille 2.0, soit 480 greffes avec des greffons 10/90 et 480 greffes avec des greffons 90/10 (960 greffes au total). Les poches perlières issues de ces greffes ont été récoltées 59 jours après la greffe. La culture des perles a été interrompue à l'issu de ces prélèvements.

2.2. Greffe ADEQUA#2 : préparation du matériel biologique pour l'étude de l'effet donneuse et la validation des biomarqueurs de qualité de la perle chez *P. margaritifera*

La greffe expérimentale ADEQUA #2 avait pour objectif d'obtenir des échantillons de greffons et de poches perlières pour la validation des biomarqueurs potentiels de la qualité de la perle. Cette greffe a été mise au point par Caroline Montagnani (Ifremer, LBQP, Tahiti) et a été réalisée au centre des métiers de la Nacre et de la Perle (CMNP) à Rangiroa par les greffeurs Jacques Pavaouau et Laurent Shan (de la ferme perlière « Gauguin's pearls »), du 16/11/2008 au 25/11/2008. 40 huîtres perlières de Polynésie française *P. margaritifera* de 3 ans environ ont été utilisées comme huîtres donneuses de greffons. Une trentaine de greffons de hauteur de découpe standard (greffons « afa-afa », découpés de part et d'autre de la ligne coloré apparente sur le manteau) ont été découpés à partir du manteau de chaque valve de chaque huître perlière donneuse. 1 à 2 greffons en provenance de chaque donneuse ont été conservés. Les greffons restant en provenance de chaque valve de chaque huître perlière donneuse ont été greffés dans des huîtres perlières receveuses. Un total de 1978 huîtres perlières receveuses ont été greffées avec des nucléus 2.4 bio. Des prélèvements de poches perlières et de perles ont été réalisés à huit temps : 1 jour, 7 jours, 21 jours, 2 mois, 3 mois, 6 mois, 12 mois et 18 mois.

3. Protocoles d'extraction des ARN, de synthèse des cDNA et de PCR quantitative

3.1. Extraction des ARN totaux

Afin de garantir une qualité maximale des ARN extraits, tout le matériel utilisé au cours de l'extraction est RNAse free. Les ARN sont isolés à partir d'un échantillon de manteau, de greffon ou de poches perlières issus des greffe ADEQUA#1 ou ADEQUA#2 (cf. Protocole expérimental) et conservés dans du RNAlater® (Ambion). Les tissus sont rincés avec 1mL de PBS, dilacérés au scalpel dans une boite de pétri sur glace puis repris dans 1 mL de Trizol® (Invitrogen). L'extraction se déroule sur agitateur sur la nuit à 4°C. Les tubes sont ensuite mis à incuber au bain-marie 5 min à 30°C, puis vortexés pendant 30 sec. Le broyat est centrifugé à 12000 g pendant 10 min à température ambiante, et 1mL de surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube. La séparation des acides nucléiques et des protéines est réalisée en ajoutant 200 µL de chloroforme par tube, et en mélangeant par inversion. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 12000g pendant 10 min à 4°C. La phase supérieure, d'environ 500 µL et contenant les ARN, est transférée dans un nouveau tube. Les ARN sont précipités sur la nuit à -80°C par 250 µL d'isopropanol et 250 µL d'une solution saline « High salt » (0,8 M TriSodium Citrate ; 1,2 M chlorure de sodium). Les échantillons sont centrifugés 30 min à 15000 g. Le surnageant est vidé, et le culot d'ARN est lavé deux fois au vortex avec 1 mL d'éthanol à 80% suivi d'une étape de centrifugation de 15000 g à 4°C pendant 15 min. Les culots sont ensuite séchés sous la hotte 10 min à température ambiante puis repris dans 50 µL d'eau RNAse free. Les tubes sont alors mis à incuber au bain-marie 10 min à 55°C, avant d'être homogénéisés à la main. Les ARN sont stockés à -80°C. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du TAE 0,5X à 100 mV, et par dosage spectrophotométrique au Nanodrop ND1000 et à l'Agilent 2100 Bioanalyzer (kit RNA 6000 Nano).

3.2. Transcription inverse des ARN

La synthèse des ADNc pour la constitution des banques SAGE et EST a été effectuée sur des pools d'ARN totaux de greffons, de poches perlières issus des greffes expérimentales ADEQUA#1 et ADEQUA#2. Pour chaque pool, 800 ng d'ARN totaux on été rétrotranscrits en utilisant le kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™ - Cat. No: 18080-051) et en suivant les instructions du fournisseur. La synthèse des ADNc de manteau pour la détermination de l'efficacité des couples d'amorces des gènes de référence et des gènes cibles a été réalisée à partir de 400 ng de pools d'ARN de manteau de 10 individus, en utilisant le kit transcriptor first strand cDNA synthesis (Roche Applied Science™ – Cat. No: 4379012001) et en suivant les instructions du fournisseur. La synthèse des ADNc de greffons et de poches perlières pour la détermination du niveau d'expression relatif des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle a été réalisée à partir de 3 µg d'ARN de greffons et 4 µg d'ARN poches perlières, en utilisant le kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™ - Cat. No: 18064-014) et en suivant les instructions du fournisseur.

3.3. qPCR et qPCR haut-débit

3.3.1. Détermination de l'efficacité des couples d'amorces qPCR

L'efficacité d'amplification (E) de chaque couple d'amorces des gènes de référence a été déterminée par qRT-PCR en réalisant une gamme de dilution en matrice d'ADNc (dilution 5, 10,100 et 1000). L'efficacité a été testée en triplicat, sur 9 individus, à deux températures d'hybridation (Tm) différentes (55°C et 60°C), pour une concentration finale en amorces de 200 nM. L'efficacité d'amplification (E) de chaque couple d'amorces des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle a été déterminée par qRT-PCR en réalisant une gamme de dilution en matrice d'ADNc de manteau issu d'un pool d'ARN de 10 individus (dilution 5, 10,100 et 1000 des ADNc). L'efficacité a été testée en duplicat à une température d'hybridation (Tm) de 60°C, pour une concentration finale en amorces de 200 nM. Les qPCR ont été réalisées sur le système Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) en utilisant le kit Brillant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (CAT#600828 - Agilent Technologies) en suivant les instructions du fournisseur. Le programme d'amplification réalisé est le suivant : 10 min de dénaturation à

95°C, 40 cycles d'amplification (30 sec de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à 60°C, 1 min d'élongation à 72°C) avec deux mesures de fluorescence à la fin de chaque cycle, et courbe de dissociation de 45°C à 95°C avec une augmentation de la température de 0,1°C.s^{-1} et une mesure de la fluorescence en continu. Les efficacités (E) de l'ensemble des couples d'amorces des gènes de référence et des gènes biomarqueurs candidats ont été calculées à partir des pentes des courbes standard par la formule [E=10(-pente)], avec un optimum de -0.32 < pente < -0.28, ou 2.089 > E > 1.90 (soit 90% < E < 110%). Les données ont été extraites et analysées à l'aide du logiciel Mxpro4.10.

3.3.2. Détermination du niveau d'expression relatif des gènes cibles biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle par qPCR haut-débit

La mesure du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle a été réalisé par qPCR haut-débit sur le système BioMark™ HD (Fluidigm Corporation) en utilisant le kit 2X TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems – P/N 4384266) pour l'étape de préamplification et le kit 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems – P/N 4369016) pour l'étape d'amplification, en suivant les instructions du fournisseur. Quatre puces Fluidigm 96.96 Dynamic Array Real Time PCR (BMK-M-96.96) ont été utilisées, permettant l'analyse du niveau d'expression de 96 gènes au sein de 96 échantillons par plaque, soit 9216 réactions de qPCR simultanées par plaque. Le programme d'amplification réalisé est le suivant : 2 min à 50°c puis 10 min de dénaturation à 95°C, 35 cycles d'amplification (15 sec de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation et d'élongation à 60°C) avec une mesure de fluorescence à la fin de chaque cycle, et courbe de dissociation de 60°C à 95°C avec une mesure de la fluorescence en continu tous les 1°C. Les données ont été extraites et analysées à l'aide des logiciels Fluidigm Real-time analysis (Fluidigm Corporation) et Biomark Melting Curve analysis (Fluidigm Corporation). Le niveau d'expression relatif des gènes a été déterminé par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) selon la formule suivante : fold = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = 2^-[DCt_{cible}-$DCt_{calibrator}$]. Le DCt_{cible} correspond à la moyenne des différences de Ct entre les gènes biomarqueurs d'intérêt et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe cible « A ». Le $DCt_{calibrator}$ correspond à la moyenne des différences de Ct entre les gènes biomarqueurs d'intérêt et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe calibrator « B » (cf. 5.2. du chapitre II).

4. Méthodes de génomique et de protéomique globales

4.1. Constitution et séquençage de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*

La banque EST a été réalisée à partir d'échantillons de manteaux d'huîtres perlières *Pinctada margaritifera*. 14 échantillons de manteaux ont été isolés, rincés avec 1 mL de PBS et lacérés au scalpel. Les ARN ont été extraits au Trizol. Après dosage et contrôle de la qualité des ARN, deux échantillons ont été éliminés de l'analyse. Un pool de 24 µg d'ARN a été réalisé avec 12 échantillons de manteaux, en utilisant 2 µg d'ARN par échantillon. Ce pool a été séquencé par pyroséquençage en utilisant le système GSFlex (454/Roche) en sous-traitance avec la société Skuldtech.

4.2. Constitution et séquençage des banques SAGE de greffons et de poches perlières de *P. margaritifera*

Deux banques SAGE ont été réalisées à partir d'échantillons de greffons de *P. margaritifera* : une banque SAGE de greffons de hauteur de découpe « 10/90 » issus de la valve gauche et une banque SAGE de greffons de hauteur de découpe « 90/10 » issus de la valve droite. 24 échantillons de greffons de hauteur de découpe « 90/10 » et 24 échantillons de greffons de hauteur de découpe « 10/90 » (1 greffon par valve/donneuse) ont été découpés et rincés avec 1 mL de PBS. Les ARN ont été extraits au Trizol. Après dosage (Nanodrop ND1000) et contrôle de la qualité des ARN (Agilent 2100 Bioanalyzer - kit RNA 6000 Nano), deux échantillons de greffons de hauteur de découpe « 90/10 » et quatre échantillons de greffons de hauteur de découpe « 10/90 » ont été éliminés de l'analyse. Un pool de 22µg d'ARN a été réalisé avec 22 échantillons de greffons de hauteur de découpe « 10/90 », et un pool de 20 µg d'ARN a été réalisé avec 20 échantillons de greffons de hauteur de découpe « 90/10 », en utilisant 1 µg d'ARN par échantillon. Deux banques SAGE ont été réalisées à partir d'échantillons de poches perlières de *P. margaritifera* : une

banque SAGE de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 10/90 » et une banque SAGE de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 90/10 ». 23 échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 90/10 » et 36 échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 10/90 » ont été découpés, lacérés au scalpel et rincés avec 1 mL de PBS. Les ARN ont été extraits au Trizol. Après dosage (Nanodrop ND1000) et contrôle de la qualité des ARN (Agilent 2100 Bioanalyzer - kit RNA 6000 Nano), trois échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 90/10 » et sept échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 10/90 » ont été éliminés de l'analyse. Un pool de 10 µg d'ARN a été réalisé avec 20 échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 90/10 », et un pool de 14,5 µg d'ARN a été réalisé avec 29 échantillons de poches perlières issues d'une greffe avec un greffon de hauteur de découpe « 10/90 », en utilisant 0,5 µg d'ARN par échantillon. Ces quatre pools d'ARN de greffons et de poches perlières ont été séquencés par pyroséquençage en utilisant le système Solexa (Illumina) en sous-traitance avec la société Skuldtech.

4.3. Constitution des banques de peptides des structures minéralisées de *P. margaritifera*

Quatre banques de données protéomiques ont été réalisées à partir de structures minéralisées de *P. margaritifera* : une banque de peptides de prismes de coquille, une banque de peptides de nacre de coquille, une banque de peptides de nacre de perles et une banque de peptides des premiers dépôts à la surface du nucléus. L'analyse protéomique a consisté en une digestion par la trypsine des matrices acidosolubles (ASM) et insolubles (AIM) des structures minéralisées étudiées (hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines après les résidus Arginine et Lysine). Les peptides ont ensuite été séparés par nano-HPLC (colonne C18), puis analysés par spectrométrie de masse en mode MS/MS. Les spectres d'ionisation des peptides ainsi obtenus ont été comparés, grâce au logiciel MASCOT, à des « peptides virtuels » issus de la digestion virtuelle des séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* réalisée dans le cadre de cette thèse. Le logiciel d'annotation des peptides attribue automatiquement un score à chaque protéine identifiée à partir des spectres d'ionisations des peptides MS/MS, directement proportionnel au nombre de peptides composant la protéine qui supportent l'identification. Cette comparaison a permis d'aboutir à l'identification et à l'assignation des peptides constitutifs des matrices organiques de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* par les séquences de la banque EST de manteau.

5. Outils de bioinformatique

5.1. Assemblage et annotation de la banque EST de manteau

Les ESTs de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ont été assemblées grâce au logiciel TGICL (TIGR Gene Indices Clustering tools) (Pertea *et al.,* 2003) en accès libre sur le site de TGI Clustering Tool (http://sourceforge.net/projects/tgicl/). Les séquences consensus ont été assemblées avec un pourcentage de recouvrement de 60 paires de base entre deux EST et un pourcentage d'homologie de séquence de 90%, 95% ou 98%. Les données ont été archivées sur le Sequence Read Archive (SRA) du NCBI sous l'accession n° SRP002635. Les ESTs assemblées (contigs) et non assemblées (singletons) ont été référencées comme séquences uniques. Ces séquences uniques ont été traduites en six cadres de lecture et annotées par BlastX avec la base de données de séquences non redondante du NCBI (nr database version # 2.2.15, GenBank release number #166 ; E-value ≤ 10^{-3}) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les séquences uniques annotées par BlastX ont fait l'objet d'une annotation fonctionnelle par le logiciel Blast2GO (http://www.blast2go.org/) (Conesa *et al.,* 2005) par comparaison avec la base de données gene ontology (GO).

5.2. Identification de protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*

Les gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation ont été identifiés localement par BlastX (E-value ≤ 10^{-3}) (Wootton and Federhen, 1993). Des séquences nucléotidiques et protéiques déduites des gènes ainsi identifiés ont fait l'objet d'une analyse. Les alignements de séquences ont été réalisés par le logiciel ClustalW en utilisant les paramètres par défaut, suivi d'une correction manuelle grâce au logiciel BioEdit (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) (Hall, 1999). La présence de peptides signaux a été recherchée avec le logiciel SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Bendtsen *et al.,* 2004). Les domaines et les motifs conservés ont été recherchés avec le logiciel Prosite (http://www.expasy.ch/prosite/) (De Castro *et al.,* 2006). Les pourcentages d'identité et les caractéristiques biochimiques des protéines ont été calculés à l'aide du logiciel ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html) (Gasteiger *et al.,* 2003). Les motifs répétés au sein des séquences protéiques ont été recherchés à l'aide du logiciel RADAR (http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/index.html) (Heger and Holm, 2000).

6. Evaluation de la qualité et de l'épaisseur de nacre des perles récoltées dans le cadre de la greffe ADEQUA#2 et mise en évidence de l'effet donneuse

Préalablement à leur évaluation, les perles récoltées dans le cadre de la greffe ADEQUA#2 ont été lavées au gros sel (la perle est mise dans un bocal rempli de sel et secouée vigoureusement), puis rincées dans de l'eau douce et essuyées avec un chiffon propre. Les perles ont ensuite été lustrées avec une « poupée», un outil composé de fibres de laine, installé sur un rotor.

Afin de procéder à l'évaluation globale de la qualité des perles, les paramètres de qualité et de croissance des perles ont été décomposés en différentes variables de la manière suivante : une variable « Epaisseur de nacre à la surface de la perle », une variable « Nombre de défauts à la surface des perles » et une variable « Qualité commerciale ». La variable « Epaisseur de nacre à la surface de la perle » correspond à la mesure en millimètre de l'épaisseur minimale de nacre présente à la surface du nucléus. Celle-ci a été obtenue par soustraction du diamètre du nucléus au plus petit diamètre de la perle. Les diamètres des perles et des nuclei ont été mesurés à partir d'images de perles et de nuclei scannées (300 pixels/cm, scanner EPSON perfection 4990 photo) et traitées avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ (version 1.44). La variable « Nombre de défauts à la surface des perles » correspond à la classification de chaque perle en 4 classes de qualité en fonction du nombre de défauts observés à leur surface (perles sans défaut, perles avec 1 à 5 défauts, perles avec plus que 5 défauts et perles complètement recouvertes de défauts). Les défauts pris en considération sont les piqûres, les boursouflures et les comètes. Dans un second temps une note allant de 0 à 3 a été attribuée à chaque perle en fonction de la classe de défaut à laquelle elle appartient (de 0 pour les perles recouvertes de défaut à 3 pour les perles sans défaut). La variable « Qualité commerciale » correspond à la classification des perles en 5 catégories de qualité (A, B, C, D et Rebut). Cette classification a été réalisée à deux reprises, par le Service de la Perliculture à Papeete et par la société Manapearl, conformément aux critères définis par la Délibération n°2005-42 du 4 février 2005 (Journal Officiel de la Polynésie). Dans un second temps une note allant de 0 à 4 a été attribuée à chaque perle en fonction de la catégorie à laquelle elle appartient (de 0 pour les perles de catégorie « rebut » à 3 pour les perles de catégorie « A »).

Afin de mettre en évidence l'effet donneuse, le classement des huîtres perlières donneuses de greffons par ordre croissant de qualité en fonction de chaque variable a été réalisé. Ce classement a été réalisé par l'attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse sur la base de l'évaluation de la qualité des perles récoltées à 18 mois dans le cadre de la greffe ADEQUA#2. Pour la variable « Epaisseur de nacre à la surface de la perle », cette note correspond à la moyenne des épaisseurs des perles récoltées par donneuse. Pour les variables « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale », la note de chaque huître perlière donneuse correspond à la moyenne des notes des perles récoltées par donneuse.

7. Constitution des plans d'échantillonnages de greffons et de poches perlières pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle

Afin de constituer des groupes d'échantillons de greffons et de poches perlières issus d'huîtres perlières donneuses à l'origine de la production de perles de qualité contrastées, deux groupes d'huîtres perlières donneuses de greffons ont été créés pour chacune des variables « Epaisseur », « Qualité » et « Défaut », sur la base de l'effet donneuse et de la qualité des perles de 18 mois récoltées dans le cadre de la greffe ADEQUA#2. Le « Groupe A », correspondant aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité supérieure (épaisseur de nacre importante, peu de défauts de surface ou meilleure classification de qualité). Le « Groupe B » correspondant aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité inférieure (épaisseur de nacre faible, beaucoup de défauts de surface ou classification de qualité médiocre). La constitution des groupes a été réalisée en procédant à une analyse des données brutes de la qualité des perles et du classement des huîtres perlières donneuses de greffons, une procédure de comparaison multiple par paire de Dunn, et une classification ascendante hiérarchique. La constitution de ces groupes d'huîtres perlières donneuses a ensuite permis de définir pour chaque variable deux plans d'échantillonnages de greffons et de poches perlières à l'origine de la production de perles contrastées : un plan d'échantillonnage de greffons issus des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A et B, et un plan d'échantillonnage de poches perlières issues de la greffe des greffons des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A et B.

8. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques réalisées dans le cadre de la validation des biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle ont été réalisées à l'aide du logiciel Xlstat (version 2009.4.02) pour les tests de Shapiro-Wilk, Kruskall-Wallis, la procédure de comparaison multiple de Dunn et la classification ascendante hiérarchique, et du logiciel R (version 2.10.0) pour le test de Wilcoxon. Le test de normalité de Shapiro-Wilk a été utilisé avec un seuil α de 5%. Le test de Kruskall-Wallis a été réalisé avec un seuil α de 5%. La procédure de comparaison multiple de Dunn a été réalisée en appliquant au niveau de signification une correction de Bonferroni (seuil corrigé α = 0.01%). La classification ascendante hiérarchique a été réalisée en utilisant la distance du χ^2 comme indice de dissimilarités et la méthode de Ward comme méthode d'agrégation. Aucun nombre de classe n'a été imposé et le niveau de troncature à été défini de manière automatique. Le test de Wilcoxon à été utilisé avec un seuil α de 5% et de manière unilatérale.

Chapitre IV: Résultats et discussion

Identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* pour la sélection de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle

Identification de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* pour la sélection de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle

Dans un premier temps, le travail de thèse a consisté à développer une approche globale d'analyse du transcriptome des tissus biominéralisateurs de la coquille et de la perle (manteau et sac perlier) chez *P. margaritifera*. L'objectif de cette approche était d'identifier des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation, afin de développer des biomarqueurs de qualité et de croissance de la perle chez *P. margaritifera*. En parallèle, une approche protéomique globale des constituants de la coquille et des perles a également été menée dans le cadre d'une collaboration avec Benjamin Marie (contrat post-doctoral – Ifremer LBQP/UMR 5561 Biogéosciences de l'Université de Bourgogne, Dijon). Cette approche avait pour objectif d'identifier les protéines qui composent les différentes structures minéralisées de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera*.

Le chapitre III décrit les objectifs et la démarche adoptée dans le cadre de la mise en place des approches transcriptomiques globales SAGE et EST sur les tissus biominéralisateurs de l'huître perlière *P. margaritifera*, ainsi que dans la mise en place de l'approche protéomique globale sur les structures minéralisées de *P. margaritifera*, le traitement et l'analyse de l'ensemble des données de transcriptomique et de protéomique générées par ces approches conjointes, et la sélection de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle.

1. Démarche et objectifs

La coquille des mollusques est une structure composite dite biominéralisée constituée d'une fraction minérale et d'une fraction organique. La fraction organique correspond aux constituants de la matrice organique calcifiante synthétisée par le manteau. Cette matrice organique interagit avec les cristaux minéraux pour orienter la nature et la structure de la fraction minérale en différents polymorphes de carbonate de calcium, la calcite ou l'aragonite, au sein de la coquille. La matrice organique joue donc un rôle clé au sein des processus physico-chimiques qui contrôlent la biominéralisation et une attention toute particulière a été portée au cours de ces quinze dernières années sur l'identification et la caractérisation des structures primaires des protéines qui constituent cette matrice. Cependant, les bases moléculaires de la formation des perles restent encore largement méconnues. En effet, lors du commencement de cette thèse (début 2008), seule une trentaine de protéines impliquées dans les processus de biominéralisation avaient été identifiées chez différents mollusques (gastéropodes et bivalves), dont six chez *P.margaritifera*, à savoir la Calconectin (Duplat *et al.,* 2006), la *Pmarg*-Pearlin (Montagnani *et al.,* 2011), ainsi que les KRMP 7 à 11, disponibles en ligne sur GenBank entre 2006 et 2007. De plus, au laboratoire, les approches gène-candidats qui ont été menées jusqu'à aujourd'hui ont permis d'aboutir à la découverte et au séquençage de gènes spécifiquement impliqués dans la synthèse de biominéraux (*pmarg*-nacrein), en particulier de l'aragonite (*pmarg*-pearlin) (Montagnani *et al.,* 2011) et de la calcite (et *pmarg*-aspein) (Joubert *et al.,* 2010).

Ainsi, pour répondre à la question biologique « Existe-t-il des biomarqueurs de la croissance et de la qualité des perles ? », l'originalité de ce travail de thèse a été d'adopter, en parallèle, deux approches transcriptomiques globales complémentaires sur les tissus minéralisateurs afin d'identifier simultanément un grand nombre de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation, et susceptibles d'intervenir de façon plus ou moins directe sur la qualité de la perle (figure 23). Des banques de données SAGE ont ainsi été réalisées par pyroséquençage sur les tissus minéralisateurs de la perle, greffons et poches perlières, dans l'objectif d'identifier des gènes différentiellement exprimés en fonction de zones fonctionnelles associées à des types de dépôts nacrés ou calcitiques, et à des qualités de perles contrastées. La technologie SAGE, approche quantitative et *a priori*, a été choisie car elle permet l'accès à des données transcriptomiques encore inexplorées sur les gènes à caractériser. Cette caractéristique est en effet essentielle puisque que *P. margaritifera*, n'étant pas une espèce modèle et son étude étant restreinte à un petit nombre d'équipes dans le monde, est un organisme pour lequel on ne dispose que de très peu d'information de séquence (d'ordre génomique, transcriptomique ou protéomique), ce qui constitue un frein majeur à son étude. Afin de combler ces lacunes et ainsi faciliter l'annotation des données issues

des banques SAGE, une banque EST de manteau (approche qualitative) a également été développée en parallèle par pyroséquençage sur du manteau, le tissu biominéralisateur de la coquille. L'exploitation de la banque EST par approche gène-candidat a ainsi permis d'identifier, pour la première fois chez cet organisme, un important catalogue de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*.

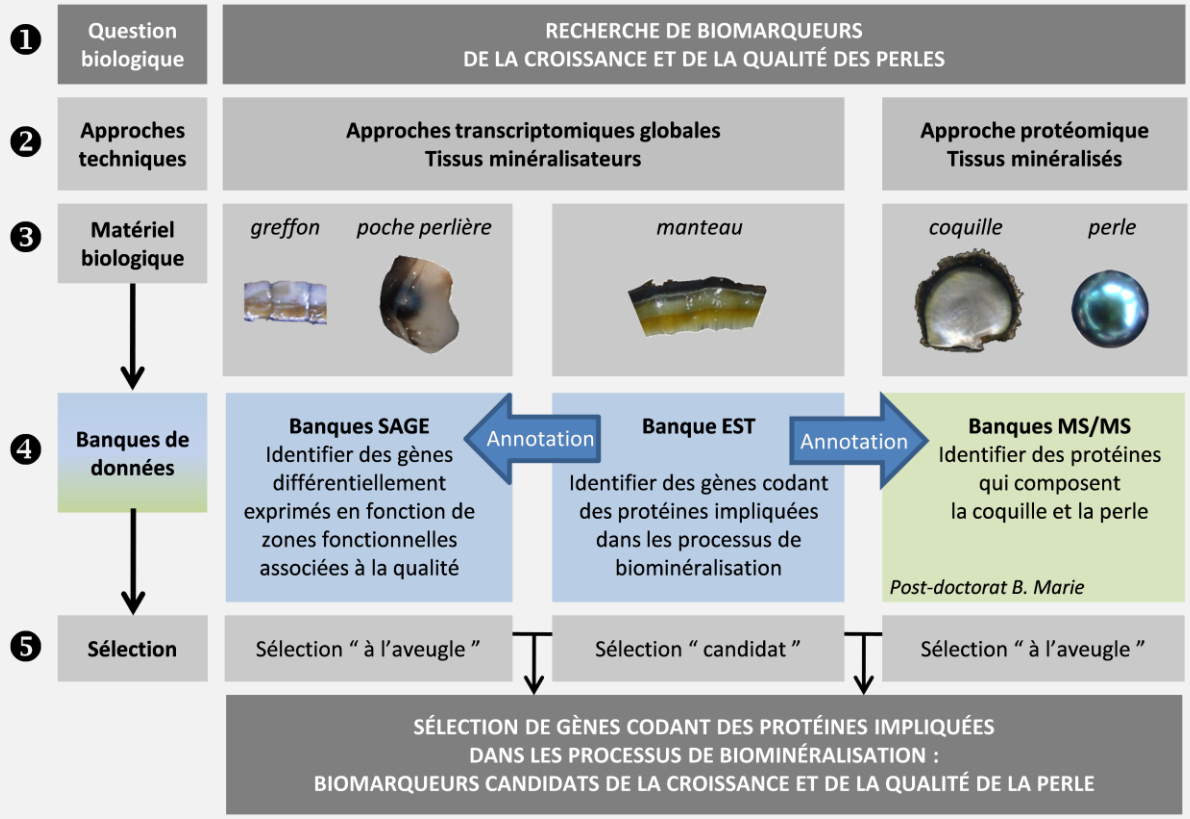

Figure 23. Objectifs et démarche mise en place pour la sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. ❶ : l'objectif de la thèse est d'identifier des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. ❷ : la démarche a consisté à développer deux approches transcriptomiques complémentaires sur les tissus minéralisateurs et une approche protéomique globale en parallèle sur les tissus minéralisés de *P. margaritifera*. ❸ et ❹ : des banques de données SAGE ont été mise en place sur des tissus minéralisateurs de la perle, greffons et poches perlières, dans l'objectif d'identifier des gènes différentiellement exprimés en fonction de zones fonctionnelles potentiellement associées à des qualités de perles contrastées. Afin de combler ces lacunes et ainsi faciliter l'annotation des données issues des banques SAGE, une banque EST de manteau a également été développée en parallèle par pyroséquençage sur du manteau, le tissu biominéralisateur de la coquille. Enfin, l'approche protéomique globale a été développée en parallèle sur les tissus minéralisés *P. margaritifera* afin d'identifier les protéines qui composent la coquille et la perle. ❺ : La mise en place des approches transcriptomiques et protéomique globales ont permis d'aboutir à la sélection par « approche candidat » ou « en aveugle » de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*.

Les différents résultats obtenus sont mis en relation directe avec ceux des autres équipes prenant part au GDR ADEQUA, et en particulier celles impliquées dans l'action 3 (Analyse du processus complet de la greffe, du choix du greffon à la minéralisation de la perle). Dans ce contexte, les travaux de Benjamin Marie (contrat post-doctoral – Ifremer LBQP/ UMR 5561 Biogéosciences de l'Université de Bourgogne, Dijon), ont notamment consisté à développer une approche protéomique globale sur les tissus minéralisés dans l'objectif d'identifier les protéines qui composent la coquille et la perle de *P. margaritifera*. Les résultats obtenus par cette approche protéomique ont été exploités dans le cadre de cette thèse afin d'identifier des gènes codant des protéines qui composent la nacre des perles et les premiers dépôts à la surface du nucléus, ainsi que la nacre et les prismes de coquille chez *P. margaritifera*.

L'analyse des données générées par ces approches transcriptomiques et protéomique globales a abouti à l'identification d'un ensemble de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera*.

2. Constitution d'une banque EST de manteau par pyroséquençage chez *P. margaritifera*

L'analyse globale du transcriptome des tissus biominéralisateurs chez *P. margaritifera* a consisté dans un premier temps en la constitution d'une banque EST de manteau par pyroséquençage. Cette approche a permis d'explorer le transcriptome du manteau afin d'identifier par approche candidat des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation.

2.1. Construction de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* et statistiques de description des données

La banque EST a été réalisée à partir d'ARN extrait de 14 échantillons de manteaux d'huîtres perlières *P. margaritifera* par pyroséquençage, aboutissant à l'identification de 276 738 séquences d'ADN complémentaires (cDNA), ou étiquettes de séquences transcrites (ESTs) (table 3). Les séquences de la banque ont une longueur comprise entre 33 et 406 paires de bases (pb), et une longueur moyenne de 234 pb. 70% des séquences ont une longueur comprise entre 225 et 290 pb, et seulement 3% des séquences font plus de 300 pb (figure 24). Les 276 738 séquences ESTs (ou singletons) de la banque ont été assemblées grâce au logiciel TGICL selon différents pourcentages d'homologies de séquences, 90%, 95% ou 98%. Ces assemblages (ou contigage) ont permis de constituer 20 371 contigs (séquences assemblées) et 50 380 singletons (séquences non assemblées) pour la banque à 90% d'homologie, 20 243 contigs et 51 482 singletons pour la banque à 95% d'homologie, et enfin 19 257 contigs et 57 533 singletons pour la banque à 98% d'homologie. Si l'on considère un assemblage à 98% d'homologie, la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ainsi constituée contient 76 790 séquences uniques, soit la somme de 19 257 contigs et de 57 533 singletons ; une large part des séquences uniques (74,9%) étant constituée de singletons (table 3). Ainsi, sur les 276 738 séquences ESTs de la banque, 219 205 (79.2%) ont été assemblées avec succès en 19 257 contigs, et les 57 533 singletons qui n'ont pu être assemblés ne constituent que 20,8% des séquences ESTs. Enfin, sur les 19 257 contigs issus de l'assemblage à 98% d'homologie, 8717 (45.3%) sont issus de l'assemblage de 2 ESTs, 3419 (17.8%) de 3 ESTs, 1779 (9.2%) de 4 ESTs, 1119 (5.8%) de 5 ESTs, et 4223 (21.9%) sont issus de l'assemblage de 6 ESTs ou plus (table 3).

Table 3. Statistiques de description des données de pyroséquençage et d'annotation de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* assemblée à 98% d'homologie

Paramètres de la banque EST contiguée à 98% d'homologie	Nombre d'EST	Pourcentage
Nombre total d'EST séquencées	**276.738**	100 %
Longueur moyenne des EST (pb)	234	-
Nombre d'EST assemblées	219.205	79.2 %
Nombre de contigs	19.257	-
Nombre de singletons	57.533	20.8 %
Nombre de sequences uniques	**76.790**	-
Nombre de contigs contenant 2 ESTs	8.717	45.3 %
Nombre de contigs contenant 3 ESTs	3.419	17.8 %
Nombre de contigs contenant 4 ESTs	1.779	9.2 %
Nombre de contigs contenant 5 ESTs	1.119	5.8 %
Nombre de contigs contenant plus de 6 ESTs	4.223	21.9 %
Nombre de séquences uniques annotées	**29.479**	**38.4 %**
Protéines connues	13.064	44,3 %
Protéines « non caractérisées »	6.010	20,4 %
Protéines « prédites »	4.795	16,3 %
Protéines « inconnues »	2.880	9,8 %
Protéines « hypothétiques »	2.730	9,3 %
Nombre de contigs annotés	10.007	52.2 %
Nombre de singletons annotés	19.472	33.8 %
Nombre de séquences uniques non annotées	47.311	61.6 %
Nombre de contigs non annotés	9.250	48.0 %
Nombre de singletons non annotés	38.061	66.2%

Le nombre d'ESTs de la banque de manteau générées par pyroséquençage est similaire à celui obtenu lors de la constitution d'autres banques EST par cette même méthode chez une autre espèce de bivalve, *Laternula elliptica* (Clark *et al.,* 2010), ou même chez les plantes (*Medicago truncatula*) (Cheung *et al.,* 2006), ou encore les insectes (*Zygaena filipendulae*) (Zagrobelny *et al.,* 2009). Les séquences de la banque EST ont été déposées sur GenBank en Mai 2010. A cette date, les sections « nucléotide » et « EST » ne contenaient que 116 séquences pour l'espèce *P. margaritifera*, ce chiffre s'étendant à 15 742 si l'on considérait l'ensemble des séquences du genre *Pinctada*. L'apport des 76 790 séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* représente alors 99,8% des séquences disponibles pour cette espèce, et 83% des séquences disponibles pour l'ensemble des séquences du genre *Pinctada.* Les résultats obtenus grâce à la mise en place de cette approche démontrent que le pyroséquençage est une méthode à la fois rapide et efficace, permettant de produire une quantité considérable de données génomiques exploitables, et constitue de fait une méthode de choix pour l'exploration des transcriptomes des espèces non modèles, telles que *P. margaritifera*.

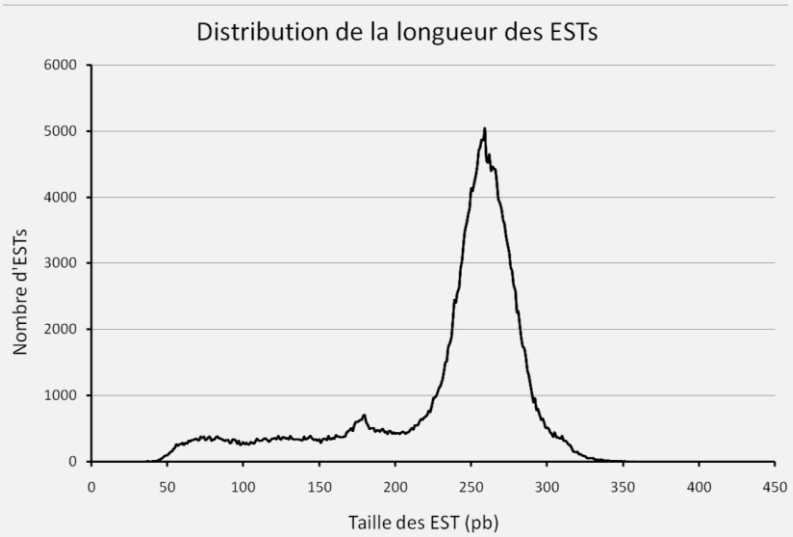

Figure 24. Distribution des longueurs des ESTs de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*. Les 276 738 séquences ESTs de la banque ont une longueur comprise entre 33 et 406 paires de bases (pb), et une longueur moyenne de 234 pb. 70% des séquences ESTs ont une longueur comprise entre 225 et 290 pb, et seulement 3% des séquences ESTs font plus de 300 pb.

Il est également intéressant de noter que pour les données générées par un assemblage à 98% d'homologie, 20,8% des 276 738 ESTs séquencées (soit 57 533 singletons) n'ont pu être assemblées. Chez d'autres espèces, comme la plante *M. truncatula* (Cheung *et al.,* 2006) ou le corail *Acropora millepora* (Meyer *et al.,* 2009), ce pourcentage de singletons s'échelonne entre 10% et 40% des séquences ESTs des banques constituées. Il a en effet été montré qu'un certain nombre des ESTs séquencées par pyroséquençage « échappaient » à l'assemblage (Trombetti *et al.,* 2007). Ces singletons peuvent résulter d'erreurs de séquençage ou de contaminations. Ils peuvent également résulter de la difficulté technique à assembler des séquences trop courtes, ou contenant une forte proportion de séquences ou de motifs répétés, ou encore résultant de processus d'épissages importants. Néanmoins, ces singletons ne sont pas sans intérêt, puisque qu'ils peuvent tout aussi bien être les représentants de transcrits dits « rares » issus de gènes très faiblement exprimés dans les cellules. Ils constituent ainsi une source particulièrement intéressante de données génomiques, à laquelle il n'est possible d'avoir accès que depuis la découverte et l'utilisation des techniques de séquençage haut-débit telles que le pyroséquençage (Vera *et al.,* 2008).

2.2. Annotation de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*

Les 76 790 séquences uniques de la banque EST ont été annotées par BlastX par homologie avec les séquences des bases de donnée protéiques en ligne non redondantes (nrdb) du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cette recherche a permis l'annotation de 29 479 séquences, soit 38.4% des séquences uniques (BlastX E-value ≤10-3). Parmi ces 29 479 séquences annotées, 13 064 (44.3%) correspondent à des protéines connues, mais 6 010 (20,4%) correspondent à des protéines non caractérisées (« uncharacterized protein »), 4 795 (16.3%) à des protéines dont la séquence a été prédite (« predicted protein »), 2 880 (9.8%) à des protéines inconnues (« unknown » or « unnamed proteins »), and 2 730 (9.3%) correspondent à des protéines hypothétiques (« hypothetical proteins ») (Table 3). Ce taux apparemment faible d'annotation des séquences uniques de la banque EST de manteau est en réalité commun a l'ensemble des banques EST constituées chez les mollusques, où il s'échelonne de 15% à 40% (Tanguy *et al.,* 2008; Venier *et al.,* 2009; Clark *et al.,* 2010; Craft *et al.,* 2010). Il est néanmoins plus faible que ceux obtenus lors de l'annotation de banques de données chez les vertébrés (Patil *et al.,* 2009), ou encore chez les plantes modèles (Weber *et al.,* 2007). En effet, bien que cette

difficulté d'annotation puisse résulter de la présence de séquences de longueur trop courtes pour être convenablement annotées, elle est majoritairement due à la faible quantité de séquences de mollusques disponibles sur les bases de données en ligne, et à l'abondance de séquences issues d'espèces, majoritairement des vertébrés, qui présentent de grandes divergences (en terme d'identité en acides aminés) avec celles des protostomiens.

Les 76 790 séquences uniques de la banque EST ont fait l'objet d'une annotation fonctionnelle par Gene Ontology (GO). Gene Ontology est un projet bio-informatique destiné à structurer la description des gènes et des produits géniques dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces (Ashburner *et al.,* 2000; The Gene Ontology Consortium 2007). Ce projet permet notamment de gérer un vocabulaire contrôlé (ou termes GO) décrivant les gènes et leurs produits, et de gérer les annotations, c'est-à-dire les informations rattachées aux gènes et à leurs produits. Les propriétés des produits géniques sont décrites selon trois axes (ou ontologies) :

- les composants cellulaires auxquels ils s'appliquent, qu'il s'agisse du milieu intracellulaire ou de l'environnement extracellulaire
- les fonctions moléculaires mises en jeu, par exemple structurelles ou catalytiques pour une protéine
- les processus biologiques, c'est-à-dire les transformations moléculaires nécessaires au fonctionnement d'entités biologiques intégrées.

Dans notre étude, 10 004 (13,0%) des 76 790 séquences uniques de la banque EST ont pu être assignées à au moins un terme GO dans chacune des trois ontologies, selon la répartition suivante : 5 976 séquences uniques (59.7%) sont impliquées dans des processus biologiques, 6 855 (68.5%) assurent des fonctions moléculaires et 5 737 (57.3%) constituent des composants cellulaires (figure 25). Que la somme des trois pourcentages de répartition des séquences uniques dépasse 100% signifie simplement qu'une même séquence unique peut faire l'objet d'une annotation dans différentes ontologies. Pour chacune de ces trois ontologies, les séquences uniques annotées se répartissent en termes GO essentiellement au sein de deux ou trois catégories générales de termes. Ainsi, pour les 5 976 séquences uniques impliquées dans des processus biologiques, 5 006 (83.8%) et 4 191 (70.1%) sont respectivement impliquées dans les processus cellulaires et les processus métaboliques (figure 25-A). Pour les 6 855 séquences uniques annotées assurant des fonctions moléculaires, 5 208 (76.0%) et 3 704 (54.0%) assurent respectivement des fonctions de liaison et d'activité catalytique (figure 25-B). Enfin, pour les 5 737 séquences uniques annotées constituant des composants cellulaires, 5 656 (98.6%) et 3 868 (67.4%) sont respectivement des constituants cellulaires ou des organites (figure 25-C). Les résultats obtenus grâce à cette annotation Gene Ontology sont comparables à ceux obtenus lors de l'annotation fonctionnelle d'autres banque EST d'organismes marins, et en particulier de mollusques (Quilang *et al.,* 2007; Venier *et al.,* 2009).

De façon remarquable, si l'on s'intéresse plus précisément aux 5 208 séquences uniques annotées au sein de la catégorie générale « fonction de liaison » de l'ontologie de fonction moléculaire, on constate que les termes GO se répartissent essentiellement au sein des trois sous-catégories suivantes : liaison aux protéines (35%), liaison aux nucléotides (19%) et liaisons aux ions (17%) (figure 25-D). Les constituants de la matrice organique sécrétés par l'épithélium minéralisateur du manteau jouent un rôle clef dans les processus de biominéralisation contrôlée. Des analyses de cristallisation *in vitro* ainsi que des méthodes microscopiques ont en effet révélé les propriétés stéréochimiques de ces protéines qui leur permettraient de lier les ions calciums et carbonate, et ainsi construire le squelette organique permettant la croissance des cristaux lors de la construction des coquille des mollusques (Addadi *et al.,* 2006; Yan *et al.,* 2007; De Paula *et al.,* 2009). Le fait qu'une part importante des séquences uniques annotées de la banque EST de manteau soit impliquée dans des processus de liaisons aux ions semble révélateur de la fonction biologique et de la nature sécrétoire du manteau, le tissus biominéralisateur de la coquille. Ce résultat est en accord avec les observations réalisées récemment sur la banque EST du manteau d'un autre bivalve *L. elliptica* (Clark *et al.,* 2010).

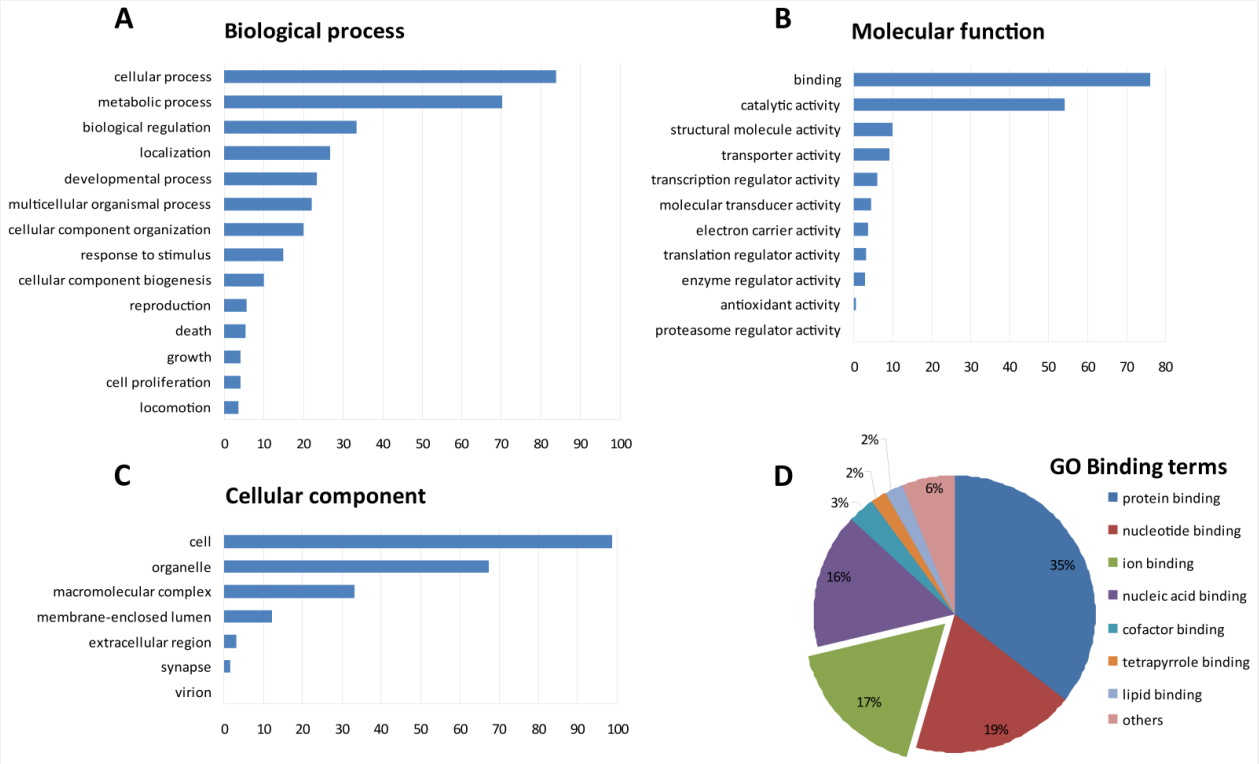

Figure 25. Annotation fonctionnelle Gene Ontology de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*. 10 004 séquences uniques de la banque EST ont pu être assignées à au moins un terme GO dans chacune des trois ontologies. 5976 séquences uniques (59.7%) sont impliquées dans des processus biologiques, 6855 (68.5%) assurent des fonctions moléculaires et 5737 (57.3%) constituent des composants cellulaires. Pour les 5976 séquences uniques impliquées dans des processus biologiques, 5006 (83.8%) and 4191 (70.1%) sont respectivement impliquées dans les processus cellulaires et les processus métaboliques (**A**). Pour les 6855 séquences uniques annotées assurant des fonctions moléculaires, 5208 (76.0%) et 3704 (54.0%) assurent respectivement des fonctions de liaison et d'activité catalytique (**B**). Enfin, pour les 5737 séquences uniques annotées constituant des composants cellulaires, 5656 (98.6%) et 3868 (67.4%) sont respectivement des constituants cellulaires ou des organites (**C**). Les 5208 séquences uniques de la catégorie générale « fonction de liaison » de l'ontologie de fonction moléculaire sont annotées par des termes GO qui se répartissent essentiellement au sein des trois sous-catégories suivantes : liaison aux protéines (35%), liaison aux nucléotides (19%) et liaisons aux ions (17%) (**D**).

2.3. Mise et en place de la base de données en ligne « Oyster »

2.3.1. Contexte et objectifs

Depuis l'invention du séquençage de l'ADN par Frederick Sanger dans les années 70, les progrès technologiques dans ce domaine sont tels que les quantités de données de séquences qui en résultent ne peuvent être rendues intelligibles que grâce à la création de bases (ou banques) de données biologiques. Ces bases de données biologiques ont pour objectif l'archivage, le stockage, la diffusion et l'exploitation des données biologiques. Il existe ainsi, à l'échelon mondial, un grand nombre de bases de données d'intérêt biologique qui organisent et centralisent ces ressources afin de les rendre disponibles à l'ensemble de la communauté des chercheurs. L'archivage des données est pris en charge par des institutions (le NCBI aux USA, l'EBI en Europe et le DDBJ au Japon), qui se coordonnent pour gérer les grandes bases de données généralistes mondiales de séquences nucléotidiques comme GenBank ou l'EMBL database, ainsi que les bases de données de séquences protéiques comme UniProt ou TrEMBL. Le second objectif des bases de données consiste ensuite à développer des outils d'analyse de séquence afin de pouvoir

exploiter les ressources qu'elles archivent. Ainsi, parmi les logiciels les plus usités en termes d'analyses de séquences, on peut citer ceux de la famille BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, de type BlastN, BlastP, BlastX et leur dérivés), les logiciels d'alignements de séquences, ou encore les logiciels de recherche de motifs ou séquences consensus.

Pour des besoins spécifiques, et notamment depuis l'avènement des nouvelles méthodes de séquençage haut-débit, de nombreuses bases de données spécialisées ont été créées au sein des laboratoires, qui centralisent des données plus homogènes établies autour d'une thématique ou d'une caractéristique biologique précise. Pour que ces bases de données soient plus facilement exploitables, et que les utilisateurs puissent extraire les sous-ensembles de séquences qui les intéressent, des logiciels sont généralement disponibles localement, offrant des performances d'exploitations similaires à ceux des serveurs publics. Dans le cadre du GDR ADEQUA, et de ce projet de thèse en particulier, la base de données Oyster a été mise en place par la société Skuldtech dans l'objectif de capitaliser et d'exploiter les données issues de l'approche transcriptomique globale EST menée sur le manteau de *P. margaritifera*. La base de donnée en ligne Oyster est accessible (avec code d'accès) via le lien suivant : (http://www.skuldtech.com/perdur/oyster.html).

2.3.2. Fonctionnalités et outils disponibles

Au sein de la base Oyster, la capitalisation des données de séquences est organisée en un répertoire de façon à accéder aux données brutes issues du séquençage de la banque EST de manteau de *P.margaritifera*, mais également d'accéder à ces mêmes données traitées par la plateforme de bioinformatique de la société SkuldTech. L'exploitation de ces données de séquences nucléotidiques et protéiques peut être réalisée grâce à deux types d'outils bioinformatiques conçus spécialement pour leur analyse : le « Blast en ligne » et le « Viewer » (figure 26). L'outil Blast en ligne permet de rechercher une séquence nucléotidique ou protéique au sein de la banque EST par homologie avec une séquence cible (ou candidate). Deux types de Blast sont ainsi disponibles, un BlastN (homologies entre séquences nucléotidiques) ou un BlastX (homologies entre séquences protéiques déduites), réalisés sur les séquences uniques nucléotidiques. Le Viewer est un logiciel qui permet à l'utilisateur d'avoir accès à l'ensemble des séquences ESTs qui composent chaque contig sous forme d'un alignement de séquences nucléotidiques. Les outils Blast et Viewer permettent d'interroger, selon le choix de l'utilisateur, les séquences uniques issues des assemblages réalisés à 90%, 95% et 98% d'homologie.

Les logiciels Blast et Viewer de la base de données en ligne Oyster sont des outils puissants dans le cadre de la recherche de biomarqueurs de qualité de la perle. En effet, l'outil Blast permet de réaliser la recherche de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation par approche gène candidat au sein de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*, et l'outil Viewer permet de s'assurer que l'alignement des ESTs qui constituent un contig est satisfaisant. S'il persiste de légères variations entre les séquences primaires de plusieurs EST, une étude approfondie de leur alignement permettra éventuellement de faire la distinction entre une simple « erreur » de séquençage, ou l'existence d'un réel polymorphisme de séquence au sein de la population pour le transcrit étudié. Néanmoins, il existe quelques limitations à l'usage de ces outils bio-informatiques d'exploitation. En effet, l'outil Blast perd de sa performance si les séquences protéiques candidates recherchées au sein de la banque présentent une séquence primaire riche en un ou quelques résidus particuliers, ou contenant des motifs répétés. Dans ces différents cas, le logiciel peut échouer à aligner la séquence candidate et la séquence à identifier dans la banque. Ces mêmes particularités de séquences pouvent également conduire à un assemblage erroné ou à l'échec de l'assemblage. Certaines protéines, telles que les « silk-protein » qui présentent des motifs répétés GN comme ceux observés aux seins de la protéine N66 (Smith-Keune and Jerry 2009), ou les protéines très acides telles que l'Aspein (Tsukamoto *et al.,* 2004) ou les Asprich protein (Gotliv *et al.,* 2005) très riches en acide aspartique, sont ainsi des candidats difficiles à étudier avec ce types d'outils bioinformatiques.

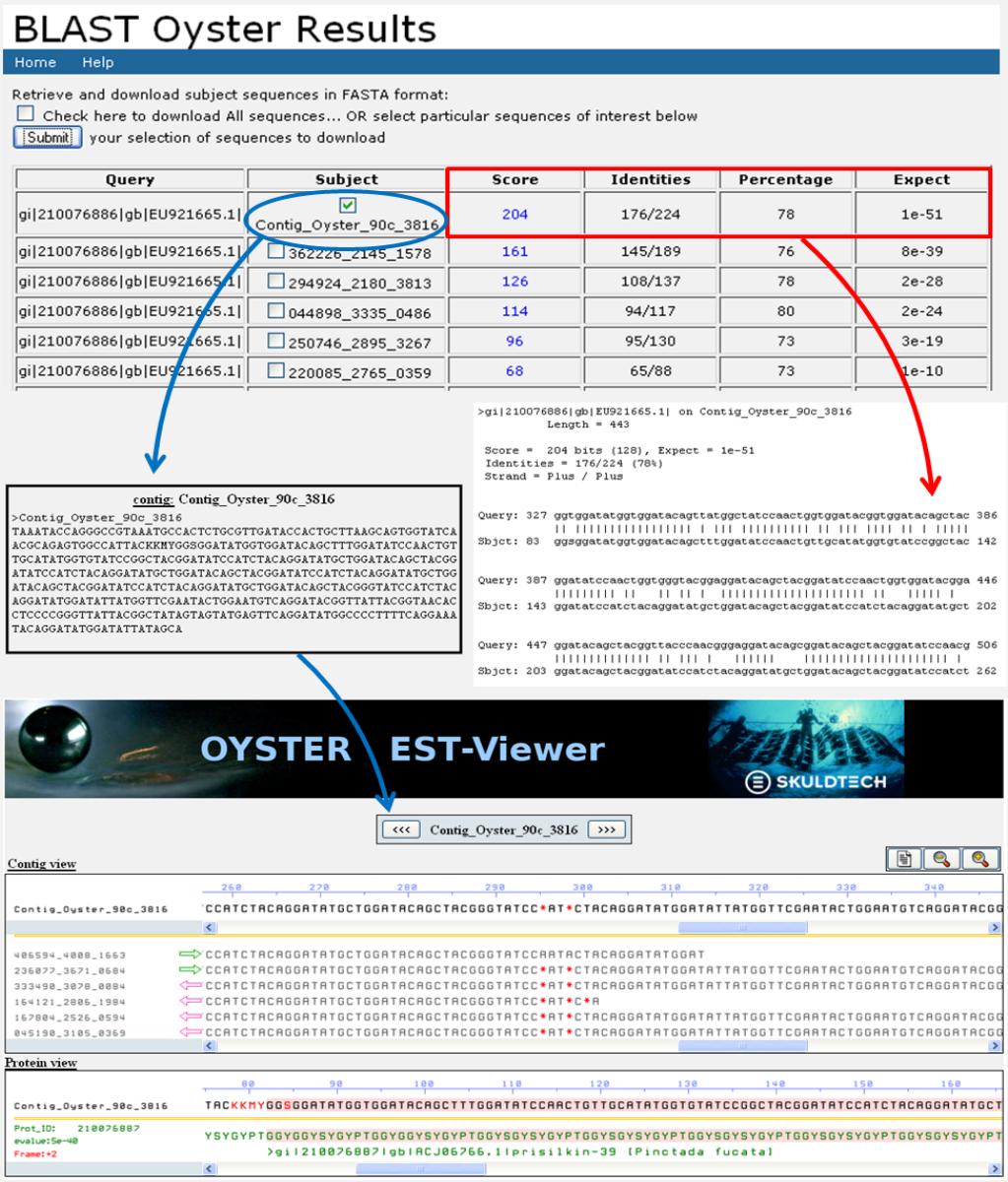

Figure 26. Base de données « Oyster ». La base de données « Oyster » a été mise en place par la société Skuldtech dans l'objectif de capitaliser et d'exploiter les données issues de l'approche transcriptomique globale EST menée sur le manteau de *P. margaritifera*. La capitalisation des données est organisée en un répertoire contenant les fichiers au format fasta des séquences uniques (singletons et contigs) issues des assemblages nucléotidiques réalisés à 90%, 95% et 98% d'homologie, ainsi que des séquences uniques protéiques issues de la traduction des séquences uniques nucléotidiques. L'exploitation de ces données de séquences nucléotidiques et protéiques peut être réalisée grâce à deux types d'outils bioinformatiques, le « Blast en ligne » et le « Viewer ». L'outil Blast permet de rechercher une séquence nucléotidique ou protéique au sein de la banque EST par homologie avec une séquence cible (ou candidate). Deux types de Blast sont disponibles, un BlastN ou un BlastX, réalisés sur les séquences uniques nucléotidiques, et le logiciel permet de visualiser les alignements. Le Viewer est un logiciel qui permet à l'utilisateur d'avoir accès à l'ensemble des séquences ESTs qui composent chaque contig sous forme d'un alignement de séquences nucléotidiques. Si le contig étudié a fait l'objet d'une annotation par BlastX avec les séquences des bases de données du NCBI, le logiciel Viewer permet de visualiser la séquence protéique, et renseigne son accession GenBank. Les outils Blast et Viewer de la base de données en ligne Oyster permettent d'interroger, selon le choix de l'utilisateur, les séquences uniques ou contigs issus des assemblages réalisés à 90%, 95% et 98% d'homologie. Les séquences uniques de la banque EST de *P. margaritifera* identifiées par les outils Blast ou Viewer sont téléchargeables en format fasta.

3. Identification de gènes et de protéines potentiellement impliqués dans la biominéralisation chez *P. margaritifera* par des approches transcriptomiques et protéomique globales

3.1. Exploitation de la banque EST et identification d'un catalogue de gènes exprimés dans le manteau codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*

Afin d'obtenir une vision des événements de transcriptomiques mis en place dans le manteau lors des processus de biominéralisation de la coquille chez *P.margaritifera*, une recherche de gènes par approche gène candidat a été menée *in silico* sur les séquences de la banque EST en utilisant l'outil BlastX en ligne de la base de données Oyster. Pour cela, une recherche la plus exhaustive possible a été réalisée sur les bases de données publiques afin de collecter un ensemble complet de séquences de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation, notamment chez les invertébrés. Cette recherche s'est restreinte aux séquences identifiées chez les mollusques du fait de la faible conservation des séquences des gènes et des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation avec les protostomiens.

Chez les mollusques, 140 séquences de bivalves et 103 séquences de gastéropodes ont pu ainsi être répertoriées. Ces 243 séquences correspondent à des gènes dont les transcrits ont préalablement été identifiés comme étant exprimés au sein du manteau minéralisateur, ou dont les protéines ont directement été purifiées à partir de la coquille. Cette approche a abouti à l'identification de 121 et 56 séquences présentant des taux d'identités significatifs (BlastX Evalue≤10-3) pour les séquences de bivalves et de gastéropodes respectivement. Sur ces 177 séquences, un catalogue de 82 séquences non redondantes de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* a ainsi pu être constitué, dont 69 ont été obtenues par homologie avec des séquences de bivalves, et 13 par homologie avec des séquences de gastéropodes.

Parmi les 69 séquences identifiées chez *P. margaritifera* par homologie avec des séquences de bivalves, 55 ont été obtenues par homologie avec des séquences du genre *Pinctada*, avec des pourcentages d'homologie variant de 24% (C-type lectin 2 chez *P. fucata*) à 95% (Ferritin-like protein chez *P. fucata*). Ces valeurs sont similaires à celles observées auparavant entre les protéines homologues connues au sein des familles N66/Nacrein ou de la famille N16/N14 (Kono *et al.,* 2000; Miyashita *et al.,* 2002; Miyamoto *et al.,* 2003). En effet, les séquences N66 chez *P. maxima* et Nacrein chez *P. fucata* présentent respectivement 82% et 69% d'homologie avec la séquence homologue identifiée chez *P. margaritifera*. De même, les séquences N14 chez *P. maxima* et N16 chez *P. fucata* présentent respectivement 93% et 71% d'homologie avec la séquence homologue identifiée chez *P. margaritifera* (*Pmarg*-pearlin) (Montagnani *et al.,* 2011). D'une manière générale, si l'on considère l'ensemble des séquences du genre *Pinctada*, il semble que le pourcentage d'homologie entre les séquences de *P. margaritifera* et *P. maxima* soit plus grand qu'entre *P. margaritifera* et *P. fucata*.

Parmi les 69 séquences identifiées chez *P. margaritifera* par homologie avec des séquences de bivalves, 14 ont été obtenues par homologie avec des séquences au sein d'espèces n'appartenant pas au genre *Pinctada,* avec des pourcentages d'homologie variant de 28% (EP protein precursor chez *M. edulis*) à 58% (bone morphogenic protein type 2 receptor chez *Crassostrea gigas*). Les pourcentages d'homologie observés ici sont plus bas que ceux observés entre les séquences appartenant au genre *Pinctada*, à l'exception de ceux observés entre les séquences de protéines impliquées dans les mécanismes de régulation du calcium. A titre d'exemple, la séquence de la Calmodulin chez *Hyriopsis schlegelii* (moule perlière d'eau douce) présente un pourcentage d'homologie de 99% avec celle identifiée chez *P. margaritifera*.

Si l'on étend cette analyse aux 13 protéines de la biominéralisation identifiées chez *P. margaritifera* par homologie avec des séquences de gastéropodes, le pourcentage d'homologie varie de 27% (Veliger mantle 1 chez *Haliotis asinina*) à 100% (Calmodulin chez *Conus cuneolus*). Des séquences homologues à celles de la Perlucin (Mann *et al.,* 2000; Weiss *et al.,* 2000), de la Perlustrin (Weiss *et al.,* 2000; Weiss *et al.,* 2001) et de la Perlwapin de *H. laevigata* (Treccani 2006) ont également pu être identifiées chez *P. margaritifera*.

Cette approche candidat a permis d'identifier un catalogue de 82 séquences uniques codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*, et a largement contribué à accroître la quantité d'information disponible sur le plan génomique chez cette espèce. *P. margaritifera* est ainsi à ce jour l'espèce pour laquelle on dispose de plus d'information de séquences concernant les processus de biominéralisation au sein des protostomiens. De plus, l'exploitation régulière de la banque EST de manteau par approche candidat (de même qu'une annotation régulière de la banque) permettra d'enrichir ce catalogue au fur et à mesure que des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation seront identifiés chez d'autres espèces.

3.2. Identification de protéines de la matrice organique associée aux structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera* par la mise en place d'une approche protéomique globale.

3.2.1. Contexte et démarche

Les données de transcriptomique obtenues grâce à la constitution de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ont également été exploitées par la mise en place d'une approche protéomique globale réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Benjamin Marie (Ifremer LBQP – UMR 5561 Biogéosciences de l'Université de Bourgogne, Dijon). Les travaux de post-doctorat de Benjamin Marie ont consisté à développer une analyse protéomique globale des matrices organiques des tissus minéralisés dans l'objectif d'identifier les protéines qui composent la nacre des perles et des premiers dépôts à la surface du nucléus, ainsi que la nacre et les prismes de coquille chez *P. margaritifera* (figure 23). Combinée à l'approche transcriptomique globale mise en place sur le manteau, cette approche a permis d'identifier et de sélectionner un ensemble de gènes biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera*.

L'analyse protéomique globale a donc consisté en une digestion par la trypsine des matrices acidosolubles (ASM) et insolubles (AIM) de prismes et de nacre de coquille d'une part, et de nacre de perles et des premiers dépôts à la surface du nucléus d'autre part. L'analyse des peptides générés a été réalisée par spectrométrie de masse en mode MS/MS. Les peptides obtenus ont été comparés, grâce au logiciel d'annotation MASCOT à des « peptides virtuels » issus de la digestion *in silico* des séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*. Le logiciel MASCOT attribue automatiquement un score (prot-score) à chaque protéine identifiée, directement proportionnel au nombre de peptides composant la protéine qui supportent l'identification. Cette comparaison a permis d'aboutir à l'identification et à l'annotation de protéines qui composent les matrices organiques de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera* grâce aux séquences de la banque EST de manteau.

3.2.2. Identification des protéines des matrices organiques associées aux structures coquillières et perlières minéralisées de *P. margaritifera*

Cette approche protéomique a permis d'identifier 369 séquences de protéines (ou de peptides assemblés) uniques au sein des structures minéralisées chez *P. margaritifera* (table 4). Parmi ces 369 séquences :

- 119 ont été identifiées comme des composants des structures prismatiques de la coquille
- 77 ont été identifiées comme des composants des structures nacrées de la coquille
- 123 ont été identifiées comme des composants des structures de la perle
- 50 ont été identifiées comme des composants des premiers dépôts à la surface du nucléus

La totalité des 369 séquences identifiées par l'approche protéomique a été assignée par homologie à des séquences de la banque EST de manteau de *P. margaritifera,* et plus précisément avec un ensemble de 221 séquences uniques non redondantes (table 4). Le fait que le nombre de séquences uniques non redondantes de la banque EST permettant d'assigner les protéines soit inférieur au nombre total de séquences protéiques identifiées indique que ces dernières peuvent être assignées par une même séquence unique de la banque EST. Autrement dit, plusieurs séquences de protéines « différentes » sont en réalité issues de la digestion d'une même protéine, elle-même représentée par une seule séquence unique au sein de la banque EST. Les 221 séquences uniques de la banque

EST ayant assigné des séquences protéiques des structures minéralisées ont elle-même été annotées par BlastX avec 130 séquences référencées dans GenBank (table 4). Au final, les 369 séquences protéiques identifiées au sein des structures minéralisées de *P. margaritifera* ont permis de mettre en évidence 130 protéines différentes, dont 19 seulement correspondent à des protéines d'ores et déjà connues pour être impliquées dans les processus de biominéralisation (table 4). Ces protéines sont KRMP-7 et KRMP-11, la Shematrin-8 et la Shematrin-9, la Linkine, *Pmarg*-Pearlin, et MRNP-34 chez *P. margaritifera* ; PIF-177, N19, MSI60, Mantle protein 10 et Mantle protein 12, MNP88, la Prismalin-14, Tyrosinase-like protein 1, la Shematrin-5 et la Shematrin-6 chez *P. fucata* ; N66 (Nacrein) et une Shematrin chez *P. maxima*.

Table 4. Statistiques de description des données issues de l'approche protéomique globale menée sur les matrices organiques des structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera*

Paramètres	Valeur	Poucentage
Nombre total de protéines (ou peptides assemblés) identifiés	**369**	100%
- au sein des prismes de coquille	119	32,25%
- au sein de la nacre de coquille	77	20,87%
- au sein de la nacre de perles	123	33,33%
- au sein des premiers dépôts sur le nucléus	50	13,55%
Nombre total d'EST assignant les protéines (ou peptides assemblés)	221	-
Nombre d'EST annotées par des accessions GenBank non redondantes	**130**	100%
Nombre d'accessions GenBank de protéines impliquées dans la biominéralisation	**19**	**14,62%**
- identifiées chez *P. fucata*	10	6,92%
- identifiées chez *P. margaritifera*	7	5,38%
- identifiées chez *P. maxima*	2	1,54%

Une analyse approfondie de la répartition des protéines au sein des différents types de structures minéralisées a permis d'identifier des protéines spécifiques des différentes microstructures de carbonate de calcium, nacre et prismes, et des protéines communes aux deux microstructures (table 5). Cette analyse montre que :

- Il n'y a pas de protéine « majoritaire » commune entre la nacre et les prismes de la coquille chez *P. margaritifera,* et les protéines impliquées dans les processus de biominéralisation ont une localisation spécifique à un type de carbonate de calcium donné :
    - les protéines Shematrin, Tyrosinase-like protein 1, KRMP-7 et KRMP-11, MNP88 protein et Prismalin-14 sont spécifiquement localisées au sein des structures prismatiques de la coquille
    - les protéines N66, *Pmarg*-Pearlin, MSI60, MRNP-34 et la Linkine sont spécifiquement localisées au sein des structures nacrées des perles de la coquille

  Ces observations soulignent le fait que la coquille de *P. margaritifera* possède une couche externe prismatique et calcitique, très différente de la couche interne nacrée et aragonitique, tant en terme de microstructure que de composition protéique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans le cadre de la caractérisation de quelques une de ces protéines chez *P. margaritifera* et les autres espèces du genre *Pinctada* (Sudo *et al.,* 1997; Kono *et al.,* 2000; Suzuki *et al.,* 2004; Yano *et al.,*2006; Zhang *et al.,* 2006; Montagnani *et al.,* 2011), mais qui n'avaient encore jusqu'à présent pas été observées à l'échelle du protéome global des différentes structures calcifiantes.

- Trois protéines sont présentes au sein des deux types de polymorphes de carbonate de calcium : la Shematrin-8, PIF-177 et Mantle protein 10 :
    - la Shematrin-8 la Mantle protein 10 sont majoritairement représentées au sein des prismes de coquille avec un prot-score de 83,72 et 45,45 respectivement, contre des prot-score compris entre 4,92 et 6,04 pour les structures nacrées de perles et de coquille.
    - La protéine PIF-177 présente le profil inverse, majoritairement exprimée au sein de structures nacrées de perles et de coquille avec un prot-score de 61,86 et 57,08 respectivement, contre un prot-score de 6,96 pour les structures de prismes de coquille.

  Ces caractéristiques pourraient en partie expliquer des profils d'expression au sein du manteau de gènes codant des protéines non strictement spécifiques à un polymorphe de carbonate de calcium donné. Néanmoins les valeurs de prot-score indiquent que ces protéines prédominent très largement dans un seul des types de polymorphes de carbonate de calcium étudié.

- La très grande majorité des protéines identifiées comme composants de la nacre de la coquille sont également des composants de la nacre des perles. Les microstructures de la couche coquillière nacrée d'une part, et des perles, d'autre part, étant en grande partie identiques (Cuif *et al.*, 2011), ces résultats suggèrent que les assemblages macromoléculaires ordonnés par les protéines de la matrice organique de ces 2 biominéraux le sont également. Dans un objectif de recherche de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle, ce résultat est particulièrement intéressant dans la mesure où des données protéiques obtenues par des analyses biochimiques de la couche coquillière nacrée sont donc directement transposables aux perles, ce qui permet alors de s'affranchir d'un certain nombre de contraintes liées à l'analyse des perles.

Table 5. Protéines connues identifiées par approche protéomique globale au sein des matrices organiques des structures minéralisées coquillières et perlières de *P. margaritifera*

Protéines identifiées par l'approche protéomique globale	espèces d'identification de la protéine homologue	Localisation au sein des structures minéralisées	Prot-Score			
			Surface du nucléus	Nacre des perles	Nacre de coquille	Prisme de coquille
Shematrin-8	*P. margaritifera*	Surface du nucléus, Nacre (perle et coquille) et prismes coquille	4	6	6,04	83,72
Mantle protein 10	*P. fucata*	Nacre de perle et prismes de coquille		4,92		45,45
Shematrin-9	*P. margaritifera*	prismes coquille				24,69
Tyrosinase-like protein 1	*P. fucata*	prismes coquille				13,92
KRMP-11	*P. margaritifera*	prismes coquille				10,36
Shematrin-5	*P. fucata*	prismes coquille				8,13
Shematrin-6	*P. fucata*	prismes coquille				7,54
Pif177	*P. fucata*	Nacre (perle et coquille) et prismes coquille		61,86	57,08	6,96
Shematrin	*P. maxima*	prismes coquille				6,17
MNP88 protein	*P. fucata*	prismes coquille				5,05
KRMP-7	*P. margaritifera*	prismes coquille				4,96
Prismalin-14	*P. fucata*	prismes coquille				4,02
N66 matrix protein	*P. maxima*	Nacre (perle et coquille)		37,94	26,33	
insoluble protein MSI60	*P. fucata*	Nacre (perle et coquille)		10,66	22,78	
Pmarg-Pearlin	*P. margaritifera*	Nacre (perle et coquille)		15,54	13,75	
Linkine	*P. margaritifera*	Nacre (perle et coquille)		15,4	12,28	
MRNP-34	*P. margaritifera*	Nacre (perle et coquille)		14,84	12,03	
Mantle protein 12	*P. fucata*	Surface du nucléus	11,62			
nacre protein N19	*P. fucata*	Surface du nucléus	6			

Ces résultats constituent une avancée considérable vers une meilleure connaissance des constituants de la matrice organique des structures minéralisées et des processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*. Ils indiquent de plus que la banque EST de manteau de *P. margaritifera*, en termes de quantité et de nature de séquences qui la composent, constitue un outil particulièrement performant pour l'identification de séquences de biominéralisation homologues (candidat) ou nouvelles (en aveugle). En effet, l'analyse de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* par approche gène-candidat a conduit à l'identification de la quasi-totalité des gènes codant des protéines chez *P. margaritifera* homologues à celles préalablement identifiés chez d'autres espèces. L'association de l'approche EST avec une approche protéomique globale a permis d'identifier de nombreuses séquences dont la grande majorité sont totalement inconnues, et pour lesquelles on ne connaît aucune protéine homologue chez d'autres organismes. De plus, les informations recueillies par la mise en place commune de ces deux approches permettent de confirmer que les transcrits de la banque EST de manteau codent des protéines qui composent véritablement les structures minéralisées.

3.3. Identification de gènes exprimés dans les tissus biominéralisateurs de la perle chez *P. margaritifera* : Constitution de banques SAGE de greffons et de poches perlières

3.3.1. Méthode d'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE) : caractéristiques et avantages

L'analyse en série de l'expression des gènes (Serial Analysis of Gene Expression ou SAGE) est une technique mise au point par V.E. Velculescu (Velculescu *et al.,* 1995) et constitue une méthode de choix pour l'exploration du transcriptome. Elle consiste à réaliser un inventaire des transcrits (ARN messagers - ARNm) présents dans un échantillon de cellules, tissus ou organes dans une condition physiologique donnée, en isolant à partir de chacun d'eux un court fragment spécifique d'une vingtaine de paire de bases appelé « sequence tag » (étiquette de séquence) représentant la signature d'un gène. L'inventaire réalisé, grâce à la production d'un grand nombre de tags, se veut représentatif de la quantité et de la diversité des transcrits présents dans un tissu donné et une condition donnée. Il est alors possible de mesurer la fréquence des tags, et ainsi d'établir une mesure quantitative du profil d'expression d'un gène parmi des milliers dans une cellule/tissu. Ainsi, la comparaison de données issues de plusieurs banques SAGE d'échantillons différents permet d'identifier et de quantifier les gènes différentiellement exprimés au sein des différentes conditions étudiées.

Par ailleurs, la méthode SAGE permet de mettre en évidence sans *a priori* de nouveaux produits de transcription sans homologues connus, contrairement aux méthodes basées sur l'hybridation à des collections de sondes nucléiques, exigeant une caractérisation préalable des gènes analysés. Enfin, cette méthode repose sur l'analyse de séquences de taille minimale, courts tags d'une vingtaine de paires de bases, qui sont statistiquement suffisantes pour identifier sans ambigüité un ARNm (Saha *et al.,* 2002). Cette caractéristique technique d'annotation des tags requiert néanmoins de disposer de bases de données de séquences génomiques complètes pour les espèces étudiées. Dans le cadre de cette thèse, cette annotation a été rendue possible par l'établissement au préalable de la banque EST de manteau. A terme, la constitution et l'exploitation des banques SAGE permet d'offrir une vision globale des évènements transcriptomiques ayant lieu dans un type cellulaire donné et ouvre des perspectives de modélisation *in silico* des fonctions biologiques, telle que la mise en évidence de réseaux de gènes et protéines par exemple.

3.3.2. Constitution de banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera* : démarche et objectifs

Les gènes identifiés au LBQP par approche candidat, à savoir *pmarg*-pearlin codant une protéine impliquée dans la synthèse de l'aragonite (Montagnani *et al.,* 2011), *pmarg*-aspein codant une protéine impliqué dans la synthèse de la calcite et *pmarg*-nacrein, ont servi d'outils pour l'étude des processus de biominéralisation et de formation de la perle au sein des différents compartiments de la greffe (greffon, sac perlier). Les travaux menés par hybridation *in situ* ont notamment montré que les transcrits de ces gènes sont localisés dans des zones spécifiques et distinctes de l'épithélium minéralisateur du manteau. De plus, l'analyse de l'expression du gène *pmarg*-pearlin par qPCR au niveau du manteau et des greffons a montré qu'il existait une variation dorso-ventrale importante de l'expression de ce gène dans ces deux tissus. Ces travaux ont ainsi permis de montrer qu'il existe une limite fonctionnelle précise de l'épithélium minéralisateur du manteau au niveau de laquelle sont découpés les greffons, associée à la sécrétion d'un type de polymorphe de carbonate de calcium particulier (calcite ou aragonite). Les résultats obtenus suggéraient alors fortement l'existence d'une activité minéralisatrice hétérogène au niveau de l'épithélium du manteau, des greffons et du sac perlier. Dès lors, le sac perlier issu d'un greffon découpé au niveau du manteau pourrait avoir une double fonction associée à la nature des dépôts de carbonate de calcium à la surface du nucléus, et donc à la qualité de la perle.

Afin de tester l'hypothèse de l'impact d'une activité minéralisatrice hétérogène au sein des tissus biominéralisateurs de la perle (greffons et sacs perliers) sur la qualité de la perle, une approche globale d'analyse du transcriptome a été menée sur les cellules de greffons et de poches perlières, via la constitution de banques SAGE par pyroséquençage. Quatre banques de données SAGE ont été constituées basées sur la caractérisation des zones fonctionnelles du manteau : deux banques de greffons de hauteurs de découpe « 10/90 » et « 90/10 », et deux banques de poches perlières issues de la greffe de ces deux types de greffons. Ces différentes hauteurs de découpe le long de l'axe dorso-ventral du manteau, ont été établies par rapport au repère physique utilisé par les greffeurs, la « ligne colorée » observable sur la face externe du manteau (Figure 27) :

- « 90/10» : 90% au-dessus/10% au-dessous de la ligne colorée
- « 10/90» : 10% au-dessus/90% au-dessous de la ligne colorée

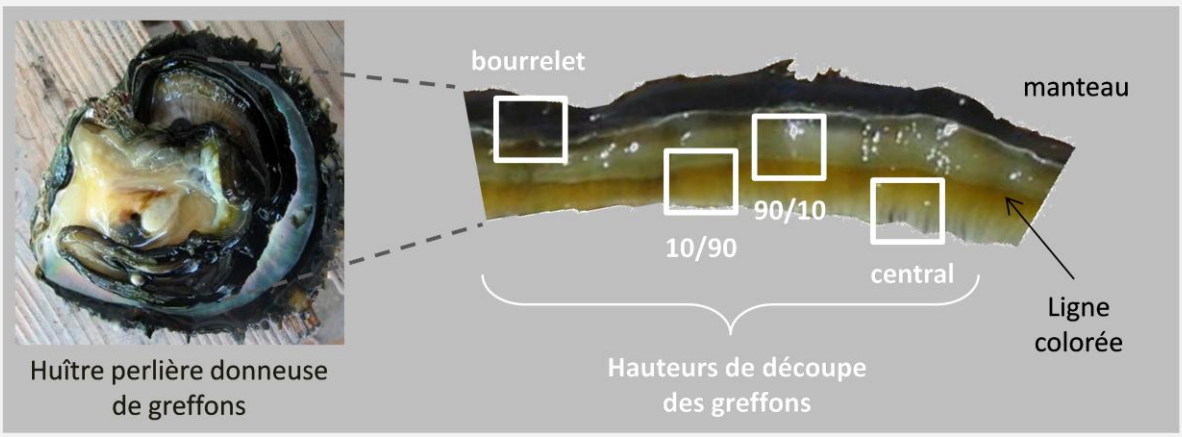

Figure 27. Hauteurs de découpe des greffons au sein du manteau de *P. margaritifera*. Les greffons sont découpés à différentes hauteurs par rapport à un repère physique utilisé par les greffeurs, « la ligne colorée » observable sur la face externe du manteau. Deux hauteurs de découpe ont été choisies dans le cadre de la constitution des banques SAGE : « 90/10» : 90% au-dessus/10% au-dessous de la ligne colorée et « 10/90» : 10% au-dessus/90% au-dessous de la ligne colorée. (Photos : Ifremer).

Dans un objectif de recherche de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle, les hauteurs de découpe « 90/10 » et « 10/90 » ont été choisies, d'une part parce qu'elles sont respectivement potentiellement impliquées dans la synthèse de calcite et d'aragonite, et de ce fait potentiellement corrélées à la qualité du dépôt à la surface des perles, et d'autre part car elles correspondent à deux zones fonctionnelles distinctes du manteau au niveau desquelles les greffeurs découpent, de manière traditionnelle et empirique, les greffons.

Les poches perlières greffées contiennent le sac perlier issu du greffon inséré dans la poche perlière. Seul le sac perlier présente une activité de biominéralisation à l'origine de la formation de la perle, mais cet épithélium monostratifié est indissociable de la poche qui le contient. Il est donc important de noter que pour l'étude des processus de biominéralisation de la perle, le tissu cible est le sac perlier, mais que pour des raisons techniques, des banques SAGE de poches perlières (contenant le sac perlier) ont été constituées.

3.3.3. Identification de gènes exprimés dans les tissus biominéralisateurs de la perle (greffons et poches perlières) chez *P. margaritifera*

Le traitement bioinformatique des données brutes issues du séquençage des banques SAGE consiste dans un premier temps à détecter une séquence signal ("CATG") au début de chaque étiquette (tag), puis à séquencer les nucléotides qui suivent ce tag et en dénombrer l'occurrence pour enfin établir une mesure quantitative du profil d'expression de chaque tag. Dans un second temps, les tags SAGE font l'objet d'une assignation, c'est-à-dire d'une comparaison avec des banques de données de séquences de génomes afin d'identifier les gènes mis en évidence.

Les séquences brutes des banques SAGE ont été analysées en utilisant le logiciel C+tag développé par la société SkuldTech, afin d'individualiser la séquence de chaque tag (Figure 28). Les tags ainsi extraits par le logiciel C+tag sont appelés les tags expérimentaux. La constitution de ces quatre banques SAGE a abouti au séquençage de plus de six millions de tags au total, sans tenir compte de la redondance des séquences. Les tags séquencés ont une longueur de 21 paires de bases, soit 17 paires de bases après soustraction de la séquence signal commune "CATG". A partir de ces tags de 17 paires de bases, deux jeux de données brutes de tags ont été constitués, d'une longueur de 16 paires de bases et 10 paires de bases. Pour chaque jeu de données, l'établissement de l'occurrence de l'ensemble des tags a permis de déterminer le nombre exact de tags non redondants par banque, ainsi que leur niveau d'expression respectif. La base de données des tags de 10 pb contient 363 177 tags non redondants, et la base de données des tags de 16 pb contient 846 009 tags non redondants (table 6). Dans la base de données des tags de 10 pb ont été dénombrés 184 298 tags non redondants dans la banque de greffons 10/90, 193 441 tags dans la banque de greffons 90/10, 174 600 tags pour les banques de poches 10/90, et 185 339 tags pour les banques de poche 90/10. Dans la base de données des tags de 16 pb ont été dénombrés 321 049 tags non redondants dans la banque de greffons 10/90, 336 165 tags dans la banque de greffons 90/10, 260 045 tags pour les banques de poches 10/90, et 344 293 tags pour les banques de poche 90/10 (table 6).

Classiquement, pour réaliser l'annotation d'une séquence, il est courant de faire une recherche de type Blast dans une banque de séquence lorsque l'on dispose d'une séquence à annoter de longueur suffisante. Mais cette démarche pose problème dans le cas des tags générés par la mise en place d'une approche SAGE, puisqu' une dizaine de nucléotides ne suffisent pas à discriminer de façon non ambigüe l'ARNm et donc le gène à l'origine d'une séquence d'un tag. Une alternative à l'annotation de type Blast permettant d'assigner un tag à une séquence d'un gène a donc été mise au point. Cette démarche met à profit la spécificité de localisation d'un tag sur le transcrit dont il est issu (une séquence de 21 nucléotides en 3' d'un site de restriction le plus proche de la séquence de poly-adenylation). La stratégie d'assignation consiste à avoir recours aux banques de données de séquences nucléotidiques contenant l'ensemble des séquences d'ARNm d'un organisme, afin de prédire l'ensemble des séquences tags qui résulteraient d'une expérience SAGE. Ces tags théoriques, appelés des tags virtuels, sont ensuite rassemblés dans une banque de données de tags virtuels. Des logiciels d'assignation comparent la séquence de chaque tag expérimental à celles des tags virtuels disponibles dans les banques, et permettent ainsi d'assigner les tags expérimentaux à leur transcrit, et donc leur gène.

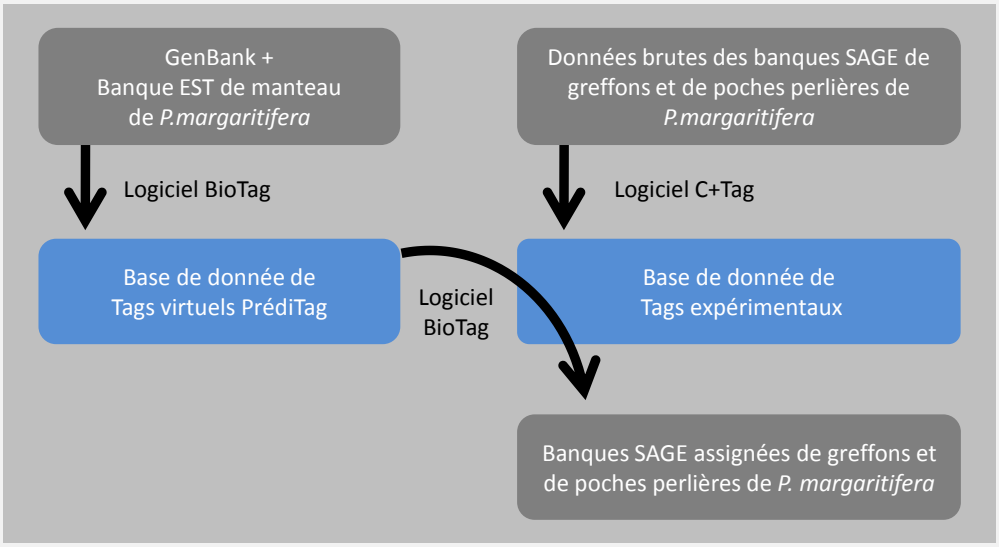

Figure 28. Logiciels de traitement des données brutes et d'assignation des tags des banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera*. Les séquences brutes des banques SAGE ont été analysées en utilisant le logiciel C+tag développé par la société SkuldTech, afin d'individualiser chaque tag séquencé. Les tags ainsi extraits par le logiciel C+tag sont appelés les tags expérimentaux. Les tags expérimentaux des banques SAGE de poches perlières et de greffons ont été annotés en utilisant le logiciel BioTag développé par la société SkuldTech, qui a permis de créer la base de données de tags virtuels (PrediTag) à partir des séquences d'huîtres perlière alors disponibles sur NCBI et des séquences uniques de la banque EST. L'assignation de ces tags expérimentaux à été réalisée par comparaison avec les tags virtuels de la base de données PrédiTag générées à partir des séquences uniques de la banque EST, puis par comparaison avec les tags virtuels de la base de données PrédiTag générées à partir des données disponibles sur GenBank dans un second temps.

Les tags des banques SAGE de poches perlières et de greffons ont été annotés en utilisant le logiciel BioTag développé par la société SkuldTech, qui a permis de créer la base de données de tags virtuels (PrediTag) à partir des séquences d'huîtres perlières alors disponibles sur NCBI (GenBank release number#166), et des séquences uniques de la banque EST (Figure 28). L'assignation des tags expérimentaux a été réalisée par comparaison avec les tags virtuels de la base de données PrediTag générées à partir des séquences uniques de la banque EST issues d'un assemblage à 90% d'homologie dans un premier temps, puis par comparaison avec les tags virtuels de la base de données PrediTag générées à partir des données disponibles sur GenBank dans un second temps.

A l'issue de l'étape d'assignation, différents types de tags expérimentaux se distinguent : les tags mono-assignés (assignés à un seul et unique gène), les tags multi-assignés (assignés à plusieurs gènes) et enfin les tags non assignés. Ainsi, sur les 363 177 tags expérimentaux de la base de données des tags à 10 pb, 25,7% (93 442 tags) ont été assignés, et sur les 846 009 tags expérimentaux de la base de données des tags à 16 pb, 5,2% (44 010 tags) ont été assignés (table 6). Sur les 93 442 tags expérimentaux assignés de 10 pb, 99,7% sont mono-assignés (93 120 tags), 0,3% sont multi-assignés (322 tags), et sur les 44 010 tags expérimentaux assignés de 16 pb, 99,7% sont mono-assignés (43 886 tags), 0,3% sont multi-assignés (124 tags) (table 6). A cette étape, la taille du tag (10 pb ou 16 pb, en fonction des bases de données) est un paramètre important. En effet, plus la séquence du tag est longue, plus le pourcentage de tags annotés est faible (25% de tags de 10 pb assignés contre 5% de tags de 16 pb assignés). En revanche, plus la séquence du tag est longue, plus l'assignation est fiable. Bien que le pourcentage de tags multi-assignés soit rigoureusement identique entre les bases de données de 10 pb ou 16 pb (0,3% des tags assignés), la qualité de l'assignation augmente proportionnellement avec la longueur du tag. Le choix de poursuivre l'analyse sur les tags assignés à 10pb ou 16pb doit correspondre au bon compromis entre une assignation fiable d'une part, et un nombre de séquences annotées raisonnablement suffisant pour pouvoir poursuivre les analyses d'autre part.

Table 6. Statistiques de description des banques SAGE réalisées sur les greffons et les poches perlières de *P. margaritifera*

	Base de données de tags à 10 pb				Base de données de tags à 16 pb			
	Nombre de tags	% / tags totaux	% / tags assignés	% / tags assignés par des séquences EST	Nombre de tags	% / tags totaux	% / tags assignés	% / tags assignés par des séquences EST
Tags totaux non redondants	**363177**	100%	-	-	**846009**	100%	-	-
Banque de greffons 10/90	184298	50,75%	-	-	321049	37,95%	-	-
Banque de greffons 90/10	193441	53,26%	-	-	336165	39,74%	-	-
Banque de poches 10/90	174600	48,06%	-	-	260045	30,74%	-	-
Banque de poches 90/10	185339	51,03%	-	-	344293	40,70%	-	-
Tags assignés	**93442**	25,73%	100%	-	**44010**	5,20%	100%	-
Tags mono-assignés	93210	25,64%	99,66%	-	43886	5,19%	100%	-
Tags multi-assignés	322	0,09%	0,34%	-	124	0,01%	0%	-
Tags non assignés	269735	74,27%	-	-	801999	94,80%	-	-
Tags assignés par des séquences de la base de données GenBank	21476	5,91%	22,97%	-	253	0,07%	1%	-
Tags assignés par des séquences uniques de la banque EST de manteau	**71975**	19,82%	77,03%	100%	**43757**	12,05%	99%	100%
Tags assignés par des séquences uniques annotées	**8328**	2,29%	8,91%	11,57%	**5264**	1,45%	12%	12%
Tags assignés par des séquences uniques non annotées	63647	17,53%	68,11%	88,43%	38493	10,30%	87%	88%

Sur les 93 442 tags expérimentaux assignés de 10 pb, 77% (71 975 tags) ont ainsi été assignés à partir des séquences uniques de la banque EST, et 23% (21 467 tags) ont été assignés à partir des séquences de la base de données GenBank. Sur les 44 010 tags expérimentaux assignés de 16 pb, 99,4% (43 757 tags) ont été assignés à partir des séquences uniques de la banque EST, et 0,6% (253 tags) ont été assignés à partir des séquences de la base de données GenBank (table 6). Parmi les séquences uniques de la banque EST ayant permis l'assignation des 71 975 tags expérimentaux de 10 pb, 8 328 séquences uniques (11,6 %) ont été annotées avec succès par BlastX, par homologie avec les séquences des bases de données protéiques en ligne non redondantes (nrdb) du NCBI (BlastX E-value ≤10-3). De même, parmi les séquences de la banque EST ayant permis l'assignation des 44 010 tags expérimentaux de 16 pb, 5 264 séquences uniques (12%) ont été annotées avec succès (table 6). Dans la mesure où l'assignation de ces tags expérimentaux a été réalisée à partir des séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* dans un premier temps, puis à partir des données disponibles sur GenBank dans un second temps, l'assignation des tags par les séquences uniques de la banque EST a donc été particulièrement efficace, puisque ces séquences permettent

l'assignation de la quasi totalité des tags assignés (99,4%) d'une longueur de 16 pb, et de plus des 3/4 des tags assignés (77%) d'une longueur de 10 pb. De plus, si l'on considère que seulement 12% des séquences EST ayant servis à l'assignation des tags (et ce quel que soit leur longueur) sont des séquences annotées, alors la constitution de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* a permis d'optimiser l'assignation des tags des banques de manière considérable, par rapport à une assignation qui n'aurait été réalisée qu'à partir des séquences issues de GenBank uniquement.

4. Sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera*

L'exploitation des approches transcriptomiques et protéomiques globales mises en place sur les tissus minéralisateurs et sur les matrices organiques des structures minéralisées chez *P. margaritifera* a permis d'identifier un ensemble de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation de la coquille et de la perle. Ces gènes constituent autant de biomarqueurs candidats potentiels de la qualité et de la croissance de la perle, qui ont fait l'objet d'une sélection dont les critères appliqués sont spécifiques à chacune des méthodes développées. Cette sélection et les critères appliqués sont décrits dans ce paragraphe.

4.1. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation de la banque EST de manteau chez *P. margaritifera*

Les 82 séquences de gènes identifiées codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* par l'approche candidat menée *in silico* par BlastX sur les séquences de la banque EST constituent un ensemble de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle.

Parmi ces séquences, 19 gènes codants des protéines préalablement connues et potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation sont communs à ceux identifiés dans le cadre de l'approche protéomique globale. Ont ainsi été sélectionnées 18 séquences uniques de la banque EST ayant annotées des peptides homologues chez *P. margaritifera* aux protéines KRMP-7 et KRMP-11, Shematrin-5, Shematrin-6, Shematrin-8 et Shematrin-9, Linkine, *Pmarg*-perlin, MRNP-34, PIF-177, N19, MSI60, Mantle protein 10 et Mantle protein 12, MNP88, Prismalin-14, Tyrosinase-like protein 1, N66 (tables 4 et 5). Seule la séquence unique homologue à celle de la Shematrin de *P. maxima* identifiée au sein des prismes de coquille n'a pas été retenue dans le cadre de cette sélection, du fait de sa trop grande similitude avec les séquences de Shematrin-8 et Shematrin-9 identifiées chez *P. margaritifera*.

Une sélection complémentaire de 45 séquences a été réalisée, et concerne des séquences homologues identifiées chez *P. margaritifera* aux séquences de la famille de protéines KRMP 1 à 10 (à l'exception de la KRMP-7), des Shematrin 1 à 7 (à l'exception des shematrin-5 et shematrin-6), des MNP88/lack protein 1 à 7, des Mantle gene 1 à 8 et Mantle protein 9 et 11, des Asprich protein 1 à 3 et de l'Aspein, de la Chitin synthase, de la famille des anhydrases carboniques N33/N44/N66/Nacrein, des Bone Morphogenetic Factor (BMP-2), des canaux calcium L-type voltage-dépendent, de la Calmodulin, et des Jaccalin-related protein chez des espèces de bivalves, majoritairement *P. fucata*. Cette sélection comprend également une séquence homologue des Dermatopontin identifiées chez des espèces de gastéropodes (*Haliotis discus discus*, *Haliotis diversicolor supertexta* et *Biomphalaria glabrata*), de cnidaires (*Acropora millepora*) et d'éponges (*Suberites domuncula*).

Au final, la mise en place de l'approche transcriptomique globale menée sur le manteau a abouti à la sélection de 63 biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle, codant des protéines connues et impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*.

4.2. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation des banques SAGE de greffons et de poches perlières chez *P. margaritifera*

Quatre banques SAGE ont été réalisées : deux banques SAGE de greffons de hauteur de découpe 10/90 et 90/10, et deux banques SAGE de poches perlières (contenant le sac perlier) issues de greffes réalisées à partir des greffons de hauteur de découpe 10/90 et 90/10. Les séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ayant permis l'assignation d'un tag différentiellement exprimé en fonction des banques SAGE de greffons et de poches perlières de différentes hauteurs de découpe constituent un ensemble de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle.

L'exploitation des données SAGE a été réalisée sur les banques de tags de greffons et de poches perlières de 16 pb afin de disposer d'une annotation des tags la plus fiable possible, et repose sur un certain nombres de filtres successivement appliqués aux données brutes. Dans un premier temps, un filtre basé sur l'assignation des tags a été appliqué. Les tags sélectionnés dans le cadre de l'analyse différentielle doivent tous être assignés par une séquence unique de la banque EST de manteau ou par une séquences issue de GenBank d'au moins 150 pb, afin de disposer d'une séquence nucléotidique suffisamment longue pour pouvoir dessiner des amorces de qPCR. Ainsi, de 846 009 tags dans la Base de données de tags à 16 pb, l'application de ce premier filtre permet de restreindre le nombre de tags à 44 010, soit une réduction de 84,8% du nombre de tags (table 6). Dans un second temps, un filtre basé sur les occurrences des tags au sein des banques a été appliqué. En effet, dans un souci de seuil de détection en qPCR, tous les tags des greffons et de poches perlières dont la somme des occurrences au sein les banques SAGE est inférieure à 20 ont été ôtés de l'analyse. L'application de ce second filtre permet de restreindre le nombre de tags de 44 010 à 9 626 lorsque l'on considère les banques de greffons d'une part, à 11 119 lorsque l'on considère les banques de poches perlières d'autre part. Enfin l'application de ce filtre à la fois sur les banques de poches perlières et de greffons permet de restreindre le nombre de tags de 44 010 à 8 048.

Des filtres supplémentaires, également basés sur l'occurrence des tags, ont par la suite été appliqués afin de sélectionner des tags différentiellement exprimés entre des hauteurs de découpe (10/90 et 90/10) et/ou des types cellulaires différents (greffons et poches perlières). L'application de ce dernier filtre s'est basé sur la constitution de profils d'expression des tags entre les banques de données SAGE de greffons et de poches perlières prenant en considération le sens et la valeur du différentiel d'expression des tags en fonction des hauteurs découpe. Différents types de profils d'expression ont ainsi été retenus (table 7) :

- Un profil de tags différentiellement exprimés au moins 3 fois, et d'une surexpression commune à une hauteur de découpe (10/90 ou 90/10) entre les banques de greffons et de poche perlières, a permis de sélectionner un ensemble de 33 tags.
- Un profil de tags différentiellement exprimés au moins 4 fois, et d'une surexpression inverse en fonction de la hauteur de découpe (10/90 ou 90/10) entre les banques de greffons et de poche perlières, a permis de sélectionner un ensemble de 13 tags.
- Un profil de tags différentiellement exprimés 100 fois entre les banques de poches perlières issus des hauteurs de découpe 10/90 et 90/10, et sans tenir compte des occurrences dans les banques de greffons, a permis de sélectionner un ensemble de 21 tags. De même, un profil de tags différentiellement exprimés 6 fois entre les banques de greffons de hauteurs de découpe 10/90 et 90/10, sans tenir compte des occurrences dans les banques de poches perlières, a permis de sélectionner un ensemble de 29 tags.
- Un profil de tags spécifiques à une hauteur de découpe, à la fois au sein des banques de poches perlières et de greffons, a permis de sélectionner un ensemble de 8 tags.

Table 7. Profils d'expression des tags sélectionnés comme biomarqueurs candidats au sein des banques SAGE de greffons et de poches perlières de *P. margaritifera*

Profil d'expression	Filtres appliqués lors de la sélection	Occurrences des tags dans les banques SAGE				Nombre de tags		Nombre de tags non redondants
		Greffons 90/10	Greffons 10/90	Poches perlières 90/10	Poches perlières 10/90			
Surexpression des tags commune à une hauteur de découpe entre les banques de greffons et de poche perlières	Occurrences ≥ 20 Induction ≥ 3	+	≠ 0	+	≠ 0	26	33	92
		≠ 0	+	≠ 0	+	7		
Surexpression des tags inverse en fonction de la hauteur de découpe entre les banques de greffons et de poche perlières	Occurrences ≥ 20 Induction ≥ 4	≠ 0	+	+	≠ 0	8	13	
		+	≠ 0	≠ 0	+	5		
Tags différentiellement exprimés entre deux hauteurs de découpe au sein des banques de greffons	Occurrences ≥ 20 Induction ≥ 6	+	≠ 0	-	-	15	29	
		≠ 0	+	-	-	14		
Tags différentiellement exprimés entre deux hauteurs de découpe au sein des banques de poches perlières	Occurrences ≥ 20 Induction ≥ 100	-	-	+	≠ 0	13	21	
		-	-	≠ 0	+	8		
Tags spécifiques d'une hauteur de découpe	Occurrences ≥ 20	≥ 1	0	≥ 1	0	3	8	
		0	≥ 1	0	≥ 1	5		

L'application de ces filtres basés sur les occurrences des tags et leur différentiel d'expression entre les tissus (greffons et poches perlières) et/ou les hauteurs de découpe (10/90 et 90/10) au sein des banques SAGE a permis la sélection d'un ensemble de 92 tags non redondants entre les différents types de profils d'expression étudiés, annotés par des séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera*.

4.3. Sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation de l'approche protéomique globale réalisée sur les structures minéralisées (coquille et perles) chez *P. margaritifera*

Les séquences uniques de la banque EST ayant permis l'annotation de peptides issus de la digestion de la matrice organique des structures minéralisées chez *P. margaritifera* constituent un ensemble de biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle. La sélection de biomarqueurs potentiels a été réalisée à partir des protéines assignées par des séquences uniques EST inconnues. En premier lieu, les séquences EST uniques ayant assigné des protéines présentant un score d'identification (prot-score) inférieur à 4, c'est-à-dire présentant au moins deux peptides uniques différents détectés par MS/MS, ont été ôtés de l'analyse. En effet, ces identifications ont été jugées non certaines et susceptibles d'aboutir à l'obtention de faux positifs. Les séquences uniques EST ayant assigné des peptides d'un prot-score supérieur ou égal à 4 ont ensuite fait l'objet d'une analyse de séquence afin de révéler l'existence éventuelle de motifs d'intérêt impliqués dans les processus de biominéralisation. Enfin, les séquences uniques EST ont également fait l'objet d'un tri en fonction de la localisation des protéines correspondantes au sein des tissus minéralisés étudiés (nacre ou prismes de coquille, nacre de perle, et premiers dépôts à la surface du nucléus) (table 8).

Table 8. Localisation des protéines assignées par des séquences uniques EST inconnues de la banque de manteau de *P. margaritifera* et sélectionnées comme biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle

	Nombre de séquences	Localisation des protéines assignées par des séquences uniques de la banque EST de manteau			
		Surface du nucléus	Nacre des perles	Nacre de coquille	Prisme de coquille
Nombre de séquences uniques inconnues EST sélectionnées en fonction de la localisation des protéines	21	x			
	8		x		
	7			x	
	48				x
	23		x	x	
	2	x			x
	1	x	x		
	3		x		x
Nombre de séquences uniques inconnues EST sélectionnées	**113**				

Sur la base de ces différents critères, une série de 113 séquences de protéines a été sélectionnée (table 8), dont 43 (38,1%) pour lesquelles l'analyse de la séquence n'a révélé aucun motif connu dans les bases de données publiques (sites catalytiques, motifs répétés …). Ces 113 séquences correspondent de fait à des protéines totalement nouvelles, dont on sait qu'elles sont impliquées plus ou moins directement dans les processus de biominéralisation, puisqu'elles sont des constituants des structures minéralisées chez *P. margaritifera*. Sur les 113 protéines inconnues sélectionnées:

- 48 sont spécifiques des prismes de la coquille
- 21 sont spécifiques des premières couches déposées à la surface du nucléus
- 8 sont spécifiques de la nacre des perles
- 7 sont spécifiques de la nacre de la coquille

Certaines protéines présentent des localisations communes à plusieurs structures minéralisées. Ont donc également été sélectionnées :

- 23 protéines que l'on retrouve à la fois dans la nacre de la coquille et des perles
- 3 protéines que l'on retrouve à la fois dans la nacre des perles et les prismes de coquille
- 2 protéines que l'on retrouve à la fois dans les prismes de coquille et dans les premières couches déposées à la surface du nucléus.
- 1 s protéine que l'on retrouve à la fois dans la nacre des perles et dans les premières couches déposées à la surface du nucléus

Au final, la mise en place de l'approche protéomique globale sur les structures minéralisées chez *P. margaritifera* a abouti à la sélection de 113 séquences uniques EST, biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle, codant des protéines à ce jour inconnues.

4.4. Bilan de la sélection de gènes biomarqueurs candidats par exploitation des approches transcriptomiques et protéomique globales chez *P. margaritifera*

Le bilan de la recherche de biomarqueurs potentiels de la qualité des perles est le suivant (table 9) :

- L'exploitation de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* par approche gène-candidat a permis de sélectionner, parmi les 82 séquences de gènes identifiées codant des protéines connues potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation, un ensemble de 63 séquences de gènes biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle.
- L'exploitation des banques SAGE par l'application de filtre basés sur les occurrences des tags et leur différentiel d'expression entre les tissus (greffons et poches perlières) et/ou les hauteurs de découpe (« 90/10 » et « 10/90 ») a permis de sélectionner un ensemble de 92 tags différentiellement exprimés. Ces tags sont annotés par des séquences uniques de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* qui constituent autant de gènes biomarqueurs candidats codants des protéines inconnues.
- L'approche protéomique globale mise en place sur les structures minéralisées chez *P. margaritifera* a abouti à la sélection de 113 biomarqueurs candidats complémentaires correspondant à des séquences uniques de la banque EST codant des protéines à ce jour inconnues.

Table 9. Biomarqueurs candidats sélectionnés dans le cadre des approches transcriptomiques et protéomique globales mises en place sur les tissus minéralisateurs et sur les matrices organiques des structures minéralisées chez *P. margaritifera*

	Approche transcriptomique globale		Approche protéomique globale	TOTAL
	EST	SAGE	MS/MS	
Nombre de gènes biomarqueurs candidats correspondants à des protéines connues	63	-	-	63
Nombre de gènes biomarqueurs candidats correspondants à des protéines inconnues	-	92	113	205
				268

Au final, l'exploitation des banques de données de séquences transcriptomiques et protéomique réalisées dans le cadre des approches globales mises en place sur les tissus minéralisateurs et sur les matrices organiques des structures minéralisées chez *P. margaritifera* a permis de sélectionner un ensemble de 268 gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle. Parmi ces 268 gènes biomarqueurs candidats, 63 correspondent à des gènes codant des protéines connues et potentiellement impliquées dans le processus de biominéralisation, et 205 codent pour des protéines inconnues à ce jour chez *P. margaritifera*. Ces résultats montrent que la combinaison de ces approches transcriptomiques et protéomique globales est une méthode puissante d'identification, à la fois de gènes connus ou inconnus, exprimés au sein des tissus biominéralisateur (manteau, greffons et sacs perliers), ou codant des protéines constituant les structures minéralisées chez *P. margaritifera*. L'exploitation des banques de données de séquences générées par la mise en place de ces approches constituent de fait une méthode puissante d'identification de gènes biomarqueurs candidats de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera*.

5. Valorisation scientifique

Certains aspects des travaux qui viennent d'être décrits ont fait l'objet de publications. Notamment, la constitution de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ayant abouti à l'identification d'un catalogue de 82 gènes exprimés dans le tissus biominéralisateur de l'huître perlière et codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation, a fait l'objet d'une publication en premier auteur en 2010 dans la revue BMC Genomics (impact factor 2010 : 3,76) :

Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cleon, I., Cochennec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2010). "Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization." BMC Genomics **11**: 613.

Les données générées par la constitution de la banque EST de manteau de *P. margaritifera* ont également été exploitées dans le cadre d'une collaboration avec Daniel J. Jackson et Bernard M. Degnan de l'Université du Queensland, en Australie (School of Biological Sciences, University of Queensland, Brisbane, Australia). Les travaux ont concerné l'étude de certaines protéines impliquées dans les mécanismes de biominéralisation (notamment les Shematrins et les Chitin synthase) du point de vue évolutif afin d'évaluer si l'acquisition de la capacité de minéralisation de la nacre des bivalves et des gastéropodes au sein du phylum des mollusques correspond à l'évolution de gènes existants chez un ancêtre commun, ou constitue le résultat d'une convergence évolutive. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en tant que co-auteur en 2009 dans la revue Molecular Biology and Evolution (impact factor 2010 : 9,87) **:**

Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., **Joubert, C.**, Piquemal, D., Degnan, B. M. (2010). "Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs." Mol Biol Evol **27**(3): 591-608.

Enfin, une protéine nouvelle identifiée par l'approche protéomique globale menée sur les structures minéralisée chez *P. margaritifera* (MRNP34) a fait l'objet d'une caractérisation par analyse de séquence, qRT-PCR, HIS et immunolocalisation chez *P. margaritifera* et *P. maxima*. Les résultats ont permis de montrer que les protéines *Pmarg*-MRNP34 and *Pmax*-MRNP34 sont des protéines de 34 kDa constitutives de la nacre de la coquille de ces deux espèces, et dont les transcrits sont spécifiquement exprimés dans l'épithélium minéralisateur. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en second auteur en 2011 dans la revue Amino Acids (impact factor 2010 : 3,87) :

Marie, B., **Joubert, C.**, Belliard, C., Tayale, A., Zanella-Cléon, I., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2011). "Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters." Amino Acids.

Joubert et al. BMC Genomics 2010, 11:613
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/613

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization

Caroline Joubert[1], David Piquemal[2], Benjamin Marie[3], Laurent Manchon[2], Fabien Pierrat[2], Isabelle Zanella-Cléon[4], Nathalie Cochennec-Laureau[5], Yannick Gueguen[1*], Caroline Montagnani[1]

Abstract

Background: The shell of the pearl-producing bivalve *Pinctada margaritifera* is composed of an organic cell-free matrix that plays a key role in the dynamic process of biologically-controlled biomineralization. In order to increase genomic resources and identify shell matrix proteins implicated in biomineralization in *P. margaritifera*, high-throughput Expressed Sequence Tag (EST) pyrosequencing was undertaken on the calcifying mantle, combined with a proteomic analysis of the shell.

Results: We report the functional analysis of 276 738 sequences, leading to the constitution of an unprecedented catalog of 82 *P. margaritifera* biomineralization-related mantle protein sequences. Components of the current "chitin-silk fibroin gel-acidic macromolecule" model of biomineralization processes were found, in particular a homolog of a biomineralization protein (Pif-177) recently discovered in *P. fucata*. Among these sequences, we could show the localization of two other biomineralization protein transcripts, *pmarg-aspein* and *pmarg-pearlin*, in two distinct areas of the outer mantle epithelium, suggesting their implication in calcite and aragonite formation. Finally, by combining the EST approach with a proteomic mass spectrometry analysis of proteins isolated from the *P. margaritifera* shell organic matrix, we demonstrated the presence of 30 sequences containing almost all of the shell proteins that have been previously described from shell matrix protein analyses of the *Pinctada* genus. The integration of these two methods allowed the global composition of biomineralizing tissue and calcified structures to be examined in tandem for the first time.

Conclusions: This EST study made on the calcifying tissue of *P. margaritifera* is the first description of pyrosequencing on a pearl-producing bivalve species. Our results provide direct evidence that our EST data set covers most of the diversity of the matrix protein of *P. margaritifera* shell, but also that the mantle transcripts encode proteins present in *P. margaritifera* shell, hence demonstrating their implication in shell formation. Combining transcriptomic and proteomic approaches is therefore a powerful way to identify proteins involved in biomineralization. Data generated in this study supply the most comprehensive list of biomineralization-related sequences presently available among protostomian species, and represent a major breakthrough in the field of molluskan biomineralization.

Background

Mollusk shell is a natural biomaterial made up of a mineral phase - calcium carbonate ($CaCO_3$) - and an organic cell-free matrix (proteins, glycoproteins, lipids and polysaccharides) secreted by the external mantle epithelium, the tissue layer underlying the shell. Although this matrix represents less than 2% of the total composition of the shell by dry weight [1], it interacts with the crystal surface to orientate its nucleation and control crystal polymorphism, in the form of aragonite or calcite, in the different structural layers of the shell [2]. The highly organized internal structure of the shell has led to a very interdisciplinary approach to the study of biomineralization. The secretion of shell by

* Correspondence: yguegueu@ifremer.fr
[1]Ifremer - Laboratoire de Biotechnologie et de Qualité de la Perle, Centre Océanologique du Pacifique - BP 7004, 98719 Taravao, French Polynesia
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2010 Joubert et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Parallel Evolution of Nacre Building Gene Sets in Molluscs

Daniel J. Jackson,[1,2] Carmel McDougall,[1] Ben Woodcroft,[1] Patrick Moase,[3] Robert A. Rose,[4] Michael Kube,[5] Richard Reinhardt,[5] Daniel S. Rokhsar,[6,7] Caroline Montagnani,[8] Caroline Joubert,[8] David Piquemal,[9] and Bernard M. Degnan*,[1]

[1]School of Biological Sciences, University of Queensland, Brisbane, Australia

[2]Courant Research Center Geobiology, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Germany

[3]Clipper Pearls and Autore Pearling, Broome, WA, Australia

[4]Pearl Oyster Propagators, Darwin, NT, Australia

[5]Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

[6]Center for Integrative Genomics and Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley

[7]Department of Energy Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA

[8]IFREMER, Biotechnology and Pearl Quality Laboratory, Centre Océanologique du pacifique, Taravao, Tahiti, French Polynesia

[9]Skuldtech, Amarante, Montpellier, France

***Corresponding author:** E-mail: b.degnan@uq.edu.au.

Associate editor: Claudia Kappen

Research article

Abstract

The capacity to biomineralize is closely linked to the rapid expansion of animal life during the early Cambrian, with many skeletonized phyla first appearing in the fossil record at this time. The appearance of disparate molluscan forms during this period leaves open the possibility that shells evolved independently and in parallel in at least some groups. To test this proposition and gain insight into the evolution of structural genes that contribute to shell fabrication, we compared genes expressed in nacre (mother-of-pearl) forming cells in the mantle of the bivalve *Pinctada maxima* and the gastropod *Haliotis asinina*. Despite both species having highly lustrous nacre, we find extensive differences in these expressed gene sets. Following the removal of housekeeping genes, less than 10% of all gene clusters are shared between these molluscs, with some being conserved biomineralization genes that are also found in deuterostomes. These differences extend to secreted proteins that may localize to the organic shell matrix, with less than 15% of this secretome being shared. Despite these differences, *H. asinina* and *P. maxima* both secrete proteins with repetitive low-complexity domains (RLCDs). *Pinctada maxima* RLCD proteins—for example, the shematrins—are predominated by silk/fibroin-like domains, which are absent from the *H. asinina* data set. Comparisons of *shematrin* genes across three species of *Pinctada* indicate that this gene family has undergone extensive divergent evolution within pearl oysters. We also detect fundamental bivalve–gastropod differences in extracellular matrix proteins involved in mollusc-shell formation. *Pinctada maxima* expresses a chitin synthase at high levels and several chitin deacetylation genes, whereas only one protein involved in chitin interactions is present in the *H. asinina* data set, suggesting that the organic matrix on which calcification proceeds differs fundamentally between these species. Large-scale differences in genes expressed in nacre-forming cells of *Pinctada* and *Haliotis* are compatible with the hypothesis that gastropod and bivalve nacre is the result of convergent evolution. The expression of novel biomineralizing RLCD proteins in each of these two molluscs and, interestingly, sea urchins suggests that the evolution of such structural proteins has occurred independently multiple times in the Metazoa.

Key words: biomineralization, nacre, EST, evolution, mollusc, pearl.

Introduction

The Mollusca is a highly successful group of metazoans in terms of species abundance, range of morphotypes, and diversity of habitats occupied. This success can in part be attributed to a mechanism of shell construction adopted early in the history of the clade during the late pre-Cambrian (545+ Ma). The diversity of gastropod and bivalve shell types observed among extinct and modern species is evidence of the evolutionary success of this structure. Formed by secretions of the underlying tissue (the mantle), molluscan shells are a biocomposite material consisting primarily of $CaCO_3$, polysaccharides, and proteins. The organically derived component of the shell controls the initiation, expansion, and termination of crystal growth in a cell autonomous fashion and can even control the polymorph of calcium carbonate that is precipitated, most often aragonite or calcite (Belcher et al. 1996). Analysis of the molecular (Bedouet et al. 2006; Jackson et al. 2006; Jackson, Wörheide, et al. 2007; Ma et al. 2007; Gong et al. 2008) and mineralogical (Metzler et al. 2007; Gilbert et al. 2008) processes that generate the shell is providing some insight into how this is achieved at biological pH, temperature, and pressure, a feat of great interest to materials scientists.

© The Author 2009. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Amino Acids
DOI 10.1007/s00726-011-0932-0

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters

Benjamin Marie · Caroline Joubert · Corinne Belliard · Alexandre Tayale · Isabelle Zanella-Cléon · Frédéric Marin · Yannick Gueguen · Caroline Montagnani

Received: 19 March 2011 / Accepted: 30 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Nacre of the *Pinctada* pearl oyster shells is composed of 98% $CaCO_3$ and 2% organic matrix. The relationship between the organic matrix and the mechanism of nacre formation currently constitutes the main focus regarding the biomineralization process. In this study, we isolated a new nacre matrix protein in *P. margaritifera* and *P. maxima*, we called *Pmarg*- and *Pmax*-MRNP34 (methionine-rich nacre protein). MRNP34 is a secreted hydrophobic protein, which is remarkably rich in methionine, and which is specifically localised in mineralizing the epithelium cells of the mantle and in the nacre matrix. The structure of this protein is drastically different from those of the other nacre proteins already described. This unusual methionine-rich protein is a new member in the growing list of low complexity domain containing proteins that are associated with biocalcifications. These observations offer new insights to the molecular mechanisms of biomineralization.

Keywords Matrix protein · Methionine-rich · Biomineralization · Mollusc · Nacre · Calcifying mantle

Abbreviations

AA	Amino-acid
AIM	Acid-insoluble matrix
ASM	Acid-soluble matrix
EST	Expressed sequence tag
ISH	In situ hybridization
MRNP	Methionine-rich nacre protein
MS	Mass spectrometry
RLCD	Repeated low complexity domain

B. Marie · C. Joubert · C. Belliard · A. Tayale · Y. Gueguen (✉) · C. Montagnani
Ifremer, LBQP, Centre Océanologique du Pacifique, Taravao, French Polynesia
e-mail: yannick.gueguen@ifremer.fr

B. Marie · F. Marin
UMR 5561, CNRS, Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

Present Address:
B. Marie (✉)
UMR 7245, CNRS, MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France
e-mail: benjamin.marie@u-bourgogne.fr; bijamarie@yahoo.com

I. Zanella-Cléon
UMR 5086, CNRS, IFR 128 BioSciences, IBCP, Université de Lyon 1, Lyon, France

Present Address:
C. Montagnani
UMR 5119, CNRS, Ifremer, IRD, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, Université Montpellier II, Montpellier, France

Introduction

Nacre, also known as mother-of-pearl, is the most extensively studied non-human organo-mineral biomaterial because of its extremely high fracture toughness (Addadi et al. 2006). Nacre constitutes the lustrous inner layer of various mollusc shells, such as the pearl oyster from the genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae). Like other mollusc shell microstructures, nacre is built extracellularly under the cellular control by the calcifying epithelium of the mantle. The nacreous layer exhibits a remarkable regular lamellar microstructure consisting of uniformly thick layers (0.5 μm) of aragonite crystals, which are densely packed with small amount of proteins, glycoproteins and polysaccharides (for review see Addadi et al. 2006). These

Published online: 18 May 2011

Chapitre V: Résultats et discussion

Mise en évidence de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle par la mise en place d'un dispositif de greffe expérimentale et l'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats chez *P. margaritifera*

Mise en évidence de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle par la mise en place d'un dispositif de greffe expérimentale et l'analyse du taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats chez *P. margaritifera*

La première partie de ces travaux de thèse a consisté en l'identification de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*, et en la sélection d'un ensemble de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle (Chapitre III). La deuxième partie de ces travaux de thèse a pour objectif la validation de ces biomarqueurs candidats par l'identification d'un ensemble de gènes dont le taux d'expression au sein des tissus minéralisateurs de l'huître perlière peut être corrélé à la qualité des perles récoltées dans le cadre d'une greffe expérimentale (la greffe ADEQUA#2). Le chapitre IV décrit dans un premier temps les objectifs et la démarche adoptée dans le cadre de la validation des biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle, la réalisation de la greffe expérimentale ADEQUA#2 et la mise en évidence de l'influence des huîtres perlières donneuses de greffons sur la qualité des perles récoltées (ou « effet donneuse »). Dans un second temps, le chapitre IV décrit la mise en évidence d'un ensemble de gènes en tant que biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle par la mise en relation de l'effet donneuse et de la qualité des perles avec le taux d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein des tissus minéralisateurs par qRT-PCR haut-débit.

1. Objectifs et démarche mise en place

L'obtention d'une perle de qualité résulte d'un processus complexe de biominéralisation. La mise au point de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* a pour objectif principal la sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons « à fort potentiel minéralisateur » pour la production de perles de qualité supérieure. L'utilisation d'un biomarqueur comme outil prédictif de qualité n'a donc de sens que s'il existe un « effet donneuse », c'est-à-dire un impact d'une huître donneuse de greffons sur la qualité des perles récoltée issues de cette donneuse.

Afin de mettre en évidence cet effet, une greffe expérimentale, la greffe expérimentale ADEQUA#2, a été réalisée (figure 29). Cette greffe a dans un premier temps permis d'évaluer la qualité des perles récoltées en fonction de différentes variables, à savoir « Epaisseur de nacre à la surface du nucléus », « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale » telle qu'elle est classiquement évaluée par le Service de la Perliculture. L'évaluation de la qualité des perles récoltées en fonction des huîtres perlières donneuses de greffons dont elles sont issues a permis de confirmer l'existence d'un effet donneuse, et ainsi classer les huîtres perlières donneuses en fonction de chaque variable étudiée. Cette classification a permis de constituer des groupes d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels minéralisateurs contrastés en relation avec chaque variable. Dans un second temps, la greffe expérimentale ADEQUA#2 a également permis de disposer de matériel biologique, à savoir des greffons d'huîtres perlières donneuses et des poches perlières d'huîtres perlières receveuses. Ce matériel biologique a été utilisé pour constituer, sur la base de l'effet donneuse, des échantillonnages de greffons et de poches perlières à l'origine de la production de perles de qualité contrastée.

Le taux d'expression des biomarqueurs candidats a ainsi pu être étudié par qPCR haut-débit au sein de ces échantillonnages, pour chaque variable, afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés au sein de greffons et de poches perlières à l'origine de la production de perle de qualité contrastées. En parallèle, le niveau d'expression de ces gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau a été étudié par qPCR haut-débit afin de mettre en évidence un différentiel d'expression dorso-ventral potentiellement corrélé à la synthèse d'un type de polymorphe de carbonate de calcium donné (calcite ou aragonite). L'analyse conjointe des analyses du niveau d'expression des gènes en corrélation avec la qualité des perles et la nature du polymorphe de carbonate de calcium potentiellement produit a permis de valider un ensemble de gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*.

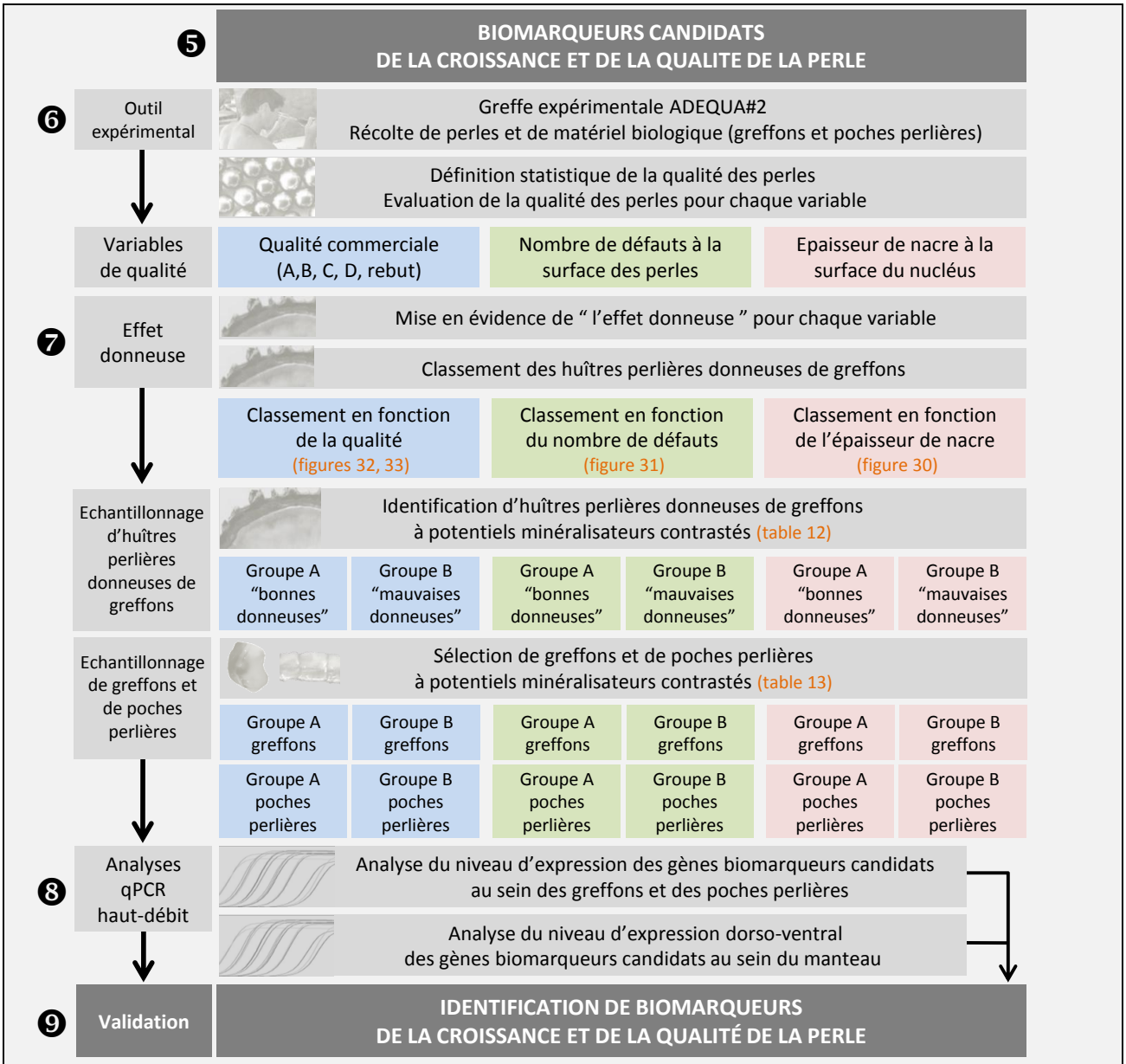

Figure 29. Objectifs et démarche mise en place pour la validation de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. La première partie de ces travaux de thèse a permis la sélection d'un ensemble de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle (❺). Afin de valider ces biomarqueurs candidat, la greffe expérimentale ADEQUA#2 a été réalisée afin de disposer de matériel biologique (greffons et poches perlières (❻). L'évaluation de la qualité des perles en fonction des différentes variables statistiques définies pour cette étude a permis de mettre en évidence un « effet donneuse » (❼). Les huîtres perlières donneuses ont ainsi fait l'objet d'une classification, permettant la constitution de groupes d'huîtres perlières donneuses, et d'échantillonnage de greffons et de poches perlières à potentiels minéralisateurs contrastés en relation avec chaque variable. Le taux d'expression des biomarqueurs candidats a ainsi été étudié par qPCR haut-débit au sein de ces échantillonnages, pour chaque variable, afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés au sein de greffons et de poches perlières à l'origine de la production de perle de qualité contrastées (❽). En parallèle, le niveau d'expression de ces gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau a été étudié par qPCR haut-débit afin de mettre en évidence un différentiel d'expression dorso-ventral potentiellement corrélé à la synthèse d'un type de polymorphe de carbonate de calcium donné (❽). L'analyse conjointe des analyses du niveau d'expression des gènes en corrélation avec la qualité des perles et la nature du polymorphe de carbonate de calcium potentiellement produit a permis d'identifier un ensemble de gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* (❾).

2. Greffe expérimentale ADEQUA#2 : Mise en évidence de l'effet donneuse et mise à disposition du matériel biologique pour la validation des biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera*

2.1. Résultats et statistiques de la greffe ADEQUA#2

La greffe ADEQUA#2 a été organisée dans le cadre de l'action 3 du GDR ADEQUA, intitulée « analyse du processus complet de la greffe, du choix du greffon à la minéralisation de la perle », dont l'objectif est de décrire et de comprendre les mécanismes biologiques de la greffe et de la minéralisation de la perle. L'objectif principal de cette greffe, organisée par le laboratoire LBQP, était de récolter un ensemble d'échantillons destinés à 5 partenaires du GDR ADEQUA afin de réaliser une analyse pluridisciplinaire (approches transcriptomique, protéomique, minéralogique) et dynamique des différents compartiments de la greffe, depuis le greffon et la mise en place du sac perlier à son devenir au cours de la greffe et son implication dans la minéralisation et la qualité des perles. Quarante huîtres perlières donneuses ont ainsi été utilisées pour greffer 1978 huîtres perlières receveuses avec des greffons de hauteur de découpe standard (greffons « afa/afa » découpés de part et d'autre de la ligne colorée). La greffe ADEQUA#2 s'est achevée après 18 mois de culture et a fait l'objet de 9 points de prélèvements de matériel biologique (greffons à J0, et poches perlières et perles à 1 jour, 7 jours, 21 jours, 2 mois, 3 mois, 6 mois, 12 mois et 18 mois). Les principales données concernant cette greffe sont les suivantes : Sur 1978 huîtres perlières greffées, 339 (17.14%) sont mortes ou ont disparu, 1358 (68.7%) ont maintenu leurs nucléus et ont été récoltées aux différents points de prélèvement précédemment cités (table 10).

Table 10. Statistiques de la greffe ADEQUA#2

Résultats de la greffe ADEQUA#2	Valeurs	% par rapport aux huîtres greffées	% par rapport aux huîtres checkées
Nombre d'huîtres greffées	1978	100%	-
Nombre d'huîtres checkées vivantes	1639	82,9%	100%
- Nombre de rejets (nucleus)	281	**14,3%**	17,1%
- Nombre de maintien de nucleus	**1358**	**68 ,7%**	82,5%
○ Nombre total de perles récoltées	**725**	-	-
○ Nombre de perles récoltées à 2 mois	104	-	-
○ Nombre de perles récoltées à 3 mois	80	-	-
○ Nombre de perles récoltées à 6 mois	79	-	-
○ Nombre de perles récoltées à 12 mois	96	-	-
○ Nombre de perles récoltées à 18 mois	**366**	-	-
Nombre d'huîtres mortes	309	15,6%	18,9%
Nombre d'huîtres disparues (prédation)	30	1,5%	1,8%

En fonction de la durée de culture, les perles récoltées sont considérées comme des nucléus faiblement ou non recouvert de nacre pour les points de prélèvement les plus précoces (1 jour, 7 jours, 21 jours), ou comme de véritables perles pour les points de récolte les plus tardifs (2 mois, 3 mois, 6 mois, 12 mois et 18 mois). La récolte des 1358 huîtres perlières receveuses ayant retenu leur nucléus a permis d'obtenir 725 perles (table 10).

2.2. Mise en évidence d'un effet donneuse chez *P. margaritifera*

Nous avons défini « l'effet donneuse » comme l'influence d'une huître perlière donneuse de greffons sur la qualité et les caractéristiques des perles récoltées issues de cette greffe. Bien que la qualité d'une perle soit également dépendante d'autres paramètres (qualité de l'acte de greffe, conditions environnementales …), l'effet donneuse implique que la qualité des perles récoltées dépendra en majeure partie de la capacité biominéralisatrice de l'huître perlière donneuse de greffons. Une contribution de l'impact de l'huître perlière donneuse de greffons sur la qualité des perles produites est en effet fortement supposée de façon empirique. Un effet donneuse sur la couleur et le lustre des perles a notamment été illustré chez *P. fucata* (Wada and Komaru, 1996) et observé au laboratoire lors de greffes précédentes. La confirmation statistique d'un effet donneuse chez *P. margaritifera* a donc consisté en la comparaison de la qualité et des caractéristiques des perles produites en fonction de la donneuse à l'origine des greffons au cours de la greffe ADEQUA#2.

2.2.1. Définition statistique de la qualité de la perle

La qualité de la perle s'établit selon des critères généraux que sont la taille, le poids, la forme et qualité de surface, ainsi qu'en fonction d'un critère additionnel de couleur. L'évaluation commune des ces différents critères permet de codifier la qualité de la perle en 5 catégories : A, B, C, D et rebut, selon la classification établie par le Service de la Perliculture (Table 1). Dans le cadre de ces travaux, les paramètres de qualité et de croissance des perles ont été décomposés en trois variables afin de pouvoir étudier plus finement la relation qui existe entre l'expression d'un gène biomarqueur et l'observation de ces variables concourant à l'obtention d'une perle de qualité :

- Variable « **Epaisseur de nacre à la surface du nucléus** » : codifiée par la classification quantitative des perles par la détermination de l'épaisseur minimale de nacre présente à la surface du nucléus.
- Variable « **Nombre de défauts à la surface des perles** » : codifiée par la classification qualitative des perles en 4 classes de qualité en fonction du nombre de défauts observés à leur surface (perles sans défaut, perles avec 1 à 5 défauts, perles avec plus que 5 défauts et perles complètement recouvertes de défauts).
- Variable « **Qualité commerciale** » : codifiée par la classification qualitative des perles en 5 classes (A, B, C, D et rebut), réalisée à la fois par le Service de la Perliculture et par un professionnel (Manapearl, Papeete).

2.2.2. Classement des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de leur potentiel minéralisateur

Afin de mettre en évidence l'effet donneuse, le potentiel de chaque huître perlière donneuse de greffons a été quantifié par l'attribution d'une note (valeur quantitative numérique unique) basée sur l'évaluation de la qualité des perles récoltées pour chacune de ces 3 variables (table 11). Afin de disposer d'un nombre de perles par huître perlière donneuse suffisant pour des analyses statistiques d'une part, et afin de disposer de perles dont les caractéristiques se rapprochent le plus possible de celles des perles commercialisables d'autre part, la mise en évidence de l'effet donneuse n'a été réalisée qu'à partir des 366 perles récoltées à 18 mois d'élevage (table 10). Pour la variable « Epaisseur de nacre à la surface du nucléus », la note de l'huître perlière donneuse correspond à la moyenne des épaisseurs des perles récoltées par donneuse. Pour les variables « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale », du fait de la codification qualitative dont elles ont fait l'objet, une note a dans un premier temps été attribuée à chaque perle en fonction de la classe à laquelle elle appartient. La note de chaque huître perlière donneuse correspond alors à la moyenne des notes des perles récoltées par donneuse. L'attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse pour chacune de ces 3 variables a ainsi permis d'établir leur classement par ordre croissant de qualité.

Table 11. Démarche de classement des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de la qualité des perles récoltées pour la mise en évidence de l'effet donneuse chez *P. margaritifera*

ETAPE 1	Définition de 3 variables de croissance et de qualité des perles	Epaisseur de nacre à la surface du nucléus	Nombres de défauts à la surface de la perle	Qualité commerciale
ETAPE 2	Evaluation des caractéristiques des perles pour chaque variable	Détermination de l'épaisseur minimale de nacre présente à la surface du nucléus	Classification des perles au sein de 4 classes (perles sans défaut, perles avec 1 à 5 défauts, perles avec plus que 5 défauts et perles complètement recouvertes de défauts)	Classification des perles au sein de 5 classes (A, B, C, D et rebut)
ETAPE 3	Attribution d'une note à chaque perle en fonction de chaque variable	Note : Epaisseur de nacre à la surface de la perle	Note codée en fonction de la classe de la perle	Note codée en fonction de la classe de la perle
ETAPE 4	Attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse de greffons en fonction de chaque variable	Note : moyenne des épaisseurs des perles récoltées par huître perlière donneuse de greffons	Note : moyenne des notes des perles récoltées par huître perlière donneuse de greffons	Note : moyenne des notes des perles récoltées par huître perlière donneuse de greffons
ETAPE 5	Classification des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de chaque variable	Classification des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de la variable « Epaisseur »	Classification des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de la variable « Nombres de défauts »	Classification des huîtres perlières donneuses de greffons en fonction de la variable « Qualité »

2.2.3. Mise en évidence statistique de l'effet donneuse

Le classement des huîtres perlières donneuses par ordre croissant de qualité a permis de constater une forte variabilité de la qualité moyenne des perles produites en fonction de la donneuse à l'origine des greffons, et ce pour chacune des variables étudiées : « Epaisseur de nacre à la surface du nucléus » (figure 30), « Nombre de défauts à la surface des perles » (figure 31) et « Qualité commerciale » évaluée par le Service de la Perliculture (figure 32) et par un professionnel (figure 33). En effet, en fonction de l'huître perlière donneuse, l'épaisseur de nacre moyenne observée à la surface des nucléus varie entre 0.69 mm et 1.58 mm. La production de perles ne présentant aucun défaut de surface varie entre 0% et 20% en fonction des huîtres perlières donneuses. De même, la production de perles de qualité A varie entre 0% et 33% en fonction des huîtres perlières donneuses, avec une valeur extrême à plus de 66 % (dû au faible nombre de perles récoltées pour cette donneuse). De plus, Les résultats montrent une certaine homogénéité des observations pour une même huître perlière donneuse, et ce pour chaque variable. La dispersion des mesures semble donc plus importante à un niveau inter-donneuse qu'à un niveau intra-donneuse.

Afin de confirmer statistiquement ces observations, un test non paramétrique de Kruskall-Wallis a été réalisé. L'objectif de ce test est de comparer les huîtres perlières donneuses entre elles afin de déterminer si l'ensemble des individus doit être considéré comme issu de la même population d'origine (huître perlières donneuses identiques entre elles par rapport aux variables observées), ou si certains individus se différencient des autres, mettant ainsi en évidence un effet donneuse. Ce test non paramétrique a été choisi du fait du faible nombre d'observations (perles récoltées) par huîtres perlières donneuse, du grand nombre de groupes à comparer (36 huîtres perlières donneuses lors des récoltes à 18 mois) et d'une distribution des observations non-normale pour plusieurs individus pour l'ensemble des variables (test de Shapiro-Wilk, seuil α= 5%). Pour chacune des variables considérées, les tests de Kruskall-Wallis réalisés révèlent que les distributions des populations d'origine des huîtres perlières donneuses ne sont pas semblables (*p-value* < 0.0001, pour les 3 variables). Ces tests permettent donc de mettre en évidence de manière statistique un effet significatif de l'origine des greffons sur la qualité des perles produites, et confirme l'existence d'un effet donneuse pour chacune des trois variables « Epaisseur de nacre à la surface du nucléus », « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale ».

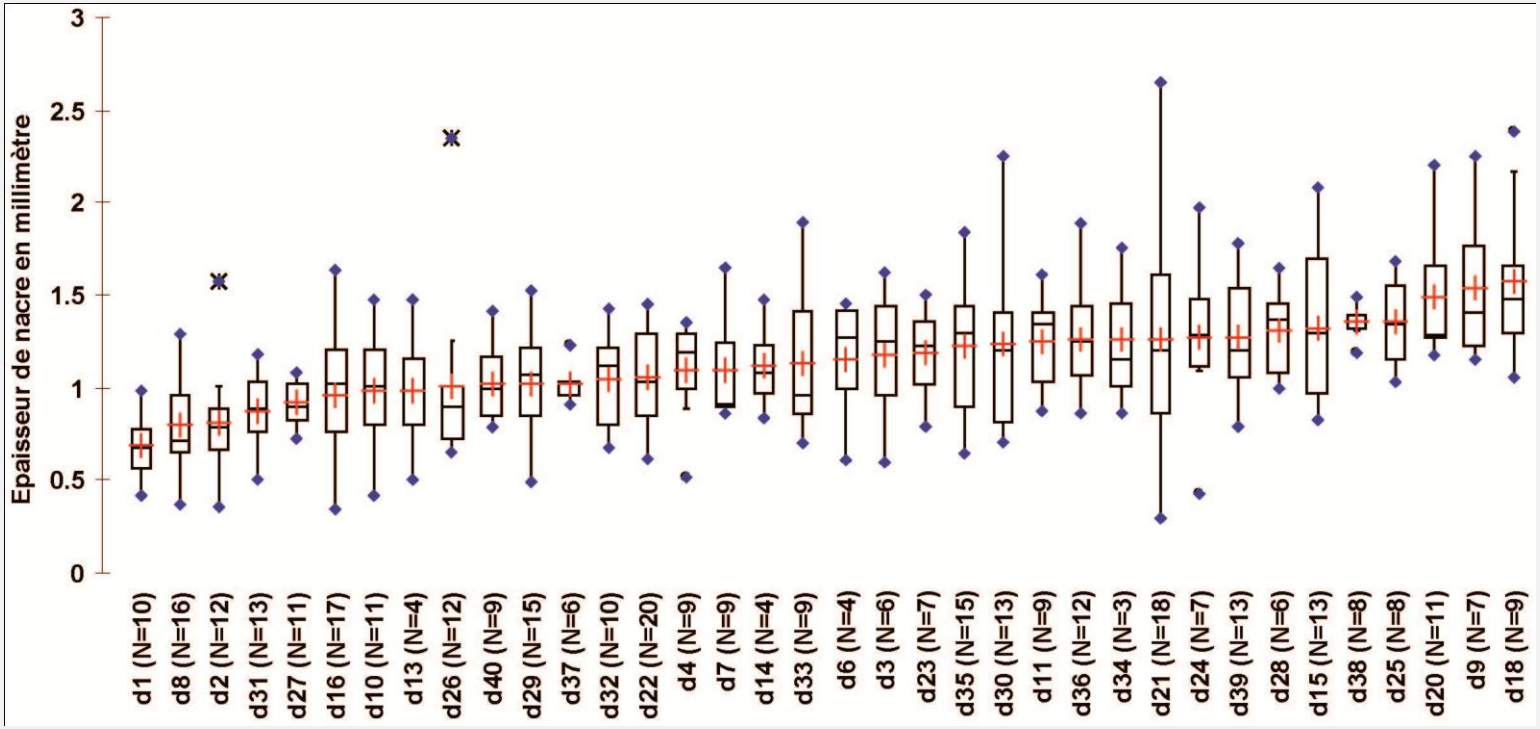

Figure 30. Épaisseur de nacre minimale mesurée à la surface du nucléus en fonction de l'huître perlière donneuse du greffon à l'origine de la perle. L'épaisseur de nacre à la surface du nucléus est obtenue par soustraction du diamètre du nucléus au plus petit diamètre mesuré de la perle. Les résultats sont présentés sous la forme de boites de Tukey (box plot): boite = observations du 1er au 3ème quartile ; barre centrale de la boite = médiane ; moustaches = valeur adjacente (extrémités des moustaches égales à la dernière valeur comprise dans l'intervalle 1.5 x l'écart interquartile) ; points bleus = extremum ; points à l'extérieurs des moustaches = mesures atypiques ; croix rouges = moyennes. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres perlières donneuses de greffons à l'origine des perles. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perles mesurées (N). Les donneuses sont classées en fonction de l'épaisseur moyenne des perles dont elles sont à l'origine, par ordre croissant.

Influence de l'huître perlière donneuse de greffons sur la production de perles à défauts.

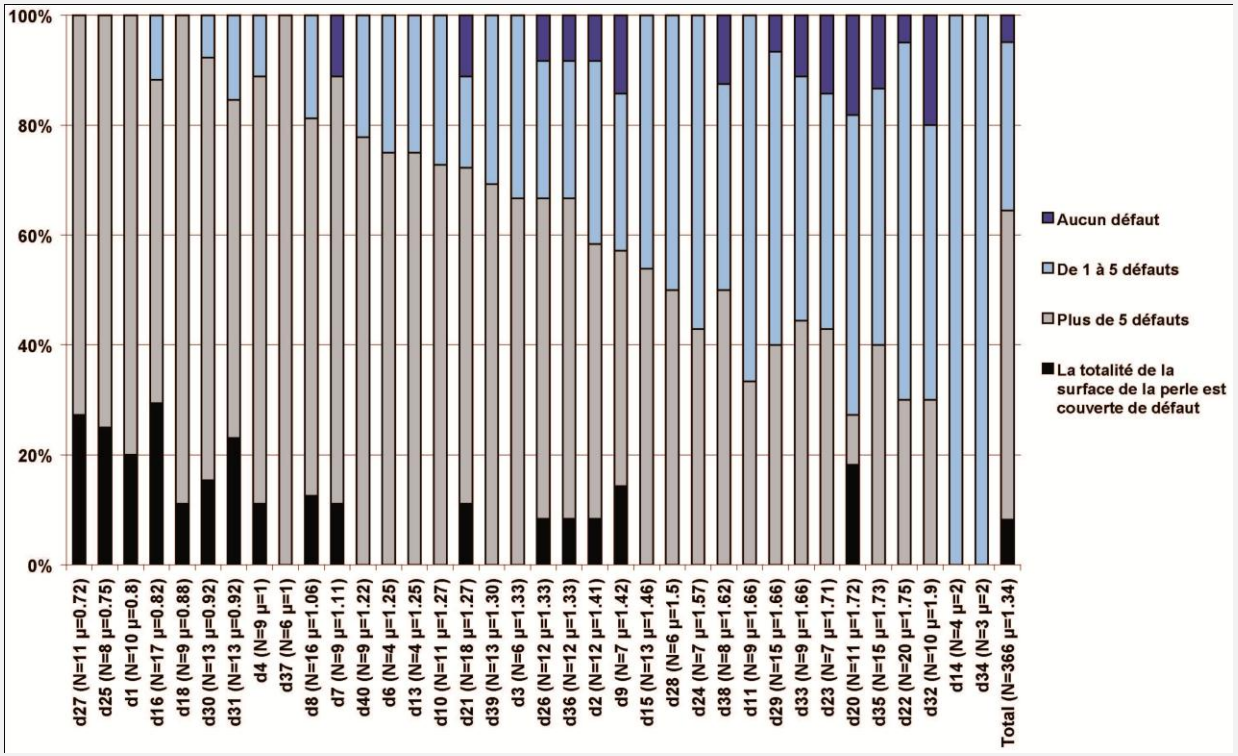

Figure 31. Proportion de perles à défauts récoltées en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons. Chaque perle récoltée à été attribuée à une classe de qualité en fonction du nombre de défauts observés à sa surface (perles sans défaut, perles avec 1 à 5 défauts, perles avec plus que 5 défauts et perles recouvertes de défauts). Dans un second temps, une note a été attribuée à chaque perle en fonction de la classe à laquelle elle appartient. Une note moyenne (µ) à été calculée pour chaque huître perlière donneuse de greffons correspondant à la moyenne des notes des perles récoltées par huître donneuse. L'attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse de greffons a permis d'établir un classement par ordre croissant de qualité. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres donneuses de greffons avec entre parenthèses le nombre de perles observées (N) et la note moyenne calculée (µ).

Influence de l'huître perlière donneuse de greffons sur la qualité des perles produites (classification Service de la perliculture).

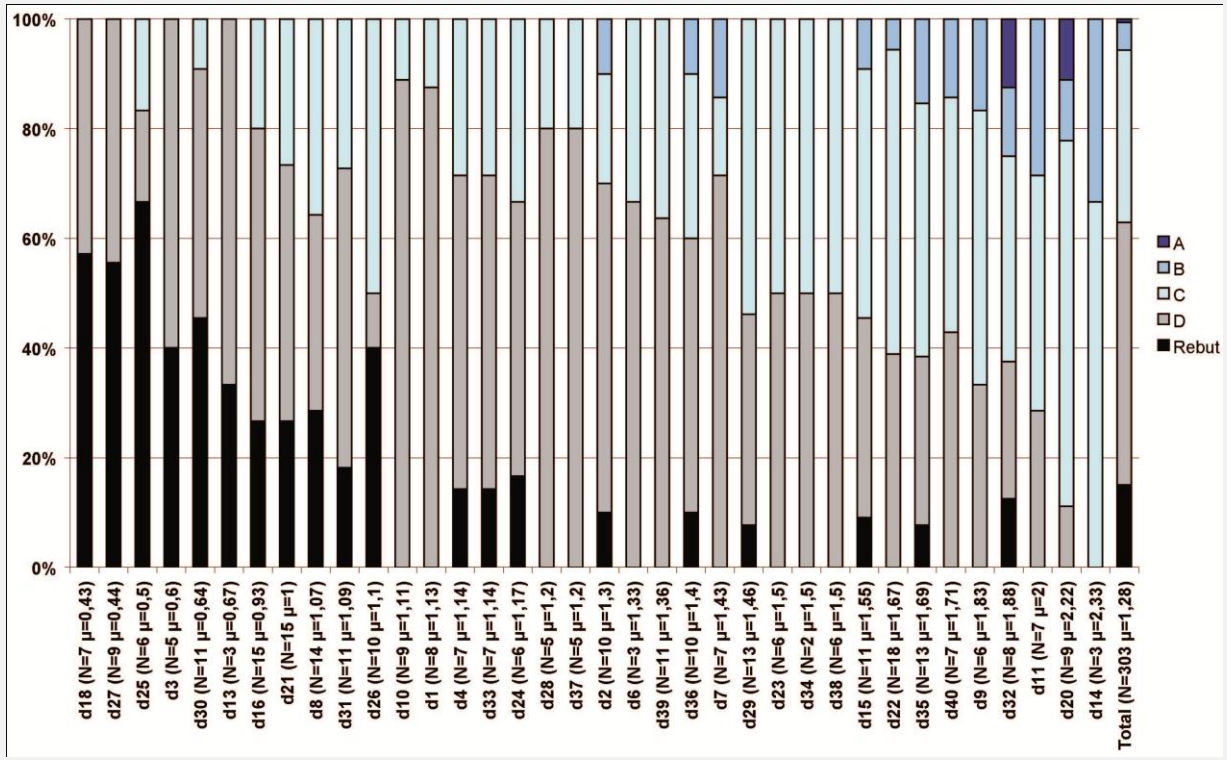

Figure 32. Proportion de perles observées par catégorie de qualité en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons dont elles sont issues (Classification Service de la Perliculture). Les perles ont été classées par le Service de la perliculture. Chaque perle récoltée à été attribuée à une classe de qualité (perles de catégorie A, B, C, D ou rebut) selon les critères établis par le Service de la Perliculture. Dans un second temps, une note a été attribuée à chaque perle en fonction de la classe à laquelle elle appartient. Une note moyenne (µ) à été calculée pour chaque huître perlière donneuse de greffons correspondant à la moyenne des notes des perles récoltées par donneuse. L'attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse de greffons a permis d'établir un classement par ordre croissant de qualité. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres perlières donneuses. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perles observées (N) et la note moyenne calculée pour la donneuse (µ).

Influence de l'huître perlière donneuse de greffons sur la qualité des perles produites (classification Manapearl).

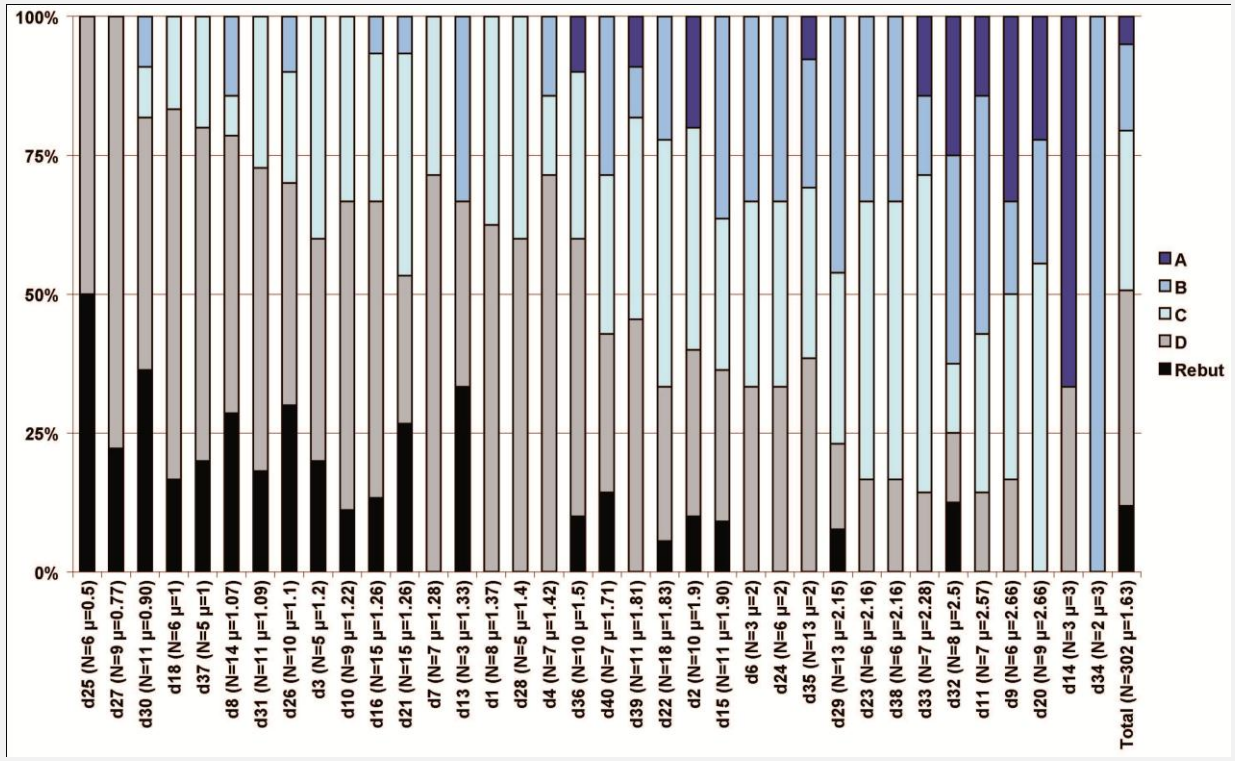

Figure 33. Proportion de perles observées par catégorie de qualité en fonction de l'huître perlière donneuse de greffons dont elles sont issues (Classification Manapearl). Les perles ont été classées par la société Manapearl. Chaque perle récoltée à été attribuée à une classe de qualité (perles de catégorie A, B, C, D ou rebut) selon les critères établis par le Service de la Perliculture. Une note a été attribuée à chaque perle en fonction de la classe à laquelle elle appartient. Une note moyenne (µ) à été calculée pour chaque huître perlière donneuse de greffons correspondant à la moyenne des notes des perles récoltées par donneuse. L'attribution d'une note à chaque huître perlière donneuse de greffons a permis d'établir un classement par ordre croissant de qualité. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres perlières donneuses. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perles observées (N) et la note moyenne calculée pour la donneuse (µ).

3. Constitution des plans d'échantillonnages de matériel biologique pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle

L'objectif principal du développement de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle est la sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons disposant d'un fort potentiel pour la production de perles de qualité supérieure. Une des étapes pour la validation de biomarqueurs candidats consiste donc en l'identification d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels contrastés utilisées lors de la greffe ADEQUA#2, puis en la constitution de groupes d'échantillons de greffons et de poches perlières issus de ces huîtres perlières donneuses.

3.1. Identification d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels minéralisateurs contrastés

Deux groupes d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels minéralisateurs contrastés ont été créés pour chacune des variables « Epaisseur », « Qualité » et « Défaut » :

- le « **Groupe A** » correspond aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité supérieure (épaisseur de nacre importante, peu de défauts de surface ou meilleure classification de qualité).
- le « **Groupe B** » correspond aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité inférieure (épaisseur de nacre faible, beaucoup de défauts de surface ou classification de qualité médiocre).

La contrainte majeure imposée pour la construction de ces deux groupes A et B a été de composer des groupes caractérisés à la fois par un fort contraste intergroupe et une homogénéité intragroupe les plus importants possible, et ce pour chacune des variables étudiées. Ainsi, la sélection des d'huîtres perlières donneuses constituant les groupes A et B pour chaque variable à été réalisée en tenant compte des points suivants :

- Une analyse des données brutes (figures 30, 31, 32 et 33)
- Une procédure de comparaison multiple par paire de Dunn.
- Une classification ascendante hiérarchique (figures 34, 35 et 36)
- Le respect d'un nombre minimal d'observations par groupe et d'un équilibre entre le nombre d'observations au sein de ces deux groupes.

Dans un premier temps, l'observation des données brutes (figures 30, 31, 32 et 33) issues de la greffe ADEQUA#2 a permis d'identifier au sein de l'ensemble des huîtres perlières donneuses celles qui sont à l'origine des perles de meilleure ou de moins bonne qualité, en moyenne. Un classement de ces huîtres perlières donneuses en fonction de la note qui leur a été attribuée dans le cadre de la mise en évidence de l'effet donneuse a permis de sélectionner les huîtres perlières donneuses les plus extrêmes de ce classement à inclure dans les groupes A et B. Cette sélection a également pris en considération le nombre de perles récoltées par donneuse ainsi que la dispersion des mesures réalisées. Ces précautions avaient pour objectif d'exclure de la sélection les huîtres perlières donneuses dont la valeur moyenne ne serait pas réellement représentative du potentiel de production de perles de qualité en raison d'un sous effectif et/ou de l'influence d'éventuelles valeurs extrêmes.

Dans un second temps, un test statistique de comparaisons multiples par paires de Dunn permettant d'identifier les huîtres perlières à l'origine de la mise en évidence statistique de l'effet donneuse démontré précédemment a également été réalisé. L'objectif de ce test est d'identifier les huîtres perlières donneuses utilisées lors de la greffe ADEQUA#2 qui diffèrent statistiquement les unes des autres en réalisant des comparaisons deux à deux de chacun des individus. Néanmoins, l'usage des procédures de comparaisons multiples entraine une augmentation rapide du risque global de première espèce α avec le nombre de tests réalisés. Etant donné le nombre important d'huîtres perlières donneuses (et donc de paires à étudier), une correction de Bonferonni a été appliquée (seuil corrigé pour chacun des tests $\alpha = 0.01\%$) afin de conserver un risque global de première espèce inférieur à 5 %. En raison de la faible puissance du test (faible nombre de perles par donneuse, grand nombre de donneuses et correction de Bonferonni), il est difficile de détecter des différences entre les huîtres perlières donneuses. En revanche, les différences détectées seront très robustes.

Une classification ascendante hiérarchique a également été réalisée pour les variables « Qualité » (figures 34 et 35) et « Défaut » (figure 36). Cette classification permet de quantifier, à l'aide d'un indice de dissimilarité (distance du χ^2), les différences entre les huîtres perlières donneuses en prenant en considération les profils de répartition des perles au sein des différentes classes de la variable considérée. L'objectif de cette procédure est d'identifier des groupes d'huîtres perlières donneuses les plus homogènes possibles à un niveau intragroupe et les plus différents possibles à un niveau intergroupe.

Enfin, en prévision de la réalisation d'un test de Wilcoxon lors de l'analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats, il a été décidé d'imposer un nombre d'observations au sein des groupes A et B au moins égal à 4. Ce choix est motivé par le fait que la limite basse de détection d'un écart significatif entre deux échantillons est atteinte à partir de 3 observations par groupe (α = 5%).

L'analyse combinée de l'ensemble de ces différents points a permis de constituer des groupes A et B les plus homogènes possibles et les plus contrasté entre eux d'huîtres perlières donneuses de greffons pour chacune des variables considérées (table 12).

Table 12. Groupes d'huîtres perlières donneuses constitués pour la validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*

Variable	**Groupe A : Donneuses produisant en moyenne des perles de qualité ou de tailles supérieures**	**Groupe B : Donneuses produisant en moyenne des perles de qualité ou de tailles médiocres**
Epaisseur de nacre à la surface du nucléus	Donneuse n° : 18, 9, 20, 25, 38	Donneuse n° : 1, 8, 2, 27, 31
Nombre de défaut à la surface de la perle	Donneuse n° : 32, 35, 23, 33, 38	Donneuse n° : 27, 25, 1, 16, 18, 30
Classification (A, B, C, D, rebut)	Donneuse n° : 14, 20, 11, 9, 32	Donneuse n° : 18, 27, 25, 3, 30

Classification ascendante hiérarchique des huîtres donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Service de la Perliculture)

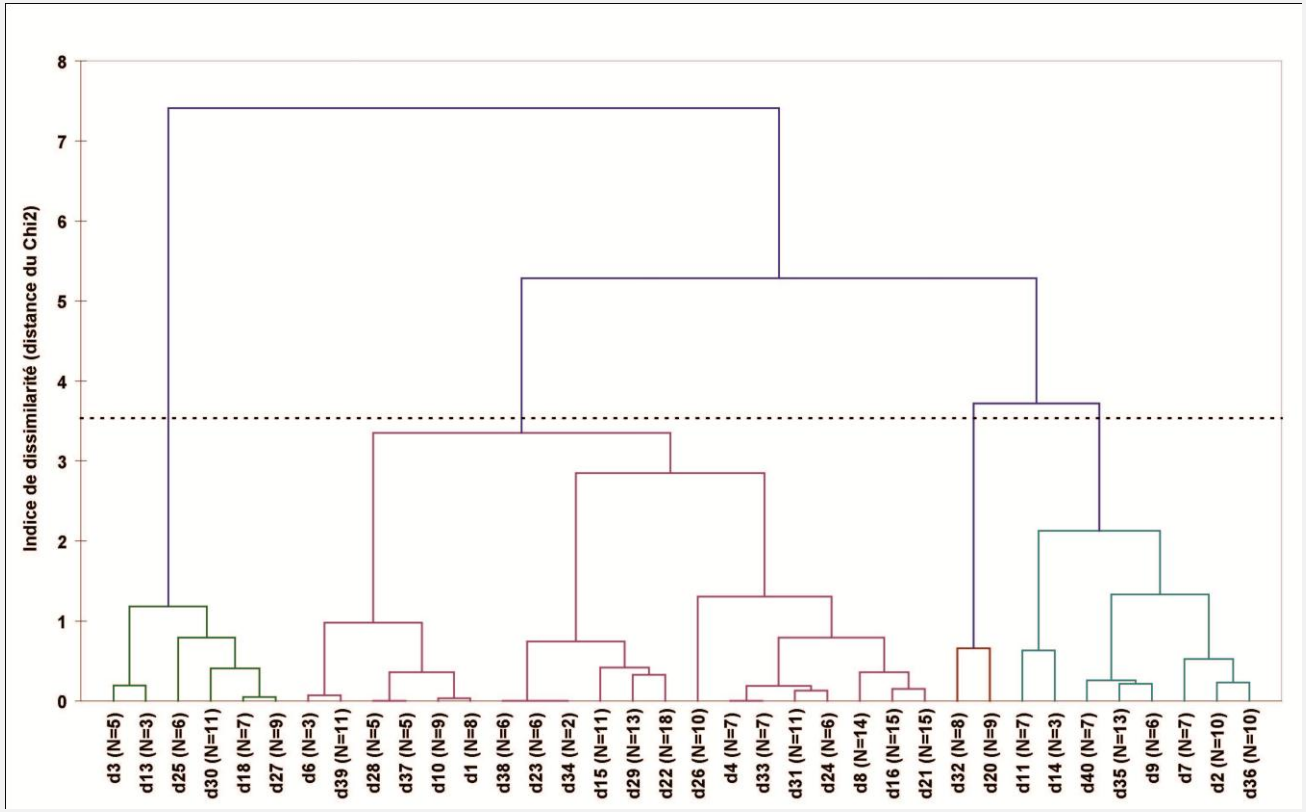

Figure 34. Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Service de la Perliculture). Les perles ont été classées par le Service de la Perliculture. Chaque perle récoltée à été attribuée à une classe de qualité (perles de catégorie A, B, C, D ou rebut) selon les critères établis par le Service de la Perliculture. Une classification ascendante hiérarchique à été réalisée à partir de cette classification. L'indice de dissimilarité utilisé pour mesurer la proximité entre les donneuses est la distance du chi2. La méthode d'agrégation retenue est la méthode de ward. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres perlières donneuses. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perles observées (N) et la note moyenne calculée pour la donneuse (µ).

Classification ascendante hiérarchique des huîtres donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Manapearl)

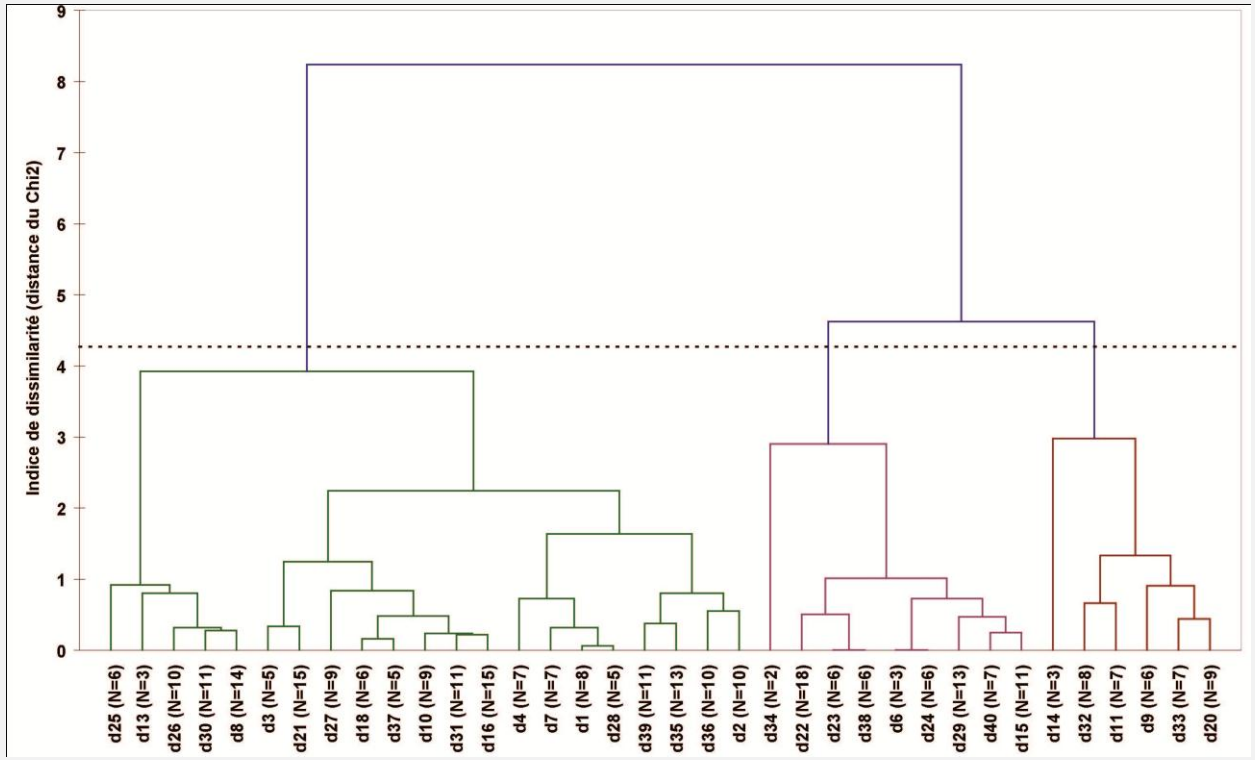

Figure 35. Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Qualité » (classification Manapearl). Les perles ont été classées par un professionnel (Manapearl). Chaque perle récoltée à été attribuée à une classe de qualité (perles de catégorie A, B, C, D ou rebut) selon les critères établis par le Service de la Perliculture. Une classification ascendante hiérarchique à été réalisée à partir de cette classification. L'indice de dissimilarité utilisé pour mesurer la proximité entre les donneuses est la distance du chi2. La méthode d'agrégation retenue est la méthode de ward. En abscisse sont indiqués les numéros des huîtres perlières donneuses. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perles observées (N) et la note moyenne calculée pour la donneuse (µ).

Classification ascendante hiérarchique des huîtres donneuses de greffons selon la variable « Nombres de défauts »

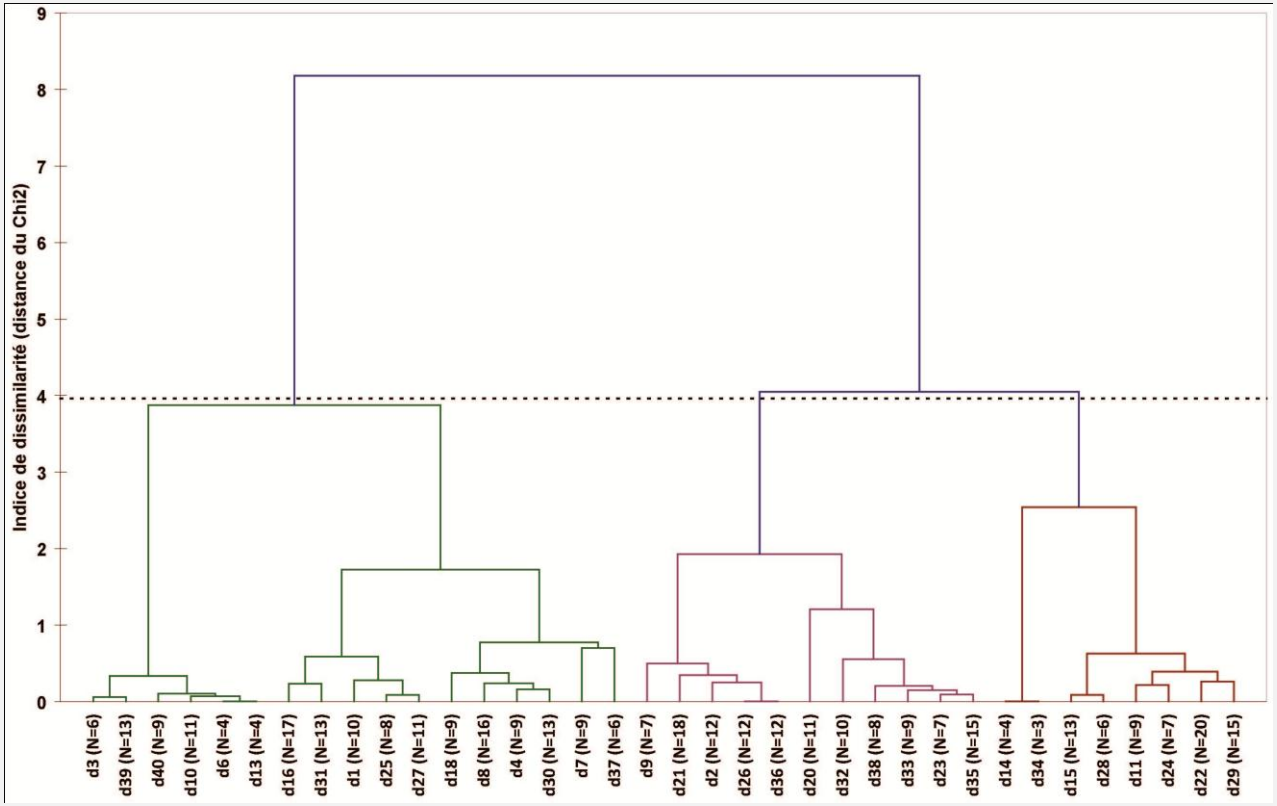

Figure 36. Classification ascendante hiérarchique des huîtres perlières donneuses de greffons selon la variable « Nombres de défauts ». Une classification ascendante hiérarchique a été réalisée à partir du nombre de perles observées dans chaque classe de défauts et par donneuse. L'indice de dissimilarité utilisé pour mesurer la proximité entre les donneuses est la distance du chi2. La méthode d'agrégation retenue est la méthode de ward. En abscisse sont indiqués les numéros des donneuses. Entre parenthèses est renseigné le nombre de perle pris en considération pour l'analyse.

3.2. Constitution d'échantillonnages de greffons et de poches perlières

La constitution des groupes A et B d'huîtres perlières donneuses de greffons a permis de définir deux plans d'échantillonnages de matériel biologique à l'origine de la production de perles contrastées, par variable, pour la validation des biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle par qPCR. Notons que pour des raisons techniques (échec d'extraction d'acides nucléiques), certains greffons (des huîtres perlières donneuses 2 et 25) ainsi que certaines poches perlières d'huîtres perlières receveuses n'ont finalement pas put être utilisés dans le cadre des analyses d'expression en qPCR. Pour chaque variable, les plans d'échantillonnages de greffons et de poches perlières sont les suivants (table 13) :

- Un **« plan d'échantillonnage de greffons »** issus des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A et B.
- Un **« plan d'échantillonnage de poches perlières »** issues de la greffe des greffons des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A et B.

Table 13. Échantillonnage de greffons et de poches perlières constitués sur la base de l'effet donneuse pour la validation des biomarqueurs candidats de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera*

variables de croissance et de qualité des perles	Constitution de groupes d'huîtres perlières sur la base de l'effet donneuse	Echantillonnages de greffons	Echantillonnages de poches perlières
Epaisseur de nacre à la surface du nucléus	« Groupe A » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles les plus épaisses	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe A » pour la variable « Epaisseur »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe A » pour la variable « Epaisseur »
	« Groupe B » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles les moins épaisses	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe B » pour la variable « Epaisseur »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe B » pour la variable « Epaisseur »
Nombres de défauts à la surface de la perle	« Groupe A » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles avec le moins de défauts de surface	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe A » pour la variable « Nombres de défauts »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe A » pour la variable « Nombres de défauts »
	« Groupe B » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles avec le plus de défauts de surface	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe B » pour la variable « Nombres de défauts »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe B » pour la variable « Nombres de défauts »
Qualité commerciale (classification Service de la Perliculture)	« Groupe A » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles de meilleure qualité	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe A » pour la variable « Qualité »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe A » pour la variable « Qualité »
	« Groupe B » : huîtres perlières donneuses ayant produit en moyenne les perles de moins bonne qualité	Greffons des huîtres perlières donneuses du « Groupe B » pour la variable « Qualité »	Poches perlières des huîtres receveuses greffées avec des greffons des huîtres perlières du « Groupe B » pour la variable « Qualité »

4. Validation de biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera*

La validation des biomarqueurs candidats consiste à corréler les profils d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation à une réalité biologique, ici la qualité des perles. Cette validation est réalisée par la méthode de quantification relative de l'expression génique de qRT-PCR (quantitative RT-PCR ou PCR en temps réel) à partir des échantillonnages de greffons et de poches perlières d'huîtres perlières donneuses et receveuses A et B sélectionnées dans le cadre de la greffe ADEQUA#2. La validation des biomarqueurs candidats a ainsi nécessité de faire un choix quant à la méthode de qPCR utilisée et a demandé la mise au point des gènes de référence utilisés dans le cadre de cette méthode. En parallèle, l'analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau a été réalisée afin de pouvoir étudier plus finement la relation entre le taux d'expression des gènes corrélés à la qualité de la perle et la nature du polymorphe de carbonate de calcium synthétisé par ces derniers.

4.1. Choix de la méthode de qPCR haut-débit et sélection de gènes biomarqueurs candidats analysés

L'exploitation des banques de données de séquences protéomiques et transcriptomiques réalisées dans le cadre des approches globales mises en place sur les tissus minéralisateurs et sur les matrices organiques des structures minéralisées chez *P. margaritifera* a permis d'identifier un ensemble de 268 gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de qualité de la perle (table 9). Afin de pouvoir étudier leur expression au sein des tissus minéralisateurs par qPCR, des amorces ont été dessinées et testées pour leur efficacité et leur spécificité pour chacun des biomarqueurs candidats. Ainsi, sur les 268 gènes identifiés, 224 couples d'amorces efficaces et spécifiques ont été mis au point (table 14).

Table 14. Sélection de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* pour leur validation en qPCR haut-débit

	Approche transcriptomique globale		Approche protéomique globale	TOTAL
	EST	SAGE	MS/MS	
Nombre de gènes biomarqueurs candidats identifiés	63	92	113	268
Nombre de gènes biomarqueurs candidats pour lesquels des couples d'amorces efficaces et spécifiques mis au point	61	66	97	224
Nombre de gènes biomarqueurs candidats sélectionnés dans le cadre de l'analyse qPCR haut-débit	58	33	97	188

Du fait du grand nombre de gènes biomarqueurs candidats analysables (224), ainsi que du large échantillonnage réalisé à partir du matériel biologique issus de la greffe ADEQUA#2, la méthode de qPCR haut-débit a été choisie pour l'analyse du taux d'expression par quantification relative des biomarqueurs candidats au sein des tissus biominéralisateurs pour leur validation en tant que biomarqueurs de la qualité et de la croissance de la perle chez *P. margaritifera*. Les systèmes de qPCR haut-débit sont récemment venus améliorer considérablement les performances offertes par la qPCR en termes de quantité de gènes et d'échantillons analysables. En effet, la qPCR haut-débit offre une capacité d'analyse de 96 gènes et 96 échantillons par plaque, soit 9216 points d'analyses en moins de 3h de réaction. Une même capacité d'analyse en qPCR « classique » correspond à la réalisation 24 plaques de 384 puits ou de 96 plaques de 96 puits. Néanmoins, cette technologie a dû attendre la mise sur le marché d'un certain nombre d'innovations techniques avant de se développer et est encore considérée comme une méthodologie nouvelle (Dube *et al.*, 2008; Spurgeon *et al.*, 2008). En revanche, elle nécessite le même travail que la qPCR « classique » de mise au point des conditions de qPCR en amont, et d'analyse d'expression relative des données en aval.

Du fait des contraintes techniques imposées par cette nouvelle technologie, deux plaques de qPCR haut-débit ont été réalisées (en duplicat), permettant d'analyser 96 gènes par plaque (2 gènes de référence et 94 gènes cibles), soit un maximum de 188 gènes biomarqueurs candidats au total. Ainsi, au sein des 224 biomarqueurs candidats analysables disponibles, Il a été décidé de sélectionner quasiment l'ensemble des gènes identifiés dans le cadre de l'approche EST et de l'approche protéomique. Cette sélection a permis d'étudier un maximum de gènes connus codant des protéines impliqués dans les processus de biominéralisation, ou de nouveaux gènes codant des protéines inconnues, mais pour lesquelles il a été démontré qu'elles étaient des composants majoritaires des structures minéralisées de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera*. Les gènes ont donc été sélectionnés de la manière suivante (table 14) :

- 58 des gènes biomarqueurs identifiés dans le cadre de l'exploitation de la banque EST de manteau
- 33 gènes biomarqueurs identifiés par l'exploitation des banques SAGE de greffons et de poches perlières
- l'ensemble des 97 gènes biomarqueurs identifiés par exploitation de la banque de peptides des structures minéralisées chez *P. margaritifera*.

4.2. Choix des gènes de références pour l'analyse qPCR des biomarqueurs candidats

Dans le but de procéder à la validation des biomarqueurs candidats au sein des tissus biominéralisateurs par qPCR, la mise au point des conditions de qPCR et du choix des gènes de référence pour la normalisation des données a été entreprise sur la base des données de la littérature d'une part et des données obtenues au cours des analyses des banques de données SAGE d'autre part. Deux des gènes les plus couramment utilisés sont les gènes codant la β-actin et la sous-unité ribosomale 18S, mais pour lesquels il a été montré que leur expression pouvait parfois varier en fonction des conditions expérimentales (Selvey *et al.,* 2001; Radonic *et al.,* 2004). Le gène codant le facteur d'élongation 1α (Ef-1α) est également un gène de référence classiquement utilisé en qRT-PCR. Il a notamment été utilisé comme gène de référence chez *P. fucata* dans le cadre d'étude de gènes codant des protéines impliquées dans la biominéralisation (Takeuchi *et al.,* 2006). Enfin, dans le cadre de l'approche SAGE, deux gènes de référence complémentaires ont été sélectionnés et appelés SAGE1 et SAGE2. Les tags correspondant à ces gènes présentent une occurrence égale dans chacune des quatre banques de données SAGE. Ils ont donc un niveau d'expression identique entre les deux zones fonctionnelles étudiées (hauteurs de découpe de greffon « 90/10 » et « 10/90 »), et ce pour les deux types de tissus minéralisateurs (greffons et poches perlières).

Une série de sept couples d'amorces a donc été dessinée pour ces cinq gènes: β-actine, 18S, Ef-1α, SAGE1 et SAGE2 (table 15), pour lesquels l'efficacité d'amplification, la spécificité d'hybridation et la stabilité ont été testées. L'efficacité (E) de chaque couple d'amorce a été calculée à partir des pentes des courbes standard, avec un optimum fixé entre 2.089 > E > 1.90 (soit 90% < E < 110%). Les efficacités obtenues sont optimales pour l'ensemble des couples d'amorces testés, sauf pour le gène SAGE2 dont l'efficacité est légèrement supérieure à 2,089 (table 15). Néanmoins, puisqu'il existe aujourd'hui des méthodes statistiques de calculs de quantification relative tenant compte de l'efficacité réelle des amorces (Schefe *et al.,* 2006; Yuan *et al.,* 2006), l'ensemble de ces couples d'amorces est susceptible d'être utilisé. La spécificité des amorces a par ailleurs été évaluée par l'analyse de la courbe de dissociation (« melting curve »), générée à la des cycles fin de qPCR. Aucune courbe de dissociation ne révèle l'existence d'une amplification aspécifique, à l'exception de celle du couple 18S1. Ce couple d'amorces aspécifique a donc été éliminé de la suite des analyses.

Table 15. Analyse de la variabilité de l'expression des gènes de références en fonction des hauteurs de découpe de greffons et en fonction de la variabilité individuelle

Couple d'amorces	18S1	18S2	18S3	Actin	Ef1 α	SAGE1	SAGE2
Efficacité	2,056	1,967	2,089	2,07	2,018	1,977	2,163
Spécificité	non	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Gènes les plus stables en fonction des quatre hauteurs de découpe « Bourrelet », « Central », « 90/10 » et « 10/90 »		x	x			x	
Gènes les plus stables en fonction des deux hauteurs de découpe « Bourrelet », « Central »			x		x	x	
Gènes les plus stables en fonction des deux hauteurs de découpe « 90/10 » et « 10/90 »			x		x	x	
Gènes les plus stables en fonction des individus (n=5)			x		x	x	

Les cases marquées d'une croix correspondent aux gènes les plus stables sélectionnés par le logiciel GeNorm pour la condition étudiée. La case d'un fond vert correspond au gène le plus stable parmi les trois gènes sélectionnés par GeNorm pour une condition donnée. La case d'un fond rose correspond au gène le moins stable parmi les trois gènes sélectionnés par GeNorm pour une condition donnée.

Enfin, la variabilité de l'expression de ces gènes a été étudiée afin de sélectionner les gènes de références les plus stables possibles en fonction des conditions expérimentales en rapport avec nos questions biologiques. Cette variabilité a été évaluée en termes de variabilité individuelle chez cinq individus et en fonction de différentes hauteurs de découpe des greffons (« Bourrelet », « Central », « 90/10 » et « 10/90 ») (figure 27), à l'aide du logiciel GeNorm (Vandesompele *et al.,* 2002). Ce logiciel permet d'identifier, parmi un panel de gènes testés, une combinaison de trois gènes de références stables et appropriés aux conditions expérimentales étudiées. Parmi les 6 couples d'amorces spécifiques identifiés, les trois couples les plus stables retenus pour servir de gènes de référence dans le cadre des expériences de qRT-PCR de validation des biomarqueurs correspondent aux gènes SAGE1, Ef-1α et 18S (couple 18S3) (table 15).

4.3. Analyse de l'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau de *P. margaritifera* par qPCR haut débit

4.3.1. Contexte et démarche

Les résultats obtenus dans le cadre de l'approche protéomique globale sur les structures minéralisées chez *P. margaritifera* ont montré qu'il n'y avait pas de protéine « majoritaire » commune entre la nacre et les prismes de la coquille chez *P. margaritifera*, et que les protéines impliquées dans les processus de biominéralisation ont une localisation spécifique à un type de carbonate de calcium donné. L'origine biologique de cette répartition bien spécifique des protéines peut être recherchée au sein de l'activité biominéralisatrice du manteau, pour laquelle il a été montré que les gènes exprimés dans la zone dorsale étaient associés à la synthèse de la structure nacrée de la coquille, et que les gènes exprimés dans la zone ventrale étaient associés à la synthèse de la structure prismatique de la coquille. Dans ce contexte, une analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau a été réalisée afin de mettre en évidence un potentiel différentiel d'expression dorso-ventral corrélé à la synthèse d'un type de polymorphe de carbonate de calcium donné.

Le taux d'expression des 188 gènes biomarqueurs candidats sélectionnés a donc été étudié par qPCR haut-débit au sein du manteau de *P. margaritifera*. Deux types d'échantillonnage de manteau ont été réalisés (à partir de 3 pools de 10 individus différents pour chaque échantillonnage): un échantillonnage « Manteau total » couvrant l'ensemble de la zone dorso-ventrale du manteau et un échantillonnage « Bourrelet » restreint à la zone ventrale du manteau (figure 5 et 13). La comparaison de ces deux types d'échantillonnages en qPCR permet de déterminer s'il

existe un différentiel d'expression dorso-ventral du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau. Une surexpression des gènes au sein de l'échantillon « Bourrelet » indique une surexpression des gènes dans la zone ventrale du manteau, et une surexpression des gènes au sein de l'échantillon « Manteau total » indique une surexpression des gènes dans la zone dorsale du manteau. Les niveaux d'expression des gènes ont été déterminés au sein des échantillons par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). En biologie, sont traditionnellement considérés comme différentiellement exprimés des gènes dont le différentiel d'expression est supérieur ou égal à 2, ce qui signifie qu'un gène est au moins deux fois surexprimé dans une condition par rapport à une autre.

4.3.2. Mise en évidence d'un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs candidats

Les analyses des qPCR réalisées montrent que sur les 188 gènes biomarqueurs candidats étudiés, 106 présentent une expression différentielle entre les deux échantillonnages de manteau réalisés, dont 67 gènes sont surexprimés au moins deux fois dans la zone ventrale (« Bourrelet »), et 39 gènes sont surexprimés au moins deux fois dans la zone dorsale (Table 16). Sur les 106 gènes différentiellement exprimés entre les zones dorsale et ventrale du manteau, 30 sont issus de l'exploitation de la banque EST de manteau, 10 sont issus de l'exploitation des banques SAGE de greffons et de poches perlières et 66 sont issus de l'approche protéomique globale réalisée sur les structures minéralisées (Table 16).

Table 16. Différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*

	Approche transcriptomique EST	Approche transcriptomique SAGE	Approche protéomique	TOTAL
Nombre de gènes biomarqueurs candidats	58	33	97	188
Nombre de gènes biomarqueurs candidats surexprimés dans la zone ventrale (« Bourrelet »)	20	5	42	**67**
Nombre de gènes biomarqueurs candidats surexprimés dans la zone dorsale	10	5	24	**39**
Nombre de gènes biomarqueurs candidats différentiellement exprimés	30	10	66	**106**

Différentiel d'expression dorso-ventral des gènes biomarqueurs candidats issus de l'exploitation de la banque EST :

Sur les 30 gènes différentiellement exprimés issus de l'exploitation de la banque EST, 10 gènes sont surexprimés dans la zone dorsale et 20 gènes sont surexprimés la zone ventrale (« Bourrelet »).

- Parmi les gènes surexprimés dans la zone dorsale du manteau se trouvent les gènes homologues à ceux codant les protéines MSI60 (Sudo *et al.,* 1997), N19 (Yano *et al.,* 2007), PIF (Suzuki *et al.,* 2009) chez *P. fucata*, ainsi que les gènes codant les protéines *Pmarg*-Pearlin (Montagnani *et al.,* 2011) et MRNP34 (Marie *et al.,* 2011) préalablement identifiés chez *P. margaritifera*. Le gène le plus surexprimé dans cette condition est le gène homologue à celui codant la Mucoperlin, une protéine identifiée chez le bivalve *P. nobilis* (Marin *et al.,* 2000). Ces protéines ont toutes été identifiées comme étant des constituants de la nacre de la coquille de ces bivalves. Ces résultats sont donc en accord avec ceux décris dans la littérature.

- Parmi les gènes surexprimés dans la zone ventrale du manteau se trouvent les gènes homologues à ceux codant les protéines Prismalin-14 (Suzuki *et al.,* 2004), l'Aspein ou les proteines Asprich (Gotliv *et al.,* 2005), et certaines Shematrin (Yano *et al.,* 2006) connues chez *P. fucata* ou le bivalve *A. rigida*. Ces protéines ont toutes été identifiées comme étant des constituants des prismes de la coquille de ces bivalves, ou issues de la traduction de transcrits exprimés dans la zone ventrale du manteau. Ces résultats sont donc également en accord avec ceux décrits dans la littérature. Le gène homologue à celui codant la protéine Mantle-protein 10 est également surexprimé dans les bourrelets. Bien que les Mantle-protein n'aient pas fait l'objet d'une publication, la mantle-protein 10 a été identifiée comme étant un des constituants majeurs de la structure prismatique de la coquille de *P. margaritifera* par l'approche protéomique globale (Table 5).

Différentiel d'expression dorso-ventral des gènes biomarqueurs candidats issus de l'exploitation des banques SAGE :

Sur les 10 gènes différentiellement exprimés issus de l'exploitation des banques SAGE de greffons et de poches perlières, 5 gènes sont surexprimés dans la zone dorsale et 5 gènes sont surexprimés dans la zone ventrale (« Bourrelet »). Ces gènes, comme leurs protéines déduites, ne présentent pas d'homologie avec des séquences connues impliquées dans les processus de biominéralisation. Il est donc impossible de relier le niveau d'expression différentiel de ces protéines à un rôle ou une activité précise dans les processus de biominéralisation. En revanche il est intéressant de comparer ce niveau d'expression différentiel aux valeurs des occurrences des tags au sein des banques SAGE de greffons et de poches perlières à partir desquels ces gènes ont été identifiés (Table 17).

Table 17. Occurrences des tags au sein des banques SAGE des gènes biomarqueurs candidats présentant un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau

Gènes biomarqueurs candidats	Zone d'induction	Niveau d'induction	Occurrences banques de greffons		Sens d'induction attendu	Occurrences banques de poches perlières		Sens d'induction attendu
			90/10	10/90		90/10	10/90	
2	Zone ventrale « Bourrelet »	3,6	**49**	14	**Oui**	**3**	1	**Oui**
17		2,3	**18**	4	**Oui**	**10**	1	**Oui**
24		2,1	5	**15**	Non	6	**27**	Non
59		2,4	**33**	5	**Oui**	**7**	6	**Oui**
73		2,8	**50**	23	**Oui**	**183**	1	**Oui**
30	Zone dorsale	15,4	11	**33**	**Oui**	0	**7**	**Oui**
57		37,9	**111**	14	Non	1	**9**	**Oui**
78		20,4	8538	**9041**	**Oui**	3	**3225**	**Oui**
80		46,5	1206	**1527**	**Oui**	0	**250**	**Oui**
81		9,2	**1351**	77	Non	0	**228**	**Oui**

- Sur les 5 gènes surexprimés dans la zone ventrale du manteau (« Bourrelet »), 4 sont issus de tags surexprimés au sein des banques de greffons de hauteur de découpe « 90/10 » et au sein des poches perlières issues de ce type de greffons (Table 17). La hauteur de découpe « 90/10 » est celle qui se rapproche le plus de la hauteur de découpe de greffon de type « Bourrelet », et le sens du niveau d'induction différentiel obtenu en qPCR (à l'exception du gène 24) est en accord avec celui observé au sein des banque SAGE de greffons et de poches perlières.

- Sur les 5 gènes surexprimés dans la zone dorsale du manteau, seulement 3 sont issus de tags surexprimés au sein des banques de greffons de hauteur de découpe « 10/90 » (Table 17). En revanche, ces 5 gènes correspondent à des tags tous très fortement surexprimés au sein des banques de poches perlières de hauteur de découpe « 10/90 ». La hauteur de découpe « 10/90 » correspondant à la zone dorsale du manteau, et le sens du niveau d'induction différentiel obtenu en qPCR est également en accord avec celui observé au sein des banque SAGE de poches perlières.

Ainsi, le sens du différentiel d'expression dorso-ventral des gènes biomarqueurs candidats déterminés par qPCR au sein du manteau sont corrélés aux niveaux d'induction différentiels des gènes observés *in silico* au sein des banques SAGE, à la fois de greffons et de poches perlières (Table 17). Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs de qualité et de la croissance de la perle, ces résultats soulignent donc la valeur potentiellement prédictive des taux d'induction des gènes observés en qPCR au sein du manteau sur les taux d'induction observés au sein des poches, rendant ainsi les observations réalisées au sein du manteau transposables à la notion de qualité de la perle.

Différentiel d'expression dorso-ventral des gènes issus de l'approche protéomique :

Sur les 66 gènes différentiellement exprimés au sein du manteau issus de l'exploitation de l'approche protéomique globale réalisée sur les structures minéralisées chez *P. margaritifera*, 24 gènes sont surexprimés dans la zone dorsale et 42 gènes sont surexprimés dans la zone ventrale (« Bourrelet ») (Table 18). Ces gènes sont inconnus dans les banques de données, mais codent des protéines dont certaines séquences présentent des motifs d'intérêts pour les processus de biominéralisation (sites catalytiques, motifs répétés …).

- Sur les 42 gènes surexprimés dans la zone ventrale du manteau (« Bourrelets ») :
  - 33 gènes codent des protéines composant spécifiquement la structure prismatique de la coquille
  - 7 gènes codent des protéines identifiées sur les premières couches déposées à la surface du nucléus
  - 1 gène code une protéine identifiée à la fois au sein de la structure prismatique et sur premières couches déposées à la surface du nucléus
  - 1 gène code une protéine identifiée à la fois au sein de la nacre des perles et sur premières couches déposées à la surface du nucléus.
- Sur les 24 gènes surexprimés dans la zone dorsale du manteau :
  - 12 gènes codent des protéines composant les structures nacrées de la coquille et de la perle
  - 11 codent des protéines composant spécifiquement la nacre de la coquille
  - 1 gène code une protéine identifiée à la fois au sein de la nacre des perles et des prismes de coquille.

Table 18. Localisation des peptides codés par des gènes biomarqueurs candidats présentant un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau de *P. margaritifera*

	Nombre de séquences TOTAL	Nombre de séquences	Localisation des peptides			
			Nacre des perles	Nacre de coquille	Surface du nucléus	Prismes de coquille
Gènes surexprimés dans la zone ventrale (« Bourrelet »)	42	33				x
		7			x	
		1			x	x
		1	x		x	
Gènes surexprimés dans la zone dorsale	24	12	x	x		
		11	x			
		1	x			x
Nombre de gènes différentiellement exprimés	66					

Les cases marquées d'une croix rouge sur fond rose correspondent à la localisation majoritaire des peptides codés par les gènes surexprimés au sein des zones dorsale ou ventrale du manteau.

Ces résultats permettent de faire le lien entre la présence d'un transcrit d'un gène au sein du manteau et la présence d'une protéine au sein de ces structures minéralisées. De plus, ils confirment l'existence d'une zonation fonctionnelle dorso-ventrale au sein du manteau chez *P. margaritifera*, puisque la quasi-totalité des gènes surexprimés dans la zone ventrale (« Bourrelet ») du manteau codent des protéines constituant les structures prismatiques de la coquille, et la quasi-totalité des gènes surexprimés dans la zone dorsale du manteau codent des protéines constituant les structures nacrées de la perle et de la coquille. Certains travaux avaient déjà mis en évidence l'existence d'une zonation dorso-ventrale de l'expression des gènes au sein du manteau (Suzuki *et al.,* 2004) (Takeuchi *et al.,* 2006; Zhang *et al.,* 2006), ou relié la présence d'un transcrit au sein du manteau à la présence de la protéine correspondante au sein de la coquille (Joubert *et al.,* 2010; Takagi and Miyashita, 2010; Berland *et al.,* 2011; Marie *et al.,* 2011; Montagnani *et al.,* 2011). Néanmoins, les travaux qui viennent d'être décris ici sont les premiers qui mettent conjointement en évidence le lien entre la présence d'un transcrit au sein du manteau et la présence de la protéine au sein de la coquille et de la perle, en correspondance directe avec une zonation fonctionnelle dorso-ventrale associée à la synthèse d'un type de polymorphe de carbonate de calcium particulier (calcite ou aragonite), et ce pour un grand nombre de gènes inconnus simultanément. Ces travaux font aujourd'hui l'objet d'une publication en cours de rédaction.

4.4. Validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* par qPCR haut débit :

La validation des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle a été entreprise par qPCR haut-débit. Le niveau d'expression des 188 biomarqueurs candidat a été mesuré sur les greffons et les poches perlières des deux plans d'échantillonnage constitués sur la base de l'effet donneuse (voir paragraphe 3) :

- Un plan d'échantillonnage de greffons issus des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A (donneuses de capacités minéralisatrices supérieures) et B (donneuses de capacités minéralisatrices inférieures).
- Un plan d'échantillonnage de poches perlières issues de la greffe des greffons des huîtres perlières donneuses constituant les groupes A (donneuses de capacités minéralisatrices supérieures) et B (donneuses de capacités minéralisatrices inférieures).

Les niveaux d'expression des gènes ont été déterminés pour les échantillonnages de greffons et de poches perlières du groupe A par rapport au groupe B par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). L'application de cette méthode permet de calculer un « fold » qui doit être interprété comme un niveau d'expression relatif des gènes des échantillons du groupe A par rapport à ceux du groupe B. Les gènes seront considérés différentiellement exprimés entre les conditions A et B si le « fold » calculé entre ces deux conditions est supérieur ou égal à 2.

De plus, un test non paramétrique de Wilcoxon à été réalisé sur les données de qPCR afin de s'assurer que les folds (rapports de niveaux d'expression des gènes) entre les deux groupes d'échantillons A et B sont significativement différents. Il est néanmoins important de noter que le nombre relativement faible de mesures du niveau d'expression des gènes réalisées pour les groupes A et B (en particulier pour le plan d'échantillonnage « greffons ») entraine une réduction de la puissance du test. Ce test est donc essentiellement réalisé à titre indicatif. Un test de Wilcoxon significatif (wilcoxon pVal<0,05) indiquera que le différentiel d'expression observé entre les groupes A et B est particulièrement robuste, mais il est également important d'indiquer qu'un test dont le résultat n'est pas significatif ne doit pas entrainer un rejet du gène biomarqueur candidat étudié.

4.4.1. Analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle au sein des échantillonnages de greffons et de poches perlières

Les résultats issus de la détermination du niveau d'expression des 188 gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle au sein des greffons et des poches perlières ont été mis en parallèle avec ceux obtenus dans le cadre de la détermination du niveau d'expression dorso-ventral au sein du manteau de *P. margaritifera*. Cette comparaison a permis l'analyse simultanée d'un différentiel d'expression au sein des tissus minéralisateurs de la perle d'une part et de l'impact de la hauteur de découpe de greffon d'autre part, en relation directe avec la qualité des perles récoltées. Une synthèse de ces résultats (pour un seuil de niveau d'expression différentiel fixé à 2) est proposée dans la table 19.

Table 19. Expression des biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle identifiés chez *P. margaritifera* au sein des greffons et de poches perlières

Variable	Sens et seuil de significativité du niveau d'expression des gènes (fold ≥ 2 ; groupe A / groupe B)	Greffons			Poches perlières		
		Nombres de gènes différentiellement exprimés au sein des greffons	Gènes surexprimés dans la zone ventrale (Bourrelets)	Gènes surexprimés dans la zone dorsale	Nombres de gènes différentiellement exprimés au sein des poches perlières	Gènes surexprimés dans la zone ventrale (Bourrelets)	Gènes surexprimés dans la zone dorsale
QUALITE	Gènes surexprimés	**91**	**34**	18	4	1	0
	(wilcoxon pVal<0,05)	1	1	0	1	0	0
	Gènes sous-exprimés	9	1	1	**80**	**32**	14
	(wilcoxon pVal<0,05)	1	0	0	61	26	11
DEFAUTS	Gènes surexprimés	**28**	4	**7**	**32**	4	**12**
	(wilcoxon pVal<0,05)	1	1	0	11	0	6
	Gènes sous-exprimés	**32**	**20**	0	**53**	**26**	2
	(wilcoxon pVal<0,05)	1	0	0	9	7	0
EPAISSEUR	Gènes surexprimés	**162**	**60**	**35**	**108**	**26**	**39**
	(wilcoxon pVal<0,05)	41	18	1	87	16	36
	Gènes sous-exprimés	7	1	1	3	0	0
	(wilcoxon pVal<0,05)	0	0	0	0	0	0

Pour chacune des trois variables (« Qualité », « Défauts » et « Epaisseur »), le nombre de gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle surexprimés ou sous-exprimés au sein des échantillons de greffons et de poches perlières ayant donné des perles de qualité supérieure ont été comptabilisés. Pour chaque catégorie de gènes sur- ou sous-exprimés en fonction d'une variable sont indiqués le nombre de gènes présentant un différentiel d'expression dorso-ventral au niveau du manteau. Le nombre de gènes dont la significativité du différentiel d'expression a été vérifiée par le test de Wilcoxon est indiqué, pour chaque variable, sous les nombres de gènes sur- ou sous-exprimés.

Profils d'expression des gènes pour la variable « Qualité »

- 100 gènes sont différentiellement exprimés au sein des greffons, dont une très grande majorité (91 gènes) sont surexprimés au sein des greffons des huîtres perlières donneuses à l'origine des perles de meilleure qualité en moyenne. Parmi les 91 gènes surexprimés au sein des greffons, 52 présentent un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau, dont la majorité (34 gènes) présentent une surexpression au niveau de la zone ventrale du manteau.
- 84 gènes sont différentiellement exprimés au sein des poches perlières, dont une très grande majorité (80 gènes) sont sous-exprimés au sein des poches perlières des huîtres perlières donneuses à l'origine des perles les de meilleure qualité en moyenne. Parmi les 80 gènes sous-exprimés au sein des poches perlières, 46 présentent un différentiel d'expression dorso-ventral, dont la majorité (32 gènes) présentent une surexpression au niveau de la zone ventrale du manteau.

Concernant la variable « Qualité », il est intéressant de constater que le profil d'expression des gènes biomarqueurs candidats observé au sein des greffons est inversé par rapport à celui observé au sein des poches perlières. La variable « Qualité » correspond à la qualité commerciale des perles définie par le Service de la Perliculture, basée sur l'évaluation de plusieurs critères, tels que le lustre ou la présence de défauts, sur lesquels un grand nombre de paramètres peuvent influer. Cette influence « multi-paramètre » de la qualité peut en partie expliquer les profils d'expression de gènes variables en fonction des conditions et des tissus étudiés. De plus, il est important de rappeler que les observations des profils d'expression des gènes au sein des greffons des huîtres perlières donneuses et au sein des poches perlières des huîtres perlières receveuses sont séparées d'une période de culture des perles de 18 mois et réalisées sur des tissus très différents. Il est plus que probable que pendant cette longue période de temps, un certain nombre de régulations cellulaires se mettent en place au sein des sacs perliers des huîtres perlières receveuses, différentes de celles qui existaient au préalable au sein du manteau des huîtres perlières donneuses, aboutissant à des niveaux d'expression de gènes variables entre ces deux types de tissus. Au final, il est intéressant de constater qu'au sein des poches perlières à l'origine de la production de perles de qualité supérieure, la majorité des gènes sous-exprimés correspondent à des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de calcite.

Profils d'expression des gènes pour la variable « Défauts »

- 60 gènes sont différentiellement exprimés au sein des greffons, dont 28 gènes sont surexprimés et 32 gènes sont sous-exprimés au sein des greffons ayant donnés en moyenne les perles présentant le moins de défauts. Parmi les 28 gènes surexprimés au sein des greffons ayant donné des perles de qualité supérieure, 11 gènes présentent un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau, dont la majorité (7 gènes) présentent une surexpression au niveau de la zone dorsale du manteau. Parmi les 32 gènes sous-exprimés au sein des greffons ayant donné des perles de qualité supérieure, 20 gènes présentent un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau avec une surexpression au niveau de la zone ventrale du manteau.
- 85 gènes sont différentiellement exprimés au sein des poches perlières, dont 32 gènes sont surexprimés et 53 gènes sont sous-exprimés au sein des poches perlières ayant donnés en moyenne les perles présentant le moins de défauts. Parmi les 32 gènes surexprimés au sein des poches perlières ayant donné des perles de qualité supérieure, 16 présentent un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau, dont la majorité (12 gènes) présentent une surexpression au niveau de la zone dorsale du manteau. Parmi les 53 gènes sous-exprimés au sein des poches perlières ayant donné des perles de qualité supérieure, 28 gènes présentent un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau, dont la majorité (26 gènes) présentent une surexpression au niveau de la zone ventrale du manteau.

Concernant la variable « Défauts », le profil d'expression des gènes biomarqueurs candidats observé au sein des greffons est similaire à celui observé au sein des poches perlières. En effet, tant au niveau des greffons que des poches à l'origine de la production de perle présentant peu de défauts, la majorité des gènes sous-exprimés correspondent à des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de calcite, et la majorité des gènes surexprimés correspondent à des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'aragonite (nacre).

Profils d'expression des gènes pour la variable « Epaisseur »

- 169 gènes sont différentiellement exprimés au sein des greffons, dont une très grande majorité (162 gènes), sont surexprimés au sein des greffons des huîtres perlières donneuses à l'origine des perles les plus épaisses en moyenne. Parmi les 162 gènes surexprimés au sein des greffons, 95 présentent un différentiel d'expression dorso-ventral, avec une surexpression des gènes biomarqueurs candidats tant au niveau dorsal (35 gènes) que ventral (60 gènes) du manteau.
- 111 gènes sont différentiellement exprimés respectivement au sein des poches perlières, dont une très grande majorité (108 gènes) sont surexprimés au sein des poches perlières des huîtres perlières donneuses à l'origine des perles les plus épaisses en moyenne. Parmi les 108 gènes surexprimés des

poches perlières, 65 présentent un différentiel d'expression dorso-ventral, avec une surexpression des gènes biomarqueurs candidats tant au niveau dorsal (39 gènes) que ventral (26 gènes) du manteau.

Concernant la variable « Epaisseur », le profil d'expression des gènes biomarqueurs candidats observé au sein des greffons est similaire à celui observé au sein des poches perlières. De plus, tant au niveau des greffons que des poches à l'origine de la production des perles les plus épaisses, la quasi-totalité des gènes différentiellement exprimés sont surexprimés. Ces profils d'expression traduisent une activité génique augmentée au sein de ces tissus, et donc potentiellement une synthèse plus importante de protéines impliquées dans les processus de biominéralisation, cohérente avec une production de perles plus épaisses.

4.4.2. Sélection d'un ensemble de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera*

Sur la base des résultats obtenus lors l'analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein des échantillons de greffons et de poches perlières associés à des qualités de perles contrastées, une sélection de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle a été réalisée. Cette sélection a été établie en tenant compte de différents critères successifs, à savoir :

- le niveau d'induction des gènes au sein des greffons
- le niveau et le sens d'induction des gènes (sous- ou surexpression) au sein des greffons et des poches perlières
- l'existence d'un éventuel différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau.

Le nombre de biomarqueurs candidats identifiés comme différentiellement exprimés au moins deux fois (fold ≥ 2) au sein des greffons et des poches perlières associés à des qualités de perles contrastées est trop important pour établir une liste relativement restreinte de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle (table 19). L'objectif étant d'établir une liste de biomarqueurs la plus pertinente possible, n'ont été sélectionnés dans un premier temps que les biomarqueurs différentiellement exprimés au moins 10 fois (fold ≥ 10) ou 25 (fold ≥ 25) fois au sein des greffons associés à des qualités de perles contrastées (table 20). Ainsi, en appliquant ce premier filtre sur les niveaux d'induction des gènes, le nombre de biomarqueurs candidats sélectionnés différentiellement exprimés au moins 10 fois est réduit à 37 gènes non redondants entre les variables, et le nombre de biomarqueurs candidats sélectionnés différentiellement exprimés au moins 25 fois est réduit à 16 gènes non redondants entre les variables (table 20). Le fait que le nombre total de gènes différentiellement exprimés ne soit pas égal à la somme des gènes différentiellement exprimés pour les 3 variables étudiées s'explique par le fait que certains biomarqueurs peuvent être communs à plusieurs variables. Parmi les 37 gènes différentiellement exprimés au moins 10 fois, 27 sont impliqués dans la variable « Epaisseur », 12 sont impliqués dans la variable « Défauts » et 7 sont impliqués dans la variable « Qualité ». De même, parmi les 16 gènes différentiellement exprimés au moins 25 fois, 10 sont impliqués dans la variable « Epaisseur », 7 sont impliqués dans la variable « Défauts » et 4 sont impliqués dans la variable « Qualité ».

Table 20. Biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*

FOLD (greffons)	Variable	Sens du niveau d'expression des gènes groupe A / groupe B)	Nombres de gènes différentiellement exprimés au sein des greffons	Nombre total de gènes non redondants entre variables	Nombres de gènes différentiellement exprimés dans le même sens au sein des greffons et des poches perlières (fold ≥ 2)	Nombre total de gènes biomarqueurs non redondants entre variables
FOLD ≥ 10	EPAISSEUR	Gènes surexprimés	26	37	15	22
		Gènes sous-exprimés	1		0	
	DEFAUTS	Gènes surexprimés	7		4	
		Gènes sous-exprimés	5		4	
	QUALITE	Gènes surexprimés	4		0	
		Gènes sous-exprimés	3		2	
FOLD ≥ 25	EPAISSEUR	Gènes surexprimés	10	16	5	11
		Gènes sous-exprimés	0		0	
	DEFAUTS	Gènes surexprimés	4		2	
		Gènes sous-exprimés	3		2	
	QUALITE	Gènes surexprimés	2		0	
		Gènes sous-exprimés	2		2	

Dans un second temps, le niveau d'induction des gènes sélectionnés comme différentiellement exprimés au moins 10 fois ou 25 fois au sein des greffons a été étudié au sein des poches perlières. L'objectif est de sélectionner des gènes à la fois différentiellement exprimés, et dans le même sens (sous- ou surexpression), au sein des greffons et des poches perlières associés à la production de perles de qualités contrastées. Ce filtre d'induction est primordial dans le cadre de la mise en évidence de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle, car il permet de s'assurer que les niveaux d'expression observés au sein des huîtres perlières donneuses de greffons ont véritablement une valeur prédictive sur la qualité de la future perle récoltée. Ainsi, ont été sélectionnés à cette étape, parmi les gènes différentiellement exprimés au moins 10 fois ou 25 fois au sein des greffons, les gènes également différentiellement exprimés au moins 2 fois (fold ≥ 2) et dans le même sens (sous- ou surexpression), au sein poches perlières. En appliquant ce filtre complémentaire sur les niveaux d'induction des gènes au sein des poches perlières, le nombre de biomarqueurs candidats sélectionnés différentiellement exprimés au moins 10 fois dans les greffons est réduit de 37 à 22, et le nombre de biomarqueurs candidats sélectionnés différentiellement exprimés au moins 10 fois dans les greffons est réduit de 16 à 11 (table 20). Parmi les 22 gènes différentiellement exprimés au moins 10 fois dans les greffons et 2 fois dans les poches perlières, 15 sont impliqués dans la variable « Epaisseur », 8 sont impliqués dans la variable « Défauts » et 2 sont impliqués dans la variable « Qualité ». De même, parmi les 11 gènes différentiellement exprimés au moins 10 fois dans les greffons et 2 fois dans les poches perlières, 5 sont impliqués dans la variable « Qualité », 4 sont impliqués dans la variable « Défauts » et 2 sont impliqués dans la variable « Epaisseur » (table 20).

L'application de ces deux filtres successifs basés sur les niveaux d'induction des gènes au sein des greffons et des poches perlières associés à des qualités de perles contrastées a permis de sélectionner un sous-ensemble de biomarqueurs de croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. En fonction de la valeur du filtre choisi, cette liste de biomarqueurs est la suivante :

- Mise en évidence de 22 gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle, différentiellement exprimés au moins 10 fois (fold ≥ 10) au sein des greffons et différentiellement exprimés au moins 2 fois (fold ≥ 2) au sein de poches perlières, dans le même sens, pour des tissus biominéralisateurs associés à la production de perles de qualités contrastées chez *P. margaritifera*.
- Mise en évidence de 11 gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle, différentiellement exprimés au moins 25 fois (fold ≥ 25) au sein des greffons et différentiellement exprimés au moins 2 fois (fold ≥ 2) au sein de poches perlières, dans le même sens, pour des tissus biominéralisateurs associés à la production de perles de qualités contrastées chez *P. margaritifera*.

Les gènes de ces listes définitives de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle codant essentiellement des protéines dont les fonctions sont inconnues, ils ne pourront être discutés quant à leur implication dans les processus de biominéralisation de la perle. Néanmoins, il est intéressant d'étudier, pour chacune des ses deux listes, le niveau d'expression dorso-ventral des gènes au sein du manteau (table 21).

Table 21. Niveau d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*

FOLD greffons	Nombre total de gènes biomarqueurs non redondants entre variables	Variable	Sens du niveau d'expression des gènes (groupe A / groupe B)	Nombres de gènes différentiellement exprimés dans le même sens au sein des greffons et des poches perlières	Gènes surexprimés dans la zone ventrale du manteau (Bourrelets)	Gènes surexprimés dans la zone dorsale du manteau (Central)
FOLD ≥ 10	22	EPAISSEUR	Gènes surexprimés	15	**3**	**2**
			Gènes sous-exprimés	0	0	0
		DEFAUTS	Gènes surexprimés	4	0	**2**
			Gènes sous-exprimés	4	**2**	0
		QUALITE	Gènes surexprimés	0	0	0
			Gènes sous-exprimés	2	0	0
FOLD ≥ 25	11	EPAISSEUR	Gènes surexprimés	5	**1**	0
			Gènes sous-exprimés	0	0	0
		DEFAUTS	Gènes surexprimés	2	0	**2**
			Gènes sous-exprimés	2	**1**	0
		QUALITE	Gènes surexprimés	0	0	0
			Gènes sous-exprimés	2	0	0

Les gènes biomarqueurs mis en évidence présentent des profils d'expression cohérents avec l'obtention de perles de qualité supérieure. En effet, les gènes biomarqueurs de la croissance (paramètre de qualité lié à la variable « Epaisseur ») sont surexprimés, et mettent en évidence un niveau d'expression génique à l'origine d'une synthèse protéique plus intense au sein des tissus à l'origine de la production de perles épaisses. De plus, les informations recueillies sur les niveaux d'expression dorso-ventrale des biomarqueurs au sein du manteau sont elles-mêmes informatives sur la nature du biominéral produit par ces derniers. En effet, il a été montré que la zone dorsale du manteau est impliquée dans la synthèse de la nacre au sein de la coquille et que la zone ventrale du manteau est impliquée dans la synthèse des prismes de calcite. Or, les gènes biomarqueurs associés à la variable « Défauts » impliqués dans la synthèse de la nacre ont tendance à être surexprimés, tandis que ceux impliqués dans la synthèse des prismes de calcite ont tendance à être sous-exprimés. De plus, bien que les gènes biomarqueurs associés à la variable « Qualité » ne présentent pas de différentiel dorso-ventral de leur expression au sein du manteau, il est intéressant de revenir sur les résultats obtenus lors de la sélection de biomarqueurs différentiellement exprimés au moins deux fois (fold ≥ 2) au sein des poches perlières (Table 19). L'analyse de ces résultats avait en effet montré que les gènes associés à la production des prismes de calcite (c'est-à-dire surexprimés dans la zone ventrale du manteau) sont majoritairement sous-exprimés au sein des poches perlières à l'origine de la production des perles de qualité supérieure. En conclusion, les profils d'expression des gènes biomarqueurs mis en évidence sont cohérents avec l'obtention de perles épaisses, présentant peu de défauts et de qualité supérieure.

5. Valorisation scientifique

Certains aspects des travaux qui viennent d'être décris dans ce chapitre font l'objet de valorisations. Trois publications sont actuellement en cours de rédaction, et le dépôt d'un brevet est en réflexion.

La première publication concerne les travaux réalisés dans le cadre de la mise en évidence d'un différentiel d'expression dorso-ventral au sein du manteau des gènes biomarqueurs candidats, exploités en parallèle avec les résultats obtenus dans le cadre de l'approche protéomique. Cette publication s'attachera à démontrer la répartition quasi-exclusive et spécifique d'une centaine de protéines, pour la plupart inconnues, identifiées au sein des structures nacrées et prismatiques de la coquille de *P. margaritifera* par la mise en place de l'approche protéomique globale. La description de cette approche sera complétée par la mise en évidence du différentiel d'expression dorso-ventral des gènes codant pour ces même protéines au sein du manteau. La combinaison de ces deux approches permettra de mettre en évidence pour la première fois chez *P. margaritifera* à une échelle globale, d'une part le lien entre la présence d'un transcrit au sein du manteau et la présence de la protéine au sein de la coquille, et d'autre part la correspondance directe entre la zonation fonctionnelle dorso-ventrale de l'expression des gènes et la synthèse d'un type de polymorphe de carbonate de calcium particulier.

La seconde publication concerne les travaux entrepris dans le cadre de la mise au point de gènes de références pour la réalisation des qPCR, qui font actuellement l'objet d'une analyse complémentaire. Les niveaux d'expression d'une dizaine de gènes de référence supplémentaires à ceux précédemment décrits dans ce chapitre y seront étudiés au sein de différents tissus de *P. margaritifera* (manteau total, bourrelet, poche perlière, hémocytes, glande digestive, muscle, gonades et branchies). Les gènes dont les niveaux d'expression sont les plus stables seront identifiés à l'aide de différents logiciels (GeNorm, BestKeeper…). La stabilité individuelle de l'expression de ces gènes sera également décrite. Les résultats présentés dans cette publication permettront de réaliser une sélection de gènes de référence optimale en fonction des tissus étudiés et des questions biologiques considérées pour les travaux de qPCR réalisés chez *P. margaritifera*.

La troisième publication concerne un certain nombre de gènes identifiés dans le cadre de cette thèse, qui ont également été exploités afin d'identifier des biomarqueurs de l'activité minéralisatrice et de la croissance de la coquille chez *P. margaritifera*. L'objectif de cette étude est d'observer l'effet combiné des conditions environnementales, à savoir la température (20, 26 and 30°C) et de la nourriture en micro-algues (800 and 15000 cell mL^{-1}), sur la croissance coquillière et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le manteau impliqués dans la biominéralisation. La croissance est décrite par la mesure des dépots nacrés après un marquage à la calcéine (Linard *et al.,* 2011) et l'expression des gènes du manteau impliqués dans la biominéralisation (Joubert *et al.,* 2010).

Enfin, les résultats obtenus dans le cadre de la mise en évidence de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* font actuellement l'objet de validations complémentaires en étant utilisés comme outils de sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons pour la mise en place de greffes expérimentales. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, ainsi que les travaux engagés dans cette nouvelle voie, font actuellement l'objet d'une réflexion pour le dépôt d'un brevet entre l'Ifremer, Skuldtech et le Service de la Perliculture.

Chapitre VI: Synthèse et perspectives

L'objectif général de cette thèse était d'étudier les bases moléculaires des processus de biominéralisation chez *P. margaritifera.* Une approche fondamentale d'analyse des évènements de transcriptomique ayant lieu au niveau des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille et de la perle a donc été mise en place afin d'approfondir les connaissances concernant l'élaboration de ces différentes structures minéralisées. Cette approche fondamentale avait pour objectif appliqué de mettre au point des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle exploitables en tant qu'outils prédictifs d'évaluation pour la sélection d'huîtres donneuses de greffons de « haute propriété minéralisatrice ».

1. Synthèse des résultats

L'approche globale d'analyse du transcriptome mise en place dans le cadre de cette thèse a permis d'identifier un grand nombre de gènes exprimés au sein des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille et de la perle. La constitution de la banque EST de manteau nous a notamment permis d'identifier un catalogue de 82 gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans la biominéralisation de la coquille chez *P. margaritifera*. La constitution des banques SAGE de greffons et de poches perlières a permis d'identifier plus de 5.000 séquences de gènes annotés et exprimés au sein de tissus responsables des processus de biominéralisation de la perle. Enfin, l'approche protéomique globale mise en place sur les constituants de la coquille et des perles, menée dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR 5561 Biogéosciences de l'Université de Bourgogne, a permis d'identifier 369 séquences protéiques constitutives des structures minéralisées chez *P. margaritifera*. Au final, l'exploitation de ces banques de données protéomique et transcriptomiques a permis de sélectionner un ensemble de 268 gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle, dont 205 codent des protéines inconnues à ce jour chez *P. margaritifera*. Ainsi, les approches transcriptomiques et protéomique globales mises en place en parallèle sur les tissus minéralisateurs et les matrices organiques des structures minéralisées constituent de puissantes méthodes d'identification de gènes et de protéines impliqués dans les processus cellulaires et moléculaires de la formation de la coquille et de la perle chez *P. margaritifera*. Ces travaux ont en effet permis de disposer pour la première fois chez *P. margaritifera* de séquences d'un grand nombre de gènes susceptibles de décrire les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le déroulement de la formation de la coquille et de la perle.

L'exploitation des données recueillies lors des approches transcriptomiques et protéomiques globales ont permis d'aboutir à l'identification de biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera.* La validation des biomarqueurs candidats en tant que biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle a consisté à corréler le niveau d'expression de ces gènes à la qualité des perles. L'analyse du taux d'expression des biomarqueurs candidats a ainsi été réalisée au sein des tissus biominéralisateurs de la perle et a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés en fonction de la qualité et de la croissance des perles récoltées. En parallèle, l'analyse du niveau d'expression de ces gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau a permis de mettre en évidence un différentiel d'expression dorso-ventral potentiellement corrélé à la synthèse de différents types de polymorphes de carbonate de calcium (calcite ou aragonite). L'analyse conjointe des analyses du niveau d'expression des gènes en corrélation avec la qualité des perles et la nature du polymorphe de carbonate de calcium potentiellement produit a abouti à la validation d'un ensemble de 22 gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*.

2. Perspectives

Base de données « Oyster » : des outils pour l'identification de nouveaux gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation

L'approche transcriptomique globale EST menée sur le manteau de *P. margaritifera* par pyroséquençage a abouti à l'identification d'un nombre de séquences considérables, soit 276 738 ESTs dont 19 257 contigs. La base de données « Oyster », créée du fait de la nécessité de disposer d'outils d'exploitation performants de ces données, met à disposition des outils bioinformatiques conçus spécialement pour l'analyse de séquences : le « Blast en ligne » et le « Viewer ». L'exploitation de cette banque de données EST par approche gène candidat a ainsi permis d'identifier un catalogue de 82 gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*. Les résultats issus de cette approche ont permis de montrer que les outils bioinformatiques de la base « Oyster » dédiés à le recherche et l'analyse de séquence constituent des outils performants d'identification de gènes candidats. Néanmoins, afin de maintenir cette base de données « active », il est important de réaliser un entretien régulier des séquences qui y sont stockées via une annotation régulière de la banque EST de manteau. Ce travail d'entretien, ainsi qu'une exploitation régulière de la banque EST de manteau par approche candidat, permettra d'enrichir le catalogue de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* au fur et à mesure que des gènes homologues seront identifiés chez d'autres espèces.

La base de données « Oyster » constitue également un support à la création de nouveaux outils bioinformatiques destinés à l'analyse et l'exploitation des séquences de la banque EST de manteau. En effet, les protéines impliquées dans les processus de biominéralisation sont très diversifiées sur le plan biochimique. Néanmoins, certaines protéines partagent un certain nombre de caractéristiques communes, telles que des poids moléculaire relativement petits, une grande acidité, un pourcentage élevé de certains acides aminés particuliers (Asp, Glu, Ser …), ou encore la présence de séquences ou motifs répétés. La mise au point d'outils bioinformatiques basés sur l'identification de ces différents paramètres biochimiques et de motifs conservés permettrait d'identifier un répertoire de gènes nouveaux codant des protéines potentiellement impliquées dans les processus de biominéralisation, et ce malgré l'absence de séquences homologues.

La banque EST de manteau : une source de séquences pour l'étude de l'évolution des processus de biominéralisation

Une des grandes questions actuelle relatives aux processus de biominéralisation concerne les considérations évolutives qui sous-tendent la mise en place de ces processus. La nacre des coquilles nacro-prismatiques des mollusques est en effet considérée comme un modèle de choix pour l'étude de l'origine des biominéralisation carbonatée. Il est intéressant de préciser que la nacre est une microstructure aragonitique quasi-exclusive des mollusques. De plus, la nacre est retrouvée très tôt dans les enregistrements fossiles, à l'époque Cambrienne (Cope, 1996). Elle est souvent considérée comme une structure ancestrale, un caractère plésiomorphe que l'on retrouve au sein des formes les plus primitives de chaque classe de mollusques. On la retrouve dans 4 des 5 classes de mollusques conchifères : les gastéropodes, les céphalopodes, les bivalves, et les monoplacophores (Taylor, 1973). Néanmoins, toutes les coquilles de bivalves ne sont donc pas nacro-prismatiques. ces microstructures sont présentes au sein de 4 sous-classes bien distinctes : les paléotaxodontes, les ptériomorphes, les paléohétérodontes, et les anomalodesmata. Elles sont absentes des cryptodontes et des hétérodontes (le groupe le plus diversifié actuellement en terme de nombre d'espèces).

L'ensemble de ces considérations soulève une question fondamentale : comment la nacre des structures nacro-prismatiques est-elle apparue ? Deux scénarios sont envisageables (Marin *et al.,* 2008). La présence des structures nacro-prismatiques peut résulter d'un processus d'exaptation, c'est-à-dire résulter de l'acquisition ancestrale et de l'adaptation sélective d'une fonction commune à partir de laquelle la fonction de biominéralisation actuellement remplie a pu apparaitre et évoluer grâce à une pression de sélection naturelle. Le scénario alternatif propose que l'apparition des structures nacro-prismatiques résulte d'un processus de convergence évolutive, c'est-à-dire que l'acquisition des fonctions aboutissant à la synthèse de la nacre serait apparue de manière indépendante au sein des différents phylums, suite à l'existence de fortes pressions de sélection et de contraintes évolutives.

Pour répondre à ces questions, la « simple » observation ultrastructurale des coquilles n'est pas suffisante. En revanche, on peut se demander si les matrices organiques constitutives des assemblages biominéralisés des structures nacro-prismatiques sont similaires au sein des différents phylums. Pour cela, l'exploration conjointe et comparative, à l'échelle moléculaire, des matrices organiques constitutives de la nacre permettra de déterminer si les mollusques ont recours ou non à une même « boite à outils » moléculaire. Pour autant, l'absence ou la faible quantité de données de séquences de protéines impliquées dans les processus de biominéralisation, et ce pour un grand nombre de représentants des différents phylums capables de synthétiser la nacre, constitue encore aujourd'hui un frein aux analyses permettant d'aboutir à ce genre de conclusions. En ce sens, l'ensemble des séquences identifiées au sein de la banque EST de manteau chez *P. margaritifera* constitue une source de données considérable pour réaliser des analyses phylogénétiques et répondre aux questions d'ordre évolutif.

A l'heure actuelle, un certain nombre de séquences de protéines de nacre identifiées au sein de différentes espèces permet d'établir les premières comparaisons entre les bivalves et les gastéropodes. Par exemple, les protéines de nacre MSI60, le groupe *Pmarg*-Pearlin/N14/16, les protéines Nacrein/N66, ont été identifiée chez des bivalves (au sein du genre *Pinctada*) et un gastéropode *(Turbo marmoratus)*, et les protéines Perlustrin, la Perlucin, la Perwapin, la Perlinhibin ont été identifiée chez les gastéropodes (*Haliotis)*. A l'exception de la Nacrein, ces protéines sont exclusives des bivalves ou des gastéropodes, et les conclusions de plusieurs travaux penchent ainsi essentiellement en faveur du scénario de convergence évolutive (Jackson *et al.,* 2006; Marie *et al.,* 2009; Jackson *et al.,* 2010). L'exploitation de la banque EST a permis d'identifier des séquences « homologues » des protéines Perlustrin, Perlucin et Perwapin chez *P. margaritifera*. Sans nécessairement remettre en cause la théorie actuelle, il serait particulièrement intéressant ici de réaliser des analyses phylogénétiques des séquences identifiées à la fois chez un bivalve et un gastéropode, afin de déterminer le véritable degré d'homologie entre ces protéines, et ce que cela peut impliquer en termes évolutifs. Il est fort probable que dans les années à venir, avec les progrès constants réalisés en génomique et en protéomique, la quantité de gènes et de protéines identifiés au sein des tissus minéralisateurs et des structures minéralisées augmente de façon exponentielle. La comparaison des « boites à outils » moléculaires auxquelles diverses espèces ont recours permettra sans nul doute d'avancer sur les questions d'ordre « évolutives » des processus de biominéralisation.

Les gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation constituent une source de biomarqueurs potentiels en lien avec diverses questions biologiques chez P. margaritifera

Le niveau d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation peut être exploré par qPCR au sein des tissus biominéralisateurs afin de répondre à diverses questions biologiques chez *P. margaritifera*. Dans le cadre de cette thèse, le niveau d'expression des transcrits a été déterminé au sein des tissus minéralisateur de la coquille et de la perle afin de mettre au point des biomarqueurs de la croissance et de la qualité des perles. Un certain nombre de gènes ont également pu être corrélés à la synthèse d'un polymorphe de carbonate de calcium particulier, grâce à l'approche protéomique globale et à l'étude du niveau d'expression différentiel dorso-ventral au sein du manteau.

Muni de ces outils moléculaires, il serait également intéressant d'explorer le niveau d'expression de ces gènes au sein d'échantillons de poches perlières récoltées à différents temps post-greffe. Ces travaux permettraient de suivre la cinétique d'expression de gènes corrélés à la synthèse de la calcite ou de l'aragonite, ou corrélés à la croissance ou la qualité de la perle, depuis la greffe jusqu'à la récolte. Les résultats pourraient apporter des informations particulièrement intéressantes sur la cinétique de la minéralisation des perles, en lien avec la nature, la vitesse et la qualité du dépôt.

De manière similaire, le niveau d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation peut également être exploré au sein des tissus biominéralisateurs en réponse à des questions d'ordre écophysiologiques. Ces études permettraient d'identifier des gènes biomarqueurs de l'activité minéralisatrice chez *P. margaritifera* en fonction de diverses conditions environnementales. Dans cette optique, des travaux ont été entrepris en collaboration avec Clémentine Linard dans le cadre de sa thèse, au cours de laquelle elle avait pu observer l'effet combiné de la température et de la nourriture en micro-algues sur la croissance coquillière (Linard 2010). L'analyse du niveau d'expression des gènes au sein du manteau en réponse à la combinaison de ces différents

paramètres environnementaux a permis d'identifier un gène biomarqueur potentiel de la croissance de la coquille chez *P. margaritifera*. En effet, l'expression du gène codant la Shematrin9, en réponse au paramètre « nourriture », semble corrélée à la vitesse de dépôt nacré au bord ventral des coquilles. Ces travaux doivent néanmoins être confirmés par des expériences de modulation de la ressource trophique sur la croissance coquillère.

Vers une caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice organique

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire au début des années 90 pour l'étude de la biominéralisation a permis d'identifier les « acteurs » de ce processus à l'échelle du gène et de leurs transcrits. Or, comme nous l'avons déjà fait remarquer plus haut, le recours à des techniques de génomique de plus en plus performantes permet de disposer aujourd'hui de diaporamas quasi-complets de gènes exprimés au sein des tissus biominéralisateurs pour une espèce donnée (Jackson *et al.,* 2006; Clark *et al.,* 2010; Joubert *et al.,* 2010; Berland *et al.,* 2011). A divers points de vue, ces énumérations exhaustives de gènes et de transcrits constituent une source considérable d'informations qui a contribué à améliorer les connaissances sur les protéines impliquées dans ce processus. Pour autant, ces méthodes ne peuvent véritablement renseigner sur leur « rôle » exact dans la formation des structures minéralisées et leur fonction dans la mise en place et la régulation des processus de biominéralisation. Pour répondre à ces questions, des analyses fonctionnelles devront être réalisées, et permettront de contribuer à l'établissement de modèles dynamiques des processus de biominéralisation chez les mollusques.

A l'échelle transcriptomique, il serait particulièrement intéressant que les 82 séquences primaires de gènes identifiées au sein de la banque EST de manteau chez *P. margaritifera* soit analysées en détails afin de mettre en évidence des caractéristiques biochimiques et/ou structurales. Cette analyse permettrait notamment de décrire la structure primaire des séquences protéiques (poids moléculaire, *pI*, proportions en acides aminés), prédire la formation de structures secondaires (hélices alphas et feuillets bêtas) ou tertiaires (ponts disulfures), ou révéler la présence de motifs fonctionnels ou de séquences répétées. Les modifications post-traductionnelles des protéines peuvent également être explorées. En effet, la caractérisation des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles est une nécessité dans de nombreuses études où un « détail » structural peut être responsable d'une activité biologique. Or, il a été montré que les protéines de la matrice font l'objet de modifications post-traductionnelles qui modifient leurs propriétés. Notamment, les glycosylations ou les phosphorylations peuvent modifier l'acidité d'une protéine (*pI)* du fait de l'ajout de polysaccharides acides ou sulfatés, ou sa capacité à lier les ions calcium (Addadi *et al.,* 1987; Marin *et al.,* 2000; Marxen *et al.,* 2003; Marin *et al.,* 2007; Marie *et al.,* 2008). Il serait donc très intéressant ici d'identifier les éventuelles modifications post-traductionnelles de diverses protéines identifiées au cours de cette thèse, afin de déterminer leur influence quant à l'activité biologique de ces dernières. Ces informations recueillies sur la structure permettraient d'orienter vers la fonction.

Pour aller plus loin, certaines protéines d'intérêt pourront faire l'objet d'une caractérisation fonctionnelle plus approfondie. Le niveau d'expression des gènes peut être exploré au sein des tissus biominéralisateurs en réponse à diverses questions biologiques chez *P. margaritifera* (cinétique d'expression, analyse de la variabilité individuelle, études éco-physiologiques …). La caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera* peut également être entreprise par études histologiques afin de localiser les transcrits à l'échelle cellulaires au sein des tissus biominéralisateurs. Des expériences d'immunolocalisation permettraient également de localiser les protéines au sein des structures minéralisées, comme cela a déjà été réalisé pour certaines protéines identifiées, chez *P. fucata* notamment (Gong *et al.,* 2008; Kong *et al.,* 2009; Li *et al.,* 2009). Des travaux de ce type ont été entrepris au laboratoire afin de caractériser des protéines identifiées par approche gène candidat (*Pmarg*-Pearlin) (Montagnani *et al.,* 2011), ou des protéines nouvelles identifiées « en aveugle » grâce à l'approche protéomique globale (*Pmarg*-MRNP34) (Marie *et al.,* 2011). Des expériences de cristallisation *in vitro* (Wilbur, 1984), comme celles entreprises chez *P. fucata* (Yan *et al.,* 2007; Yano *et al.,* 2007), *P. nobilis* (Marin *et al.,* 2005) ou le gastéropode *H. laevigata* (Mann *et al.,* 2007), peuvent également être envisagées afin de déterminer le type de carbonate de calcium induit en présence des protéines étudiées (calcite ou aragonite), la nature de la fonction de la protéine (induction ou inhibition de la nucléation et de la croissance des cristaux), ou encore les conditions requises pour la mise en place de ces processus (formation d'un complexe protéique, concentrations ioniques requises …). Enfin, la mise en place d'expériences de génétique inverse permettrait de déterminer la fonction d'un gène (et donc de la protéine qu'il code) par l'inhibition de la fonction et

l'observation du phénotype qui en résulte. Récemment, une expérience d'ARN interférent (RNAi) a été menée chez *P. fucata* afin de caractériser la fonction de la protéine PIF (Suzuki *et al.,* 2009). Ces travaux ont permis de montrer que cette protéine était impliquée dans la biominéralisation de la nacre de la coquille. Le recours à ces méthodes est nouveau pour ce type de modèles biologiques. Néanmoins, elles ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour la caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation.

Du biomarqueur de croissance et de qualité de la perle à un outil de sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons de haute propriété biominéralisatrice

L'objectif appliqué de cette thèse est d'utiliser les biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle identifiés comme outils de sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons de capacité de biominéralisation supérieure. Dans cette optique, des études sont actuellement réalisées en collaboration avec l'équipe « Domestication » du laboratoire EP de l'Ifremer à Tahiti dans le cadre de leurs travaux d'amélioration génétique des huîtres perlières donneuses de greffons. Le laboratoire a initié des travaux de sélection génétique afin de constituer des familles d'intérêt d'huîtres perlières donneuses de greffons génétiquement plus homogènes que des individus sauvages. A terme, l'objectif de ces travaux est de disposer de lignées d'huîtres perlières donneuses de greffons produisant des perles de croissance rapide et/ou de qualité améliorée. Actuellement, les propriétés des greffons issus de différentes familles sont donc testées en greffes expérimentales, sans *a priori*, afin de déterminer leur impact sur la croissance des perles. L'analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité des perles au sein des greffons des individus issus de ces différentes familles est actuellement en cours. Les résultats obtenus, mis en relation avec les caractéristiques des perles qui seront récoltées en fonction des familles testées, permettra de confirmer la validité du biomarqueur de croissance et de qualité de la perle comme véritable outils de sélection d'huîtres perlières donneuse de greffons de haute propriété biominéralisatrice. Les outils de sélection mis au point pourront ainsi à l'avenir être utilisés pour cibler des individus au potentiel biominéralisateur élevé dans le cadre d'une sélection génétique familiale en vue de la constitution de lignée d'huîtres perlières donneuses de greffons de haute propriété biominéralisatrice.

Vers un transfert des acquis à la profession

Outre l'apport de connaissances fondamentales sur les processus de biominéralisation, le travail réalisé dans le cadre de cette thèse permet d'apporter des informations et des outils d'intérêt dans une optique concrète d'amélioration de la qualité des perles de *P. margaritifera*. Les travaux ainsi engagés et les résultats obtenus ont donc un objectif véritablement appliqué, celui d'améliorer la productivité de l'activité perlicole polynésienne et de contribuer à un redressement du secteur économique dans son ensemble.

La recherche en perliculture réalisée à l'Ifremer ayant obtenu des résultats prometteurs ces dernières années, le Service de la Perliculture et l'Ifremer ont organisé (en mars 2010) des journées de restitution et discussion de leurs travaux. Ces journées étaient l'occasion de définir, avec les perliculteurs, les attentes de la profession en matière de recherche pour les années à venir. Une centaine de professionnels de la perliculture a participé aux ateliers et rempli des questionnaires élaborés pour l'occasion. Parmi les questions posées aux perliculteurs, certaines sont en lien direct avec les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Notamment, aux questions:

- « Est-il important pour vous de disposer d'huîtres donneuses de greffons sélectionnées ? », 85% ont répondu « très important » et 13% ont répondu « important »
- « Seriez-vous prêt à acheter des huîtres donneuses de greffons sélectionnées produites en écloserie ? », 80% ont répondu « oui ».
- « Quels sont les critères de sélection qui vous semblent les plus importants ? », 30% ont répondu « la vitesse de croissance des perles », 34% ont répondu « la couleur des perles » et 36% ont répondu « la qualité de surface des perles »

Les réponses des perliculteurs ont révélé que 98% d'entre eux sont favorables à la mise au point d'huîtres donneuses de greffons sélectionnées, et que 80% sont disposés à en acheter le cas échéant. La sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons de haute propriété biominéralisatrice, telle qu'elle a été décrite plus haut, offre des perspectives directes d'optimisation de la production en permettant aux perliculteurs de réaliser moins de greffes, et diminuer leur temps de culture et d'obtenir des récoltes plus homogènes. La mise au point des biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle pour la création d'outils de sélection d'huître perlière donneuse de greffons est donc accueillie très favorablement par la profession. A l'heure actuelle, le schéma de production d'huîtres perlières comprend une étape de collectage de naissains en milieu naturel qui permet aux perliculteurs de disposer à la fois de leurs huîtres perlières donneuses et receveuses pour la réalisation des greffes. La sélection génétique familiale d'huîtres perlières donneuses nécessitera de redéfinir ce schéma de production actuel, en y incluant une étape de production et la sélection de naissains de donneuses sélectionnées en écloserie. Une étude de faisabilité d'une écloserie d'huîtres perlières donneuses de greffons est ainsi actuellement en cours de réalisation, afin de permettre aux perliculteurs, de façon concrète et appliquée, de disposer d'huîtres perlières donneuses de greffons de haute propriété biominéralisatrice.

Enfin, concernant les critères de sélection des perles les plus importants selon les perliculteurs, 30% d'entre eux considèrent la vitesse de croissance, et 36% la qualité de surface des perles. Ces réponses nous confortent dans nos démarches d'analyse de la qualité des perles. La mise au point de biomarqueurs de croissance et de qualité de la perle chez *P. margaritifera* répond donc bien aux attentes des professionnels.

Bibliographie

- A -

Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S. (2006). "Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes." Chemistry **12**(4): 980-987.

Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., Weiner, S. (1987). "A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: Relevance to biomineralization." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2732-2736.

Anisimov, S. V. (2008). "Serial Analysis of Gene Expression (SAGE): 13 years of application in research." Curr Pharm Biotechnol **9**(5): 338-350.

Aoki, S. (1966). "Comparative histological observations on the pearl sac tissue forming nacreus, prismatic and periostracal pearl (in japanese)." Bull. Jpn. Sci. Fish. **32**: 1-10.

Arnaud-Haond, S., Boudry, P., Saulnier, D., Seaman, T., Vonau, V., Bonhomme, F., Goyard, E. (2002). "New anonymous nuclear DNA markers for the pearl oyster *Pinctada margaritifera* and other *Pinctada* species." Mol Ecol Notes **2**: 220-222.

Arnaud-Haond, S., Goyard, E., Vonau, V., Herbaut, C., Prou, J., Saulnier, D. (2006). "Pearl Formation: Persistence of the Graft During the Entire Process of Biomineralization." Mar Biotechnol (NY).

Asakura, T., Hamada, M., Ha, S. W., Knight, D. P. (2006). "Conformational study of silklike peptides modified by the addition of the calcium-binding sequence from the shell nacreous matrix protein MSI60 using 13C CP/MAS NMR spectroscopy." Biomacromolecules **7**(6): 1996-2002.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-29.

- B -

Bendtsen, J.-D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J Mol Biol **340**(4): 783-795.

Berland, S., Marie, A., Duplat, D., Milet, C., Sire, J.Y., Bédouet, L. (2011). "Coupling proteomics and transcriptomics for the identification of novel and variant forms of mollusk shell proteins: a study with *P. margaritifera*." Chembiochem **12**(6): 950-961.

Bertucci, A., Tambutte, S., Supuran, C. T., Allemand, D., Zoccola, D. (2011). "A New Coral Carbonic Anhydrase in *Stylophora pistillata*." Mar Biotechnol (NY).

Bevelander, G., Nakahara, H. (1969). "An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs." Calcif Tissue Res **3**(1): 84-92.

Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., Fritz, M. (2003). "The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals." J Microsc **212**(Pt 3): 280-291.

Bougrier, S., Geairon P., Deslous-Paoli J.M., Bachère C., Jonquières G. (1995). "Allometric relationships and effects of temperature on clearance rate and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas*." Aquaculture **134**: 143-154.

Brunner, E., Groger, C., Lutz, K., Richthammer, P., Spinde, K., Sumper, M. (2009). "Analytical studies of silica biomineralization: towards an understanding of silica processing by diatoms." Appl Microbiol Biotechnol **84**(4): 607-616.

- C -

Cariolou, M. A., Morse, D. E. (1988). "Purification and characterization of calcium-binding conchiolin shell peptides from the mollusc, *Haliotis rufescens*, as a function of development." Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology **157**: 717-729.

Carter, J. G. (1980). Environmental and biological controls of bivalves shell mineralogy and microstructure. In : Rhoads, D. C., Lutz, R. A. (Eds), Skeletal Growth of Aquatic Organisms. Biological Records of Environment Change. N. Y. Plenum Press, London. **(Chapter 2), pp. 69-113**.

Caseiro, J. (1993). La nacre noire de Polynésie française: Biominéralisation, paramètres et processus de croissance, effets chromatiques dans la coquille et la perle de *Pinctada margaritifera.* Villeurbane, Université Claude Bernard**:** 357.

Chatchavalvanich, K., Nagachinda, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Thongpan, A. and Meejui, O. (2010). "Histological Development of Pearl-Sac Formation in Thai Freshwater Mussels." Nat. Sci. **44**: 202-209.

Checa, A. (2000). "A new model for periostracum and shell formation in *Unionidae* (Bivalvia, Mollusca)." Tissue Cell **32**(5): 405-416.

Cheng, T. C., Ed. (1996). Hemocytes: Forms and functions. In: The eastern oyster *Crassotrea virginica*, U. o. M. S. Maryland Sea Grant College, College Park (ed). Maryland.

Cheung, F., Haas, B. J., Goldberg, S. M., May, G. D., Xiao, Y., Town, C. D. (2006). "Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology." BMC Genomics **7**: 272.

Clark, M. S., Thorne, M. A., Vieira, F. A., Cardoso, J. C., Power, D. M., Peck, L. S. (2010). "Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing." BMC Genomics **11**: 362.

Cochennec-Laureau, N., Cochard, J.-C., Levy, P., Haffner, P., Tréguier, C. (2005). Etude comparative de la qualité des nucélus commercialisés en Polynésie française: influence sur la qualité des perles. rapport final de la convention n°4.0019 du 24 août 2004 entre le service de la perliculture et l'ifremer-Tahiti, Ifremer**:** 59pp.

Cochennec-Laureau, N., Montagnani, C., Saulnier, D., Fougerouse, A., Levy, P., Lo, C. (2010). "A histological examination of grafting success in pearl oyster *Pinctada margaritifera* in French Polynesia." Aquatic living resources **23**(1): 131-140.

Comps, M., Herbaut, C., Fouguerouse, A. (2000). "Abnormal periostracum secretion during the mineralization process of the pearl in teh blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera.*" Aquat. Living Resources **13**(1): 49-55.

Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J-M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005). "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics (Oxford, England) **21**(18): 3674-3676.

Cope, J., Ed. (1996). Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca,, Oxford University Press, Oxford.

Craft, J. A., Gilbert, J. A., Temperton, B., Dempsey, K. E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T. H., Chipman, J. K. (2010). "Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns." PLoS One **5**(1): e8875.

Cragg, S., M., and Nott, J. A. (1977). "The ultrastructure of the statocysts in the pediveliger larvae of *Pecten maximus* (L.) (Bivalvia) " Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **27**(1): 23-36.

Cuif, J. P., ; Dauphin, Y. ; Sorauf, J. E. (2011). Biominerals and Fossils Through Time

Cunha, R. L., Blanc, F., Bonhomme, F., Arnaud-Haond, S. (2010). "Evolutionary Patterns in Pearl Oysters of the Genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae)." Mar Biotechnol (NY).

Currey, J. D., Zioupos, P., Davies, P., Casino, A. (2001). "Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone." Proc Biol Sci **268**(1462): 107-111.

- D -

Dauphin, Y., Ball, A. D., Cotte, M., Cuif, J. P., Meibom, A., Salome, M., Susini, J., Williams, C. T. (2008). "Structure and composition of the nacre-prisms transition in the shell of *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia)." Anal Bioanal Chem **390**(6): 1659-1669.

De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N. (2006). "ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W362-365.

De Paula, S. M., Silveira, M. (2009). "Studies on molluscan shells: contributions from microscopic and analytical methods." Micron **40**(7): 669-690.

Demes, K. W. B., Susan S.; Dawes, Clinton J. (2009). "The effects of phosphate on the biomineralization of the green alga, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lam." Journal of experimental marine biology and ecology **374, n°2**: 123-127.

Dickinson, J. Y., Ed. (1968). The Book of Pearls: Their History and Romance from Antiquity to Modern Times Crown Publishers.

Dix, T. G. (1973). "Histology of the mantle and pearl sac of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Lamellibranchia)." J. Malacol. Soc. Aust. **2**(365-375).

Doroudi, M. S., Southgate, P. C., Lucas, J. S. (2003). "Variation in clearance and ingestion rates by larvae of the black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) feeding on various microalgae." Aquaculture Nutrition **9**(1): 11-16.

Dube, S., Qin, J., Ramakrishnan, R. (2008). "Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device." PLoS One **3**(8).

Duplat, D., Puissegur, M., Bedouet, L., Rousseau, M., Boulzaguet, H., Milet, C., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Lopez, E. (2006). "Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*." FEBS Lett **580**(10): 2435-2441.

Dupuy, C., Bouvy, M., Charpy, L., Fournier, J., Pagano, M., Durieux, B., Thomas, Y., Michotey, V., Champalbert, G., Boeuf, D., Guasco, S., Barani, A., Lo-Yat, A. (2009). Planktonic compartment of Ahe Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia): potential preys for pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Présentation orale, 11ème Inter-Congrès des Sciences du Pacifique (PSI). État Français-Polynésie française-Pacific Science Association, Papeete.

- F -

Falini, G., and Fermani, S. (2004). "Chitin mineralization." Tissue Eng **10**(1-2): 1-6.

Fan, W., Li, C., Li, S., Feng, Q., Xie, L., Zhang, R. (2007). "Cloning, characterization, and expression patterns of three sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase isoforms from pearl oyster (*Pinctada fucata*)." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **39**(9): 722-730.

Fan, W., Li, C., Wang, X., Gong, N., Xie, L., Zhang, R. (2007). "Cloning, characterization and expression analysis of calcium channel beta subunit from pearl oyster (*Pinctada fucata*)." J Biosci Bioeng **104**(1): 47-54.

Fleury, C., Marin, F., Marie, B., Luquet, G., Thomas, J., Josse, C., Serpentini, A., Lebel, J. M. (2008). "Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: a histological and microstructural study." Tissue Cell **40**(3): 207-218.

Fougerouse, A., and Herbaut, C., Ed. (1994). Atlas Anatomique de L'Huître Perlière *Pinctada margaritifera*.

Fournié, J. and Chétail, M. (1982). "Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques." Malacologia **22**: 265-284.

Fremy, M. E. (1855). Ann. Chim. Phys **43**: 45-107.

Furuhashi, T., Miksik, I., Smrz, M., Germann, B., Nebija, D., Lachmann, B., Noe, C. (2009). "Comparison of aragonitic molluscan shell proteins." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.

Furuhashi, T., Schwarzinger, C., Miksik, I., Smrz, M., Beran, A. (2009). "Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.

- G -

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A. (2003). "ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Res **31**(13): 3784-3788.

Gervis, M. H., and Sims, N.A., Ed. (1992). The Biology and Culture of Pearl Oysters (Bivalvia: Pteriidae), International Center for living aquatic resources management Overseas development administration of the United Kingdom.

Gong, N., Li, Q., Huang, J., Fang, Z., Zhang, G., Xie, L., Zhang, R. (2008). "Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization." Cell Tissue Res.

Gong, N., Shangguan, J., Liu, X., Yan, Z., Ma, Z., Xie, L., Zhang, R. (2008). "Immunolocalization of matrix proteins in nacre lamellae and their in vivo effects on aragonitic tablet growth." J Struct Biol.

Gotliv, B. A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2005). "Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*." Chembiochem **6**(2): 304-314.

Gower, L. B. (2008). "Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization." Chem Rev **108**(11): 4551-4627.

Greenaway, P. (1971). "Calcium regulation in freshwater mollusc *Lymnea stagnalis* (Gastropod: Pulmonata)." J. exp. Biol. **54**: 609-620.

- H -

Hall, T.-A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic acids symposium series **Vol. 41**: 95-98.

Hasegawa, Y., and Uchiyama, K. (2005). "cDNA cloning of shell matrix proteins from scallop shell." Fish. Sci. **71**: 1174–1178.

Hattan, S. J., Laue, T. M., Chasteen, N. D. (2001). "Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*." J Biol Chem **276**(6): 4461-4468.

Heger, A., and Holm, L. (2000). "Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences." Proteins **41**(2): 224-237.

Hennighausen, L. G., Sippel A.E. (1982). "Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of 'four-disulfide core' proteins." Nucleic Acids Res **10**(8): 2677-2684.

Herbaut, C., Hui, B., Herbaut, J., Remoissenet, G., Boucaud, E. (2000). "The pearl: isolation of outside bodies by molluscs: evolution of the graft and the pearl-sac in *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Lamellibranchia)." Bull Soc Zool France **125**: 63–73.

Huang, J., Zhang, C., Ma, Z., Xie, L., Zhang, R. (2007). "A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster." Biochim Biophys Acta **1770**(7): 1037-1044.

Hui, B. (2001). Etude de la différentiation cellulaire au cours de l'évolution du greffon puis du sac perlier chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* L. (Mollusque Lamellibranche). Papeete, Université de Polynésie française.

Hunt, S., and Oates, K. (1984). "Chitin helicoids accompany protein helicoids in the periostracum of a whelk, *Buccinum*." Tissue Cell **16**(4): 565-575.

- I -

Iancu, T. C. (2011). "Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism." J Neural Transm.

Inoue, N., Ishibashi, R., Ishikawa, T., Atsumi, T., Aoki, H., Komaru, A. (2010). "Can the Quality of Pearls from the Japanese Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) be Explained by the Gene Expression Patterns of the Major Shell Matrix Proteins in the Pearl Sac?" Mar Biotechnol (NY) **13**(1): 48-55.

Inoue, N., Ishibashi, R., Ishikawa, T., Atsumi, T., Aoki, H., Komaru, A. (2010). "Gene Expression Patterns in the Outer Mantle Epithelial Cells Associated with Pearl Sac Formation." Mar Biotechnol (NY).

Inoue, N., Ishibashi, R., Ishikawa, T., Atsumi, T., Aoki, H., Komaru, A. (2011). "Comparison of expression patterns of shell matrix protein genes in the mantle tissues between high- and low-quality pearl-producing recipients of the pearl oyster, *Pinctada fucata*." Zoolog Sci **28**(1): 32-36.

Isaji, S. (1995). "Defensive strategies agaisnt shell dissolution in bivalves inhabiting acidic environments : the case of Geloina (*Corbiculidae*) in mangrove swamps." The Veliger **38**: 235-246.

ISPF " (Institut de la Statistique de Polynésie Française) : http://www.ispf.pf."

Istin, M. (1970). "Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium chez les lamellibranches." Bull. Inform. Sci. Technol. CEA **144**: 53-80.

Istin, M., and Girard, J. P. (1970). "Carbonic anhydrase and mobilisation of calcium reserves in the mantle of lamellibranches." Calcif. Tissue. Res. **5**: 247-260.

- J -

Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Worheide, G., Degnan, B. M. (2006). "A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell." BMC Biol **4**: 40.

Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D., Degnan, B. M. (2010). "Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs." Mol Biol Evol **27**(3): 591-608.

Jolly, C., Berland, S., Milet, C., Borzeix, S., Lopez, E., Doumenc, D. (2004). "Zona localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda)." Mar Biotechnol (NY) **6**(6): 541-551.

Joly, J.-P., Cochennec-Laureau, N., Fougerouse, A., François, C. (2007). "Les réseaux d'épidémio-surveillance REPANUI et REPAMO." INRA Productions Animales **20**: 229-232.

Jones, D., and Wilson, M. J., Ed. (1986). Biomineralization in crustose lichens. In Biomineralization in Lower Plants ans Animals., Clarendon Press, Oxford.

Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cleon, I., Cochennec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2010). "Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization." BMC Genomics **11**: 613.

- K -

Katti, K. S., Katti, D. R. (2006). "Why is nacre so tough and strong ?" Materials Science and Engineering **26**(8): 1317-1324.

Killian, C. E., and Wilt, F. H. (1996). "Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus* embryonic spicules." J Biol Chem **271**(15): 9150-9159.

Knoll, A. H., Ed. (2003). Biomineralization and Evolutionary History. Washington, DC, In biomineralization, Vol 54, pp.329-350. Ed. by P. Dove, J. J. De Young, and S. Weiner. The Mineralogical Society of America.

Kong, Y., Jing, G., Yan, Z., Li, C., Gong, N., Zhu, F., Li, D., Zhang, Y., Zheng, G., Wang, H., Xie, L., Zhang, R. (2009). "Cloning and characterization of Prisilkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata*." J Biol Chem **284**(16): 10841-10854.

Kono, M., Hayashi, N., Samata, T. (2000). "Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*." Biochem Biophys Res Commun **269**(1): 213-218.

- L -

Le Gros Clark, W. E., Ed. (1945). The tissue of the body: An Introduction to the Study of Anatomy, Oxford at the Clarendon Press; Second Edition edition.

Le Pennec, M., Ed. (2010). Huître perlière et Perles de Tahiti, Edition HQ Imaging.

Lecointre, G., and Le Guyader, H., Ed. (2007). La classification phylogénétique du vivant.

Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L., Weiner, S. (2001). "Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM." J Struct Biol **135**(1): 8-17.

Li, C., Huang, J., Li, S., Fan, W., Hu, Y., Wang, Q., Zhu, F., Xie, L., Zhang, R. (2009). "Cloning, characterization and immunolocalization of two subunits of calcineurin from pearl oyster (*Pinctada fucata*)." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **153**(1): 43-53.

Linard, C. (2010). Écophysiologie et dynamique de la croissance coquillière de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* (L.) : analyses moléculaires et microstructurales, UPF (Université de Polynésie française). **Thèse de Doctorat:** 170.

Linard, C., Gueguen, Y., Moriceau, J., Soyez, C., Hui, B., Raoux, A., Cuif, J. P., Cochard, J. C., Le Pennec, M. and Le Moullac, G. (2011). "Calcein staining of calcified structures in pearl oyster *Pinctada margaritifera* and the effect of food resource level on shell growth." Aquaculture **313**(1-4): 149-155.

Liu, X., Liu, C., Chen, L., Sun, J., Zhou, Y., Li, Q., Zheng, G., Zhang, G., Wang, H., Xie, L., Zhang, R. (2011). "A New Method to Extract Matrix Proteins Directly from the Secretion of the Mollusk Mantle and the Role of These Proteins in Shell Biomineralization." Mar Biotechnol (NY).

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lowenstam, H. A., and Weiner, S., Ed. (1989). On Biomineralization, Oxford University Press, New York.

Lowenstam, H. A., Traub, W. and Weiner, S. (1984). "*Nautilus* hard parts: A study of the mineral and organic constituents." Paleobiology **10**: 268-279.

Lutz, R. A., and Rhoads, D. C. (1977). "Anaerobiosis and a theory of growth line formation." Science **198**: 1222-1227.

- M -

Ma, Z., Huang, J., Sun, J., Wang, G., Li, C., Xie, L., Zhang, R. (2007). "A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*." J Biol Chem **282**(32): 23253-23263.

Mann, K., Poustka, A. J., Mann, M. (2008). "The sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) test and spine proteomes." Proteome Sci **6**: 22.

Mann, K., Siedler, F., Treccani, L., Heinemann, F., Fritz, M. (2007). "Perlinhibin, a cysteine-, histidine-, and arginine-rich miniprotein from abalone (*Haliotis laevigata*) nacre, inhibits in vitro calcium carbonate crystallization." Biophys J **93**(4): 1246-1254.

Mann, K., Weiss, I. M., Andre, S., Gabius, H. J., Fritz, M. (2000). "The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity." Eur J Biochem **267**(16): 5257-5264.

Mann, K., Wilt, F. H., Poustka, A. J. (2010). "Proteomic analysis of sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) spicule matrix." Proteome Sci **8**: 33.

Mann, S. (1983). "Mineralization in biological systems." Struct. Bond. **54**: 125-174.

Mann, S. (2001). Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry, Oxford University Press.

Marie, B., Joubert, C., Belliard, C., Tayale, A., Zanella-Cléon, I., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2011). "Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters." Amino Acids.

Marie, B., Luquet, G., Bedouet, L., Milet, C., Guichard, N., Medakovic, D., Marin, F. (2008). "Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95 kDa calcium-binding glycoprotein." Chembiochem **9**(15): 2515-2523.

Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bedouet, L., Dubost, L., Alcaraz, G., Milet, C., Luquet, G. (2009). "Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*." Chembiochem **10**(9): 1495-1506.

Marin, F. (2009). Biominéralisation de la coquille des mollusques : origine, évolution, formation. Mémoire présenté par Frédéric MARIN pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR). UMR CNRS 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne**:** 257.

Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., Westbroek, P. (2005). "Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*." J Biol Chem **280**(40): 33895-33908.

Marin, F., and Luquet, G., Ed. (2007). Unusually Acidic Proteins in Biomineralization. In "Handbook of Biomineralization", Wiley-VCH.

Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E., Westbroek, P. (2000). "Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorphia)." J Biol Chem **275**(27): 20667-20675.

Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D. (2008). "Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution." Curr Top Dev Biol **80**: 209-276.

Marsh, M. E. (2003). "Regulation of CaCO(3) formation in coccolithophores." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **136**(4): 743-754.

Marshall, G. W., Jr., Marshall, S. J., Kinney, J. H., Balooch, M. (1997). "The dentin substrate: structure and properties related to bonding." J Dent **25**(6): 441-458.

Marxen, J. C., and Becker, W. (2000). "Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **127**(2): 235-242.

Marxen, J. C., Nimtz, M., Becker, W., Mann, K. (2003). "The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin." Biochim Biophys Acta **1650**(1-2): 92-98.

Masaoka, T., and Kobayashi, T. (2005). "Natural hybridization between *Pinctada fucata* and *Pinctada maculata* inferred from internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal RNA genes." Fish Sci 71:829– 836 **71**: 829– 836.

Matsushiro, A., and Miyashita, T. (2004). "Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system." J Bone Miner Metab **22**(3): 163-169.

Matsushiro, A., Miyashita, T., Miyamoto, H., Morimoto, K., Tonomura, B., Tanaka, A., Sato, K. (2003). "Presence of protein complex is prerequisite for aragonite crystallization in the nacreous layer." Mar Biotechnol (NY) **5**(1): 37-44.

Meyer, E., Aglyamova, G. V., Wang, S., Buchanan-Carter, J., Abrego, D., Colbourne, J. K., Willis, B. L., Matz, M. V. (2009). "Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFlx." BMC Genomics **10**: 219.

Michenfelder, M., Fu, G., Lawrence, C., Weaver, J. C., Wustman, B. A., Taranto, L., Evans, J. S., Morse, D. E. (2003). "Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains." Biopolymers **70**(4): 522-533.

Misogianes, M. J., and Chasteen, N. D. (1979). "A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*." Anal Biochem **100**(2): 324-334.

Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A. (1996). "A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9657-9660.

Miyamoto, H., Miyoshi, F., Kohno, J. (2005). "The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*." Zoolog Sci **22**(3): 311-315.

Miyamoto, H., Yano, M, Miyashita, T (2003). "Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod." j. Mollusc. Stud **69**: 87-89.

Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., Matsushiro, A. (2000). "Complementary DNA Cloning and Characterization of Pearlin, a New Class of Matrix Protein in the Nacreous Layer of Oyster Pearls." Mar Biotechnol (NY) **2**(5): 409-418.

Miyashita, T., Takagi, Y., Miyamoto, H, Matsushiro, A. (2002). "Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca Bivalvia)." Veliger **45**(3): 250-255.

Montagnani, C., Belliard, C., Hui, B., Levy, P., Cochennec-Laureau, N. (2006). Etude du déterminisme des défauts à la surface des perles de l' huître perlière, *Pinctada margaritifera.* Rapport de convention Ifremer-PRL, Ifremer-PRL. **n° 5.0117**.

Montagnani, C., Marie, B., Marin, F. , Belliard, C., Riquet, F., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Fleury, E., Gueguen, Y., Piquemal, D., and Cochennec-Laureau, N. (2011). "Pmarg-Pearlin is a matrix protein involved in nacre framework formation in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*." chembiochem **in press**.

Morse, J. W., Arvidson RS, Lüttge A. (2007). "Calcium carbonate formation and dissolution." Chem Rev **107**(2): 342-381.

Moura, G., Machado, J., Coimbra, J., Ed. (2003). Insights on nacre formation in the freshwater clam *Anodonta cygnea* (L.): an overview. In "Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application", (I. Kobayashi, and H. Osawa, Eds.).

Moura, G., Vilarinho, L., Carvalho Santos, A., and Machado, J. (2000). "Organic compounds in the extrapalliula fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal biomineralization process." Comp. Biochem. Physiol. B **125**: 293–306.

Mu, W., and Rinding, R. (1999). "Skeletal ultrastructure of the calcified red alga *Galaxaura oblongata*, Hainan Island, China." Review of Palaeobotany and Palynology **104**(3-4): 205-212.

- N – O -

Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2007). "Tyrosinase localization in mollusc shells." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **146**(2): 207-214.

Nakahara, H., Ed. (1991). Nacre formation in bivalve and gastropod mollusks. In "Mechanisms and phylogeny of Mineralization in Biological Systems", Springer-Verlag, Tokyo.

Nudelman, F., Chen, H. H., Goldberg, H. A., Weiner, S., Addadi, L. (2007). "Spiers Memorial Lecture. Lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida*." Faraday Discuss **136**: 9-25; discussion 107-123.

Nudelman, F., Shimoni, E., Klein, E., Rousseau, M., Bourrat, X., Lopez, E., Addadi, L., Weiner, S. (2008). "Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: an environmental- and cryo-scanning electron microscopy study." J Struct Biol **162**(2): 290-300.

Okazaki, M. (1986). "A study of calcium carbonate deposition in the genus *Padina* (Phaeophyceae, Dictyotales)." British Phycological Journal **21**(2): 217-224.

- P -

Patil, D. P., Atanur, S., Dhotre, D. P., Anantharam, D., Mahajan, V. S., Walujkar, S. A., Chandode, R. K., Kulkarni, G. J., Ghate, P. S., Srivastav, A., Dayananda, K. M., Gupta, N., Bhagwat, B., Joshi, R. R., Mourya, D. T., Patole, M. S., Shouche, Y. S. (2009). "Generation, annotation, and analysis of ESTs from midgut tissue of adult female Anopheles stephensi mosquitoes." BMC Genomics **10**: 386.

Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., Tsai, J., Quackenbush, J. (2003). "TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets." Bioinformatics (Oxford, England) **19**(5): 651-652.

Petit, H., Davis, W. L., Jones, R. (1979). "Morphological studies on the periostracum of the fresh-water mussel *Amblema* (Uniondae): light microscopy, transmission electron microscopy, and scanning electron microscopy." Tissue Cell **11**(4): 633-642.

Pouvreau, S. (1999). Étude et modélisation des mécanismes impliqués dans la croissance de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* au sein de l'écosystème conchylicole du lagon de l'atoll de Takapoto (Polynésie Française). Rennes, École Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes. **Doctorat d'université:** 217.

Pouvreau, S., and Prasil V. (2001). "Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: synthesis of several sampling designs conducted between 1994 and 1999." Aquatic Living Resources **14**(155-163).

Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A. (2000c). "Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia)." Aquatic Living Resources **13**: 37-48.

Pouvreau, S., Jonquieres, G., Buestel, D. (1999). "Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat." Aquaculture **176**: 295-314.

Pouvreau, S., Tiapari, J., Gangnery, A., Lagarde, F., Garnier, M., Teissier, H., Haumani, G., Buestel, D., Bodoy, A. (2000b). "Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera,* in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia)." Aquaculture **184**: 133-154.

- Q - R -

Quilang, J., Wang, S., Li, P., Abernathy, J., Peatman, E., Wang, Y., Wang, L., Shi, Y., Wallace, R., Guo, X., Liu, Z. (2007). "Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers." BMC Genomics **8**: 157.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-862.

Rusenko, K. W., Donachy, J. E., and Wheeler, A. P. (1991). Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the american oyster. In ''Surface Reactive Peptides and Polymers, Discovery and Commercialization''. ACS Symposium Series 444. E. (C. S. Sikes and A. P. Wheeler. Washington, DC**:** 107–124.

- S -

Saha, S., Sparks, A-B., Rago, C., Akmaev, V., Wang, C-J., Vogelstein, B., Kinzler, K-W., Velculescu, V-E. (2002). "Using the transcriptome to annotate the genome." Nat Biotechnol **20**(5): 508-512.

Sakakibara, M. (2006). "Comparative study of visuo-vestibular conditioning in *Lymnaea stagnalis*." Biol Bull **210**(3): 298-307.

Saleuddin, A. S. M., and Petit, H., Ed. (1983). The mode of formation and the structure of the periostracum. In: Saleuddin, A. S. M. and Wilbur, K. M. (eds) The Mollusca, Vol. 4., Academic Press, New York.

Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S. (1999). "A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*." FEBS Lett **462**(1-2): 225-229.

Sarashina, I., and Endo, K. (2001). "The Complete Primary Structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an Acidic Glycoprotein in the Shell Matrix of the Scallop *Patinopecten yessoensis*." Marine Biotechnology **3**: 362-369.

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. (2006). "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula." J Mol Med **84**(11): 901-910.

Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G., Griffiths, L. R. (2001). "Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR." Mol Cell Probes **15**(5): 307-311.

Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., Morse, D. E. (1997). "Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*." J Biol Chem **272**(51): 32472-32481.

Simkiss, K. (1977). "Biomineralization and detoxification." Calcif Tissue Res **24**(2): 199-200.

Simkiss, K., Ed. (1986). The process of In biomineralization in Lower Plants ans Animals - an overview .In Biomineralization in Lower Plants ans Animals., Clarendon Press, Oxford.

Simkiss, K. (1993). "Amorphous minerals in biology." Bull. Inst. Oceanogr. Monaco, n° special **14**: 49-54.

Skinner, H. C. W., and Jahren, A.H. , Ed. (2003). Biomineralization, Treatise on geochemistry, Elsevier.

Sournia, A., Ricard, M. (1976). "Données sur l'hydrologie et la productivité du lagon d'un atoll fermé (Takapoto, Iles Tuamotu)." Vie Milieu **26**: 243-279.

Southgate, P. C. a. Lucas., J. S. (2008). The Pearl Oyster, ELSEVIER.

Spurgeon, S. L., Jones, R.C., Ramakrishnan, R. (2008). "High Throughput Gene Expression Measurement with Real Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array." PLoS ONE **3**(2).

Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. (1997). "Structures of mollusc shell framework proteins." Nature **387**(5 june): 563-564.

Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., Nagasawa, H. (2004). "Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*)." Biochem J **382**(Pt 1): 205-213.

Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H. (2009). "An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation." Science **325**(5946): 1388-1390.

- T -

Taburiaux, J., Ed. (1983). Pearls: Their Origin, Treatment and Identification, Chilton Book Co; English-language ed edition (January 1986).

Takagi, R., and Miyashita, T. (2010). "Prismin: A New Matrix Protein Family in the Japanese Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) Involved in Prismatic Layer Formation." Zoological science **27**(5): 416-426.

Takeuchi, T., and Endo, K. (2006). "Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*." Mar Biotechnol (NY) **8**(1): 52-61.

Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachere, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvet, A., Jarque, S., Jollivet, D., Klages, S., Lapegue, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J. F., Zouros, E., Canario, A. (2008). "Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution." Gene **408**(1-2): 27-36.

Tanzarella, S., Ed. (2006). Perception et communication chez les animaux. Bruxelles, De Boeck Universités.

Taylor, J. D. (1973). "The structural evolution of the bivalve shell." Palaeontology **16**(519-534.).

Taylor, J. D., and Kennedy, W. J. (1969). "The influence of the periostracum on the shell structure of bivalve molluscs." Calcif Tissue Res **3**(3): 274-283.

Taylor, J. D., Kennedy, W. J., Hall, A. . (1969). "The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea-Trigonacea." Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool. **Suppl. 3:1–125.**

The-Gene-Ontology-Consortium (2007). "The Gene Ontology project in 2008." Nucleic Acids Research **36**.

Thielley, M. (1993). Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L) var. cumingii (Jameson), (mollusques, bivalves). Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould). UPF (Université de Polynésie française). **Thèse de Doctorat:** 233.

Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., Fritz, M. (2006). "Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals." Biophys J **91**(7): 2601-2608.

Trinkler, N., Labonne, M., Marin, F., Jolivet, A., Bohn, M., Poulain, C., Bardeau, J. F., Paillard, C. (2010). "Clam shell repair from the brown ring disease: a study of the organic matrix using confocal Raman micro-spectrometry and WDS microprobe." Anal Bioanal Chem **396**(2): 555-567.

Trombetti, G. A., Bonnal, R. J., Rizzi, E., De Bellis, G., Milanesi, L. (2007). "Data handling strategies for high throughput pyrosequencers." BMC Bioinformatics **8 Suppl 1**: S22.

Tsukamoto, D., Sarashina, I., Endo, K. (2004). "Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1175-1180.

- V -

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppo, B., Van Roy, N., De paepe, A., Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol. **3**(7).

Velayudhan, T. S., Chellam, A., Dharmaraj, S., Victor, A.C.C., and Alagarswami, K. (1992). "Histology of the mantle and pearl-sac formation in the Indian pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould)." Indian Journal Fisheries **41**(2): 70-75.

Velculescu, V. E. Z., L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1995). "Serial analysis of gene expression." Science **270**: 368, 371.
.

Venier, P., De Pitta, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., Bovo, G., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A., Lanfranchi, G. (2009). "MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences." BMC Genomics **10**: 72.

Vera, J. C., Wheat, C. W., Fescemyer, H. W., Frilander, M. J., Crawford, D. L., Hanski, I., Marden, J. H. (2008). "Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing." Mol Ecol **17**(7): 1636-1647.

- W -

Wada, K., and Komaru, A. (1996). "Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the pearl oyster." Aquaculture **142**(1-2): 25-32.

Waite, H., Ed. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. In ‘‘The Mollusca, Vol. 4: Physiology’’ (A. S. M. Saleuddin, and K. M. Wilbur, Eds.), Academic Press, New York.

Wang, N., Kinoshita, S., Riho, C., Maeyama, K., Nagai, K., Watabe, S. (2009). "Quantitative expression analysis of nacreous shell matrix protein genes in the process of pearl biogenesis." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.

Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." Nature Reviews, Genetic. **10**: 57-63.

Watabe, N., Ed. (1988). Shell structure. In: Trueman, E. R., Clarke, M. R. (Eds), The Mollusca, 11. Form and Function., Academic Press Inc., San Diego, (chapter 4), pp. 69-104.

Weber, A. P., Weber, K. L., Carr, K., Wilkerson, C., Ohlrogge, J. B. (2007). "Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing." Plant Physiol **144**(1): 32-42.

Weiner, S. (1986). "Organization of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth." CRC Crit Rev Biochem **20**(4): 365-408.

Weiner, S., Addadi, L. (1991). "Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation." Trends Biochem Sci **16**(7): 252-256.

Weiner, S., and Hood, L. (1975). "Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation." Science **190**(4218): 987-989.

Weiner, S., and Traub, W. (1984). "Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization." Phil. Trans. R. Soc. Lond. **304**: 425-434.

Weiss, I. M., Gohring, W., Fritz, M., Mann, K. (2001). "Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates." Biochem Biophys Res Commun **285**(2): 244-249.

Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., Fritz, M. (2000). "Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*." Biochem Biophys Res Commun **267**(1): 17-21.

Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981). "Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell." Science **212**: 1397-1398.

Wilbur, A. S. M., and Saleuddin K.M. (1983). Shell formation. The Mollusca. A. S. M. S. a. K. M. Wilbur. London, Academic press. **volume 4** 236-287.

Wilbur, K. M. (1984). "Many minerals, several phyla, and a few considerations." Am. Zool. **24**(839-845).

Wilbur, K. M., and Bernhardt, A. M. (1984). "Effect of amino acids, magnesium, and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: in vitro experiments." Biol. Bull. **166**: 251-259.

Williamson, R., and Chrachri, A. (2004). "Cephalopod neural networks." Neurosignals(13(1-2)): 87-98.

Wilt, F. H. (2002). "Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos." Zoolog Sci **19**(3): 253-261.

Wootton, J.-C., and Federhen, S. (1993). "Statistics of local complexity in amino acid sequences and sequence databases " Computers in Chemistry **17**: 149-163.

Wustman, B. A., Weaver, J. C., Morse, D. E., Evans, J. S. (2003). "Structure-function studies of the lustrin A polyelectrolyte domains, RKSY and D4." Connect Tissue Res **44 Suppl 1**: 10-15.

- Y -

Yan, Z., Fang, Z., Ma, Z., Deng, J., Li, S., Xie, L., Zhang, R. (2007). "Biomineralization: functions of calmodulin-like protein in the shell formation of pearl oyster." Biochim Biophys Acta **1770**(9): 1338-1344.

Yan, Z., Jing, G., Gong, N., Li, C., Zhou, Y., Xie, L., Zhang, R. (2007). "N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite in vitro." Biomacromolecules **8**(11): 3597-3601.

Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2006). "Shematrin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **144**(2): 254-262.

Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., Miyamoto, H. (2007). "A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*." Biochem Biophys Res Commun **362**(1): 158-163.

Yin, Y., Huang, J., Paine, M. L., Reinhold, V. N., Chasteen, N. D. (2005). "Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function." Biochemistry **44**(31): 10720-10731.

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. N., Jr. (2006). "Statistical analysis of real-time PCR data." BMC Bioinformatics **7**: 85.

- Z -

Zagrobelny, M., Scheibye-Alsing, K., Bjerg-Jensen, N., Lindberg-Moller, B., Gorodkin, J., Bak, S. (2009). " 454 pyrosequencing based transcriptome analysis of Zygaena filipendulae with focus on genes involved in biosynthesis of cyanogenic glucosides. ." BMC Genomics **10(1): 574**.

Zhang, B., Wustman, B. A., Morse, D., Evans, J. S. (2002). "Model peptide studies of sequence regions in the elastomeric biomineralization protein, Lustrin A. I. The C-domain consensus-PG-, -NVNCT-motif." Biopolymers **63**(6): 358-369.

Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Liu, X., Zhang, R. (2006). "A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*." Biochem Biophys Res Commun **344**(3): 735-740.

Zhang, Y., Liao, E. (2009). "Advances of non-invasive detections of bone microarchitecture." Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi **26**(2): 425-428.

Zhang, Y., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Pu, R., Chen, L., Zhang, R. (2003). "A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **135**(3): 565-573.

Title

Global transcriptomic approach for the identification of gene encoding proteins implicated in the biomineralization process in *P. margaritifera* and the development of pearl growth and quality biomarkers for the selection of grafting donor pearl oysters.

Abstract

French Polynesian cultured pearls are the product of the "allogenic" grafting and rearing of *Pinctada margaritifera* var. *cumingii* in its natural environment. Grafting is a procedure during which the graft, a small piece of mantle epithelium from a donor pearl oyster, is inserted into the "pearl pouch" of a receiving pearl oyster together with a nacre bead known as the nucleus. Once inserted into the receiving oyster, the epithelial cells of the implanted graft actively divide to surround the nucleus forming the pearl sac. The pearl sac is the tissue responsible for the mineralization processes (secretion of calcium carbonate $CaCO_3$ crystals) leading to the pearl formation. Pearl culture is a fundamental part of the Polynesian economy. However, this industry has been in crisis for the past decade. Increasing the percentage of high quality pearls therefore represent a considerable advantage for the professionals and the the future of the industry. In this context, the main objective of this PhD project is to study the molecular basis of the biomineralization process in *P. margaritifera* pearl oysters in order to identify pearl growth and quality biomarker genes and develop tools to assess and select donor oysters with optimised mineralization capacities.

A global transcriptomic approach has been undertaken in order to identify genes expressed in biomineralizing tissues involved in shell (mantle) and pearls (grafts and pearl sacs) formation. An Expressed Sequence Tag (EST) pyrosequencing of the calcifying mantle led to the constitution of a catalog of 82 *P. margaritifera* biomineralization-related protein sequences. The SAGE technique (Serial Analysis of Gene Expression) has been developed on graft and pearl sac cells, and led to the identification of more than 5000 genes expressed in the tissues responsible for pearl formation. In parallel, within the context of a large research program aiming at enhancing pearl quality (GDR ADEQUA), we combined the EST approach to a global proteomic analysis of proteins isolated from shell and pearls organic matrix. This approach led to the identification of 369 proteins composing the calcified structures from *P. margaritifera*. Finally, the exploitation of the transcriptomic and proteomic databases allowed us to identify 268 potential pearl growth and quality biomarkers, out of which 205 are encoding still unknown proteins in *P. margaritifera*.

The validation of those potential biomarkers was undertaken by analyzing the correlation between the level of expression of those genes and the quality of pearls, in parallel with the type of the calcium carbonate polymorph produced. This joint analysis led to the identification of 22 pearl growth and quality biomarkers in *P. margaritifera*. Those biomarkers evidenced will be used as tools to assess and select grafting oysters with optimised mineralization capacities in the context of genetic improvement of donor pearl oysters work carried out by Ifremer and the The Service de le Perliculture in French Polynesia.

Key words

Biomineralization, pearls, quality, *Pinctada margaritifera*, organic matrix, shell, biomarkers gene, global transcriptomic approach, global proteomic approach, EST database, SAGE database.

Titre

Approche transcriptomique globale pour l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *Pinctada margaritifera* et le développement de biomarqueurs appliqués à la sélection d'huîtres perlières donneuses de greffons.

Résumé

La perle de culture de Polynésie française provient de la greffe « allogénique » et de l'élevage en milieu naturel de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*. La greffe consiste à introduire dans la poche perlière d'une huître perlière receveuse une portion de manteau (greffon) d'une huître perlière donneuse et une bille de nacre (nucléus). Le greffon évolue en sac perlier, tissu responsable des processus de minéralisation menant à la formation de la perle. La perliculture, qui occupe une place primordiale dans l'économie polynésienne, est un secteur en crise depuis une dizaine d'année. Une augmentation du pourcentage de perles de bonne qualité constitue donc un atout considérable pour la profession et l'économie du pays. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était d'étudier les bases moléculaires des processus de biominéralisation *chez* l'huître perlière *P.* margaritifera afin d'identifier des gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle, exploitables en tant qu'outils d'évaluation pour la sélection d'huîtres donneuses de greffons de « haute propriété minéralisatrice ».

Une approche globale d'analyse du transcriptome a été mise en place afin d'identifier des gènes exprimés au sein des cellules épithéliales des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille (manteau) et de la perle (greffons et sacs perliers). Cette approche a été menée grâce à la constitution d'une banque EST de manteau et de quatre banques SAGE de greffons et de « poches perlières ». La constitution de la banque EST de manteau a permis d'identifier un catalogue de 82 gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans la biominéralisation de la coquille chez *P. margaritifera*. La constitution des banques SAGE de greffons et de poches perlières a permis d'identifier plus de 5.000 séquences de gènes exprimées au sein de tissus responsables des processus de biominéralisation de la perle. En parallèle, dans le cadre du GDR ADEQUA (« Amélioration de la Qualité des perles de Polynésie française »), une approche protéomique globale des constituants de la coquille et des perles a permis d'identifier 369 séquences protéiques comme constituants des structures minéralisées chez *P. margaritifera*. Au final, l'exploitation de ces banques de données protéomique et transcriptomiques a permis de sélectionner un ensemble de 268 gènes biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle, dont 205 codent des protéines inconnues à ce jour chez *P. margaritifera*.

La validation des biomarqueurs candidats en tant que biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle a consisté à corréler le niveau d'expression de ces gènes à la qualité des perles et la nature du polymorphe de carbonate de calcium produit. Cette analyse conjointe a abouti à la sélection d'un ensemble de 22 gènes biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*. Les biomarqueurs de la croissance et de la qualité de la perle pourront être directement exploités dans le cadre des travaux d'amélioration génétique des huîtres perlières donneuses menés par l'Ifremer et le Service de la Perliculture de Polynésie française.

Mots clefs

Biominéralisation, perles, qualité, *Pinctada margaritifera*, matrice organique, coquille, gènes biomarqueurs, approche transcriptomique globale, approche protéomique globale, banque EST, banques SAGE.