

Bourse Doctorale IFREMER 2013-2016

Déterminisme génétique de caractères perlicoles d'intérêts chez l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* : du phénotype aux gènes.

• **Le contexte scientifique ou technologique (avec principales références bibliographiques)**

La perliculture en Polynésie Française, basée sur l'exploitation de l'huître perlière *P. margaritifera*, s'est considérablement développée au cours de ces trente dernières années et est devenue une ressource indispensable à l'économie de la Polynésie française (seconde ressource après le tourisme). Schématiquement, la valeur marchande d'une perle peut-être décomposée en 6 caractères d'intérêt perlicoles: 1) le poids/ l'épaisseur de perle, 2) les défauts de surface (nombre de piquûre), 3) le lustre (mate ou brillant), 4) la classification de la perle (A, B, C, D et rebut) réalisé par la maison de la perle, et les composantes de la couleur de perle 5) « foncitude » (clair, modéré et foncé) et 6) la pigmentation principale. Ces caractères dépendent de plusieurs paramètres incluant leurs propriétés intrinsèques: composition chimique, propriétés physiques, pigmentations, interactions... Ces propriétés sont sous la dépendance de différents facteurs dont le génotype, les effets environnementaux et leurs interactions. Ainsi, la qualité de la perle peut donc être résumée sous la forme d'une équation multifactorielle conditionnelle: $Q_p = f(\text{caractère d'intérêt perlicole} / G, E, I)$ où G est l'effet du génotype, E l'effet de l'environnement, et I les interactions entre ces différents facteurs. Par rapport aux objectifs scientifiques du laboratoire et aux résultats récemment obtenus, les travaux engagés sur l'amélioration de la qualité des perles nécessitent maintenant de définir les effets de ces différents facteurs et leurs importance.

Il est aussi clairement établi que l'amélioration de la valeur marchande des perles passe par la sélection génétique des huîtres donneuses de greffon. En effet, des xénogreffes entre *P. maxima* et *P. margaritifera* ont montré: 1) l'expression de gènes de biominéralisation de l'huître donneuse dans l'huître receveuse (McGinty *et al.*, 2010) et 2) l'influence espèce-spécifique de l'huître donneuse sur les caractères d'intérêts perlicoles (McGinty *et al.*, 2011). L'importance de l'huître donneuse chez *P. margaritifera*, vis-à-vis de la couleur de la perle produite, est aussi illustrée par la relation directe avec la coloration de la nacre, présente au niveau de la face interne de la coquille de l'huître donneuse. Les premiers résultats sur la sélection génétique familiale pour ce caractère montrent l'existence d'une propension marquée au sein des familles à donner à l'issu de la greffe une tendance de couleur plutôt qu'une autre au niveau des perles produites (Tayale *et al.*, 2012; Ky *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, et avec comme objectif final d'améliorer la propension à obtenir des perles de qualité, les objectifs de cette thèse sont les suivants:

1) étudier le déterminisme génétique (héritabilités et corrélations génétiques) et l'importance des effets G, E et I des caractères d'intérêt perlicole, au travers de greffes expérimentales. Cette étude permettra de définir les conséquences induites par la sélection de l'huître donneuse de greffon (gains génétiques possible). Un focus particulier sera effectué sur 2 caractères à effet génétique fort (la couleur et le poids de perle) au travers de génération de lignées spécifiques "couleur" et "croissance améliorée";

2) identifier les gènes impliqués dans l'expression des caractères perlicoles d'intérêt, par une double approche gène candidat à l'échelle familiale (expression différentielle sur les lignées) et à l'échelle des population naturelle (polymorphisme de séquence). Ces identifications vont reposer en partie sur les banques d'expression (protéomique et transcriptomique SSH et SAGE) développées dans le cadre des travaux de thèses de C. Joubert (Joubert et al 2010 et Joubert 2011) à l'Ifremer sur les biomarqueurs de qualité et de croissance des perles et de S. Lemer (Lemer, Planes 2011) au CRIOBE (CNRS/EPHE) sur le déterminisme génétique de la couleur (*via* l'étude de l'albinisme).

- ***l'intérêt général ainsi que l'intérêt pour l'Ifremer***

Avec plus de 90% du marché, la Polynésie française est le premier producteur mondial de perles de couleur. L'activité perlicole, forte de 571 concessions perlicoles (fin 2010), est dispersée sur 27 îles polynésiennes, principalement dans l'archipel des Tuamotu (70%). Cette dissémination contribue notablement non seulement à inverser le flux migratoire des îles vers Tahiti mais également à l'aménagement du territoire, avec le développement structurel de ces îles perlicoles. Les dernières estimations statistiques (Points Forts Etudes n°8/2010 – ISPF) recensent ainsi 3 700 personnes vivant de cette activité. Cependant, depuis 2001, ce secteur connaît ainsi une décroissance conjoncturelle et se retrouve dans une situation difficile. Le prix de la perle s'est effondré et ne cesse de décroître. Après des années 2008 et 2009 déjà en recul par rapport aux années précédentes, l'année 2010 a marqué un réel naufrage de la perliculture polynésienne. De très nombreuses fermes sont en faillite ou ont d'ores et déjà arrêté leur activité, générant des pertes d'emplois conséquentes pour le Pays. Si cette forte crise trouve aussi son origine dans une conjoncture internationale défavorable, l'inorganisation des ventes, le marché de plus en plus concurrentiel, la fraude, une baisse significative de la qualité moyenne des perles exportées, sont autant de facteurs qui alimentent le déclin. Dans ce contexte, la recherche, qui n'avait pas bénéficié jusqu'à présent de tout l'intérêt nécessaire des autorités locales, peut contribuer à sécuriser et pérenniser la production, tout en fournissant des outils d'amélioration de la rentabilité des entreprises.

Cette thèse s'inscrit au cœur des activités de recherche de l'Ifremer, qui ont pour objectif premier l'amélioration de la qualité des perles et qui passe par la sélection d'huitres donneuses de greffon. Les professionnels et la Direction des Ressources Marines de Polynésie française sont pleinement impliqués dans cette voie d'amélioration menée par l'Ifremer. Par ailleurs, le sujet de thèse s'inscrit dans le cadre d'un financement sous convention avec la Direction des Ressources Marines.

- ***l'originalité et le caractère innovant des recherches***

L'originalité et le caractère innovant résident dans la multidisciplinarité des approches (terrain *in situ*, génétique, moléculaire et physiologique) et les retombées qui seront à la fois: 1) **appliquée**: génération de lignée couleur et croissance, validation de leur potentielle pour l'amélioration des caractères d'intérêts perlicoles dans le cadre de greffes expérimentales et de la mise en place de biomarqueurs diagnostiques comme aide à la sélection, mais aussi 2) **fondamentales**: estimation des paramètres génétiques et gain génétique en sélection, validation et identification des gènes et du polymorphisme associé aux différentes voies de biosynthèse régulant la variabilité des caractères.

- ***les approches méthodologiques***

Génération de lignées élités

Le contrôle des croisements dirigés chez l'huître perlière *P. margaritifera*, permettant la création de familles possédant des caractères d'intérêt, est une étape maîtrisée par l'Ifremer. Les rendements de production ont été améliorés au travers d'une zootechnie larvaire en circuit ouvert. Des lignées familiales spécifiques de couleur (colorées et albinos) et d'accessions géographiques différentes seront produites à partir de géniteurs choisis. Ces lignées seront sélectionnées sur des critères de couleur de coquille et de croissance (tête de lot et queue de lot) au stade juvénile (45 jours post-éclosion et avant mélanisation de la coquille). Ces sélections seront corrélées, au stade adultes, à la capacité des lignées à produire des perles: 1) d'une couleur donnée quasi exclusive (lignée couleur) et 2) présentant une épaisseur de nacre plus importante en relation à une potentiel minéralisateur amélioré (lignée croissance).

Le succès reproducteur des individus pourvus de phénotypes et génotypes (variation du niveau d'expression de gènes) différents sera évalué au travers des ségrégations en fonction des combinaisons de croisement. Les gènes responsables de la variabilité des caractères adaptatifs pourront être étudiés. En effet, un différentiel au niveau de la contribution des individus à la génération suivante (valeur adaptative) peut-être observé; les individus les plus adaptés contribuant de façon majoritaire.

Génétique quantitative et greffes expérimentales

Le déterminisme génétique des caractères d'intérêt perlicole sera évalué, au travers de l'estimation des valeurs d'héritabilité associée, dans le cadre de greffes expérimentales parents/descendants (régression). De même, les effets G (génotype), E (environnement) et I (interactions GxE) seront évalués.

Trois greffes expérimentales principales (conduites avec nos partenaires privés), seront menées afin d'identifier les facteurs qui contribuent à expliquer la diversité des phénotypes observés:

- Greffe parents/ descendants pour l'évaluation du déterminisme génétique des caractères;
- Greffe des lignées couleur et croissance produites pour la validation génique de leur potentiel;
- Greffe spatio-temporelle (4 sites contrastés: Ahe, Rangiroa (archipels des Tuamotus), Tahaa (Archipel de la Société) et Rikitea (Archipels des gambiers)) pour l'évaluation des facteurs de l'environnement et l'expression génique associée à l'âge du greffon.

Les récoltes des perles seront effectuées au maximum 15 mois post-greffe.

Génomique fonctionnelle, approche « gène candidat »

Une approche « gène candidat » sera entreprise, afin d'identifier les gènes impliqués dans l'expression des caractères d'intérêt perlicole. Cette approche repose sur l'exploitation des banques génomique développées. (Joubert et, 2010 et 2011 et Lerner 2011). Sans information sur les positions des gènes au sein du génome (QTL et clonage positionnel chez *P. margaritifera*), deux types de candidats, en liaison avec le caractère phénotypique relevé, peuvent être identifiés: 1) les candidats fonctionnels, impliqués dans des voies physiologiques de biosynthèse connues, et 2) les candidats expressionnels, différenciellement exprimés (niveau des transcrits).

L'implication des gènes candidats identifiés préalablement sera étudiée par PCR en temps réel à deux échelles: 1) familiale, sur les lignées générées artificiellement et sur les individus ayant participé aux greffes expérimentales, et 2) populationnelle, sur un échantillonnage englobant des individus issus de provenances géographiques différentes. Ce dernier point sera étudié, car une des sources de variabilité responsable de la majeure partie des différences inter-individuelles observées dans la nature est le polymorphisme de séquences (un gène peut être exprimé de façon totalement identique, mais présenter des modifications post-traductionnelles et donc impacter sur les caractères perlicoles d'intérêt). Etant donné l'aire de distribution étendue de *P. margaritifera*, ces dernières doivent faire face à des conditions environnementales très variables. Une variabilité génétique significative pourrait donc être maintenue au sein des populations pour assurer une adaptabilité optimale à cette diversité de conditions.

- ***identification des avancées qui donneront lieu à publication***

Les avancées qui donneront lieu à publication sont liées au caractère multidisciplinaire de l'approche développée et concerneront :

- la génétique quantitative des caractères d'intérêts perlicoles;
- l'identification des gènes en relation avec l'expression des caractères d'intérêts perlicoles;
- la génétique des populations sur le polymorphisme allélique des gènes identifiés.

- ***les applications possibles***

- Elaboration de marqueurs moléculaires « prédictifs » utilisables en sélection à partir des gènes identifiés.
- Mise sur le marché (modalités à définir avec le service de la perliculture et les professionnels impliqués) de lignée élite d'huîtres perlières donneuses de greffon certifiées.

- ***les collaborations avec des laboratoires extérieurs***

Collaboration avec le CRILOBE (Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement, USR 3278 CNRS - EPHE, BP 1013 - 98 729, Papetoai, Moorea, Polynésie française).

• **Echéancier prévisionnel des travaux**

		Echéancier prévisionnel des travaux majeurs												
		2013	2014				2015				2016			
Approches	Objectifs	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Génération lignées élités	Production des descendants													
Génétiques quantitatives et greffes expérimentales	Validation des lignées							Couleur/croissance Grefe récolte						
	Etude des paramètres génétiques	Parents Grefe récolte												
							Descendants Grefe récolte							
	Effet de l'environnement et de l'âge	Huître donneuse d'un an d'âge Grefe récolte												
					Huître donneuse de deux ans d'âge Grefe récolte									
Génomique fonctionnelle	Gènes candidats													
	Rédaction													

 • **Références bibliographiques**

- Joubert C, Piquemal D, Marie B, Manchon L, Pierrat F, Zanella-Cleon I, Cochenne-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
- Joubert 2011. Thèse. 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.
- Tayale A., Gueguen Y., Treguier C, Le Grand J., Cochenne-Laureau N., Montagnani C., Ky C.L., (2012) Evidence of donor effect on cultured pearl quality from a duplicated grafting experiment on *Pinctada margaritifera*. using wild donors *Aquat. Living Resour.* 25, 269–280.
- Ky CL, Blay C, Sham-Koua M, Vanaa V, Lo C, Cabral P (2013) Family effect on cultured pearl quality in black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* and insights for genetic improvement. *Aquatic Living Resource*, 26, 133-145.
- Lemer S. 2011. Connectivité génétique et histoire démographique de populations en milieu fragmenté : des outils pour estimer les conséquences de l'élevage sur les stocks naturels d'huîtres perlières en Polynésie Française. Thèse de l'EPHE. 220p.
- Lemer S, Rochel E and Planes S. 2011. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of heredity*, 102: 243-246.
- Lemer S. and Planes S., Soumis. Reconstructing the historical demography of inner reef sessile marine invertebrate populations in relation to Pleistocene sea-level fluctuations in the South Pacific. Article soumis dans *Evolution*
- Lemer S. and Planes S., Soumis. Genetic diversity and connectivity of the black lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, across the French Polynesian archipelagos as revealed by microsatellite markers. Article soumis dans *Molecular Ecology*.
- Lemer S. and Planes S., Soumis. Effect of Artificial Propagation (or Commercial translocation) on the Genetic Diversity and Population Structure of wild stocks of Black-lipped Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera*. Article soumis dans *Molecular Ecology*.
- McGinty et al., 2010 Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *P. maxima* and *P. margaritifera*: effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution, *Aquaculture* 302 (2010), pp. 175–181.
- McGinty et al., 2011 Diagnostic genetic marker unravel the interplay between host and donor oyster contribution in cultured pearl formation, *Aquaculture* 304 (2011), pp. 20-24.
- Planes S and Lemer S. 2011. Individual-based analysis opens new insights into understanding population structure and animal behaviour. *Molecular Ecology*, 20:187-189.