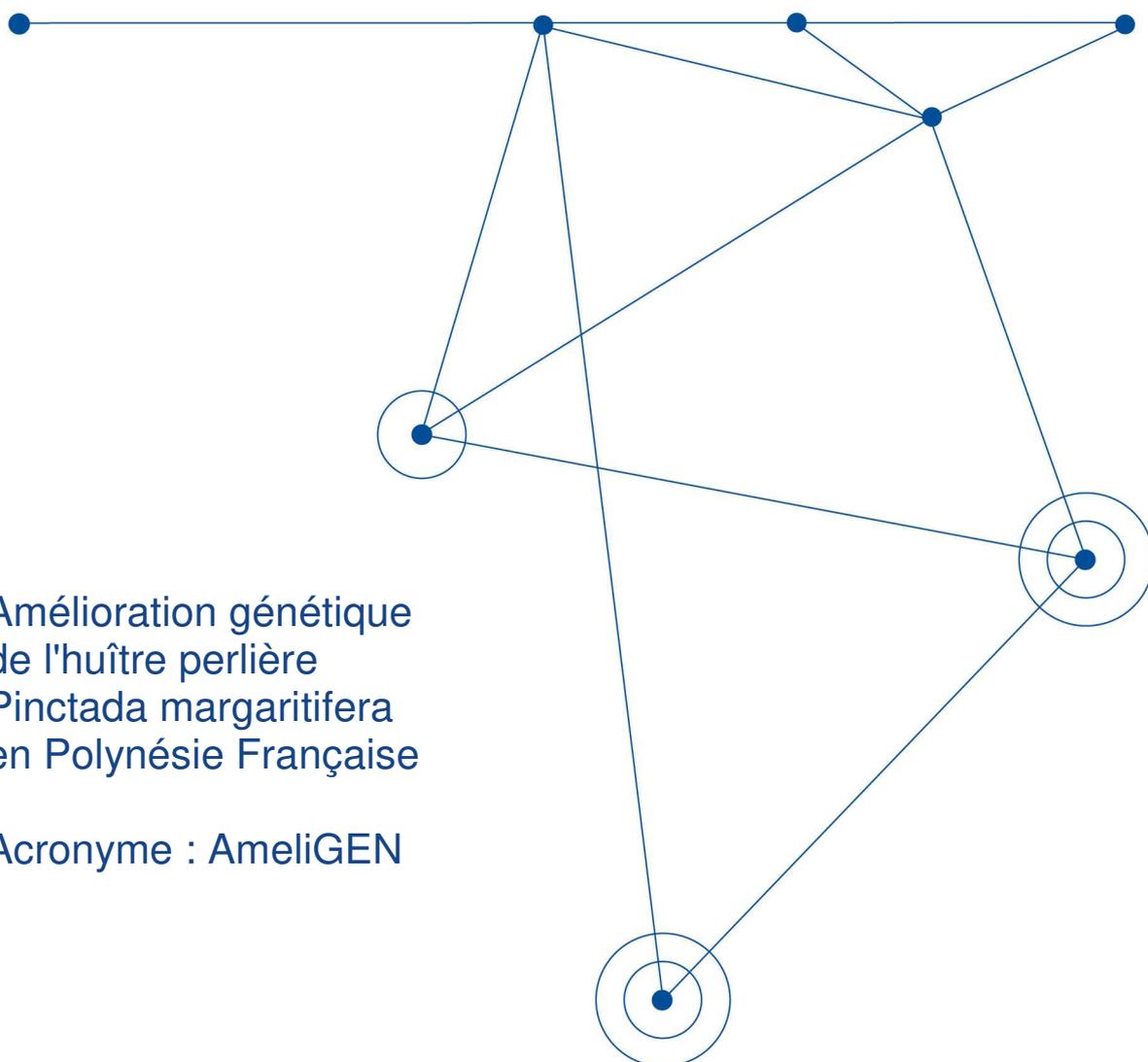


CONVENTION AMELIGEN RAPPORT INTERMEDIAIRE #2 N°/MDA/DRMM DU 11/2016



CONVENTION AMELIGEN

RAPPORT INTERMEDIAIRE #2

N°10065/MEI/DRMM DU 21/12/2016

Amélioration génétique de l'huître perlière
***Pinctada margaritifera* en Polynésie Française**
Acronyme : AmeliGEN



Fiche documentaire

Titre du rapport : Amélioration génétique de l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> en Polynésie Française Acronyme : AmeliGEN	
Référence interne : RBE/RMPF/LABO AN-NUM Diffusion : <input type="checkbox"/> libre (internet) <input checked="" type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d'embargo : 2025/01/01 <input type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	Date de publication : 2018/11/30 Version : 1.0.0 Référence de l'illustration de couverture REISSER Céline/ L'huître perlière « Taikanapa » dont le génome a été séquencé. Juin 2018 Langue(s) : Française
Résumé/ Abstract : AmeliGEN est un projet de recherche et développement portant sur l'amélioration génétique de l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> . AmeliGEN s'inscrit dans le cadre du contrat de Projet Etat - Polynésie 2015-2020 pour une durée de 4 ans (2016 à 2019 – volet Ressources Primaires). Ce projet est réalisé en partenariat avec les groupements d'intérêt économique (GIE), organisateurs des ventes aux enchères de Tahiti et fédérant la majorité des perliculteurs. Grâce à la filière perlicole, la réalisation d'AmeliGEN repose sur une plate-forme expérimentale sans précédent, mis en place par et pour les producteurs, dispositif couvrant l'ensemble des sites perlicoles et les 5 archipels de Polynésie française, où l'ensemble des expérimentations seront déployées sur 14 sites expérimentaux. Trois axes de recherche majeurs complémentaires vont permettre de : 1) initier la mise en place d'un vaste programme de sélection génétique en vue de produire des lignées élites d'huîtres perlières, 2) analyser le génome de <i>P. margaritifera</i> et particulièrement les gènes impliqués dans l'expression de la qualité des perles, et 3) étudier les capacités d'adaptation de l'huître perlière à l'environnement pour une expression optimisée de la qualité des perles de culture.	
Mots-clés/ Key words : <i>Pinctada margaritifera</i> ; génome ; Biodiversité ; Australes ; Marquises	
Comment citer ce document : Ky Chin-Long (2017). Amélioration génétique de l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> en Polynésie Française. Acronyme : AmeliGEN. Rapport intermédiaire #1 n°10065/MEI/DRMM du 21/12/2016.	
Disponibilité des données de la recherche : Confidentielles	
DOI : sans objet	

Commanditaire du rapport :

La Direction des Ressources marines et minières
 B.P. 20, 98.713 Papeete –TAHITI
 Polynésie française
 Immeuble Lecaill, 2ème étage, Fare Ute
 Tél. : (689) 40 50 25 50, Fax. : (689) 40 43 49 79
 Email : drm@drm.gov.pf , site internet : www.peche.pf

Nom / référence du contrat :

Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX)
 Rapport définitif (réf. interne **du rapport intermédiaire** : R.DEP/UNIT/LABO AN-NUM/ID ARCHIMER)

Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit (programme européen, campagne, etc.) :

Convention de recherche avec la DRMM

Auteur(s) / adresse mail

KY Chin-Long / chinky@ifremer.fr

Affiliation / Direction / Service, laboratoire

RBE/ RMPF

Encadrement(s) : sans objet

Destinataire :

La Direction des Ressources marines et minières
 B.P. 20, 98.713 Papeete –TAHITI
 Polynésie française
 Immeuble Lecaill, 2ème étage, Fare Ute
 Tél. : (689) 40 50 25 50, Fax. : (689) 40 43 49 79
 Email : drm@drm.gov.pf , site internet : www.peche.pf

Validé par :

Benoît BELIAEFF
 Directeur du Centre Ifremer du Pacifique
 Responsable de l'unité RMPF

et

Dr Serge PLANES (Dir)
 USR 3278 CNRS - EPHE
 Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) BP 1013 - 98 729,
 Papetoai, Moorea, Polynésie française
 Tel : (689) 40 56 13 45, Fax : (689) 40 56 28 15
 e-mail : serge.planes@criobe.pf
www.criobe.pf

Sommaire

1. Introduction	p5
2. WP1 Coordination	p5
3. WP2 Sélection génétique	p6
3.1 Ressources perlicoles	p6
3.2 Reproduction	p9
3.3 Production de descendants G1	p9
4. WP3 Plasticité génétique	p10
4.1 Cartographie de la qualité	p10
4.2 Analyses statistiques	p10
4.3 Plasticité (Thèse)	p11
5. WP4 Génétique moléculaire	p13
5.1 Développement de SNP (post-doc)	p13
5.2 Séquençage du génome	p16
5.3 Analyses du transcriptome (Thèse)	p17
6. Références	p26

1. Introduction

Pour rappel, les activités d'AmeliGEN s'organisent autour de 4 « workpackages » (WP). Le WP1 concerne la coordination du projet. Le WP2 s'intéresse particulièrement à des origines non encore étudiées, les huîtres perlières des Australes et des Marquises. Il s'articule autour de 3 actions: a) la gestion des ressources perlicoles, en s'intéressant particulièrement aux huîtres originaires des Australe et des Marquises, b) l'étude des cycles de reproduction, et c) la production en éclosérie de descendant G1 (à partir des origines sauvages des Australes et des Marquises). Le WP3 s'intéresse à l'adaptation génétique et aux paramètres influençant la qualité des perles, *via* : g) la cartographie de la qualité des perles, h) l'analyse statistique multi-variée des composantes de culture et de qualité, et i) la génomique adaptative. Enfin, le WP4 vient renforcer les connaissances du génome de *P. margaritifera* au travers du : d) développement de marqueur moléculaire, e) le séquençage de son génome, et f) l'analyse de l'expression de gènes de biominéralisation.

L'année 2018 d'AmeliGEN est marquée par la finalisation du WP2 et du séquençage/ assemblage du génome de *P. margaritifera* (hors valorisation scientifique).

Le tableau 1 ci-dessous illustre selon un découpage action par action, l'état d'avancement actuel (fin 2018) du projet sur les quatre années de son financement.

		2016				2017				2018				2019				avancée
WP1	Coordination	[Coloré orange]																en cours
WP2	Ressources perlicoles	[Coloré bleu]																réalisé
	Reproduction	[Coloré bleu]																réalisé
	Production de descendants G1	[Coloré bleu]																réalisé
WP3	Cartographie de la qualité	[Coloré vert]																en cours
	Analyses statistiques	[Coloré vert]																en cours
	Plasticité (Thèse)	[Coloré vert]																en cours
WP4	Développement de SNP (post-doc)	[Coloré rose]																en cours
	Séquençage/ assemblage du génome	[Coloré rose]																réalisé
	Analyses du transcriptome (Thèse)	[Coloré rose]																réalisé

Tableau 1. Découpage des actions de recherche réalisées et en cours de la convention AmeliGEN.

2. WP1 Coordination

En 2018, des réunions ont été réalisées au CRIOBE à Moorea et des points réguliers sur les analyses bioinformatiques en lien à l'assemblage du génome ont été réalisés en visioconférence avec l'équipe Ifremer de Montpellier et la cellule bioinformatique de Brest.

3. WP2 Sélection génétique

3.1 Ressources perlicoles

Les individus collectés les années précédentes aux Australes et aux Marquises ont fait l'objet d'analyses en matière de diversité génétique, en comparaison à des populations des Tuamotu (3 atolls cibles : Aratika, Takapoto et Katiu). L'objectif d'une telle étude est de mettre le cas échéant en évidence un isolement génétique des populations collectées aux Australes et aux Marquises, en comparaison à celles de culture originaires des Tuamotu. Le tableau 2 illustre les effectifs en place.

Archipel	Ile/ atoll (Population)	Coordonnées GPS (Lat/Long)	N
Marquises	Nuku Hiva deep (NHV-D)	08°50'38.6880"S / 140°08'38.2380"W	40
	Nuku Hiva shallow (NHV-S)	08°50'38.6880"S / 140°08'38.2380"W	40
	Ua Pou (UAP)	09°22'51.9492" / 140°04'26.5368"W	39
Tuamotu	Aratika (ART)	15°32'34.7172"S / 145°31'54.6852"W	50
	Takapoto (TKP)	14°37'41.2320"S / 145°12'16.3332"W	40
	Katiu (KAT)	16°25'30.6732"S / 144°22'08.7888"W	40
Australes	Raivavae (RVV)	23°51'44.8236"S / 147°39'38.0664"W	40

Tableau 2. Site d'échantillonnage (archipels, îles, atolls et coordonnées GPS) des huîtres perlières *P. margaritifera* collectées dans le cadre de l'analyse de la diversité génétique.

Pour ce faire, neuf marqueurs microsatellites spécifiques de *P. margaritifera* ont été utilisés afin de génotyper les 289 individus (Tableau 3). Les différents paramètres relatifs aux estimations de diversité génétique sont présentés dans le tableau 4. La richesse allélique (A_r) des populations des Marquises est légèrement inférieure, tandis que celle des Australes est la plus élevée (Tableau 4). Cette tendance n'est pas observée lorsque l'on considère les valeurs de H_o/H_e . En effet, même si la population des Australes présente la plus grande richesse allélique, et l'une des valeurs les plus élevées de H_e , elle présente cependant la plus faible valeur de H_o (0,488). Pour aucune des populations, les valeurs de F_{is} ne sont significatives. Elles dévient toutes de l'équilibre de Hardy Weinberg (HWE).

Multiplex	Tm	Marqueur	Sequences (5' - 3')	Dyes	Taille (pb)	N. alleles
Mix 1	56°C	Pmarg37	F-GTCAGGATCTCCTTTATCTC R-AGGAGATATGTCATTGCTG	NED	145-195	17
		Pmarg44	F-GGACAGGGAATATCAAAC R-CAAATATGTGCAGTGTGA	HEX	166-228	12
		Pmarg77	F-GTTTCAGCCATTCTTGAGAAG R-TGAGCAATATTTAGCTCGAAG	FAM	118-188	19
Mix 2	55°C	Pmarg2	FGATCCTACGATGATTGCTTTGTC R-TGCAACGTATCAGGTTATGTTT	HEX	165-243	23
		Pmarg11	F-TCTGTCCGTCCATCTAGC R-ACAATGCATATCAAGTCAGC	NED	174-242	18
		Pmarg45	F-TCTGCCTGACAAGTTACGAAC R-ATACATTGAAGCTCGTCTCCTC	FAM	128-256	22
Mix 3	50°C	Pmarg7	F-CGTCAGTGGGAGTCAAATATTCG R-AGGAAGGGCATGTCATAAGGAAC	HEX	160-188	11
		Pmarg68	F-GTTGCCTGTGAAACATAGTG R-CAGTTATGGCTGTGGACC	FAM	132-168	7
		Pmarg79	F-AGTAAGTTGTAGCCAAATATGTGC R-GGAATATCAAACACAGGTCCTC	FAM	198-242	10

Tableau 3. Marqueurs microsatellites spécifiques de *P. margaritifera* : séquences des primers, conditions d'amplification et caractéristiques des allèles (taille et nombres d'allèles).

Archipel	Population	N _E	Ar	He	Ho	F _{IS}	HWE
Marquises	NHV-D	171.2	13.602	0.810	0.485	0.399	**
	NHV-S	120.7	12.768	0.781	0.524	0.33	**
	UAP	237.3	12.999	0.795	0.453	0.431	**
Tuamotu	ART	312.2	14.033	0.842	0.580	0.305	**
	TKP	995.2	13.958	0.866	0.513	0.407	**
	KAT	166.6	14.242	0.856	0.552	0.355	**
Australes	RVV	152.6	14.658	0.849	0.488	0.427	**

Tableau 4. Paramètres en lien à la diversité génétique des populations de *P. margaritifera* collectées : taille efficace de la population (N_e), richesse allélique (Ar), hétérozygotie espérée (He), hétérozygotie observée (Ho), coefficient de consanguinité (F_{IS}) et déviation significative à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE).

Des deux groupes de populations inexploitées par la filière perlicole, les populations des Marquises montrent un isolement relatif par rapport aux autres (Figure 1). La figure 1A illustre visuellement cette tendance : les trois populations marquisiennes sont isolées génétiquement des autres selon la fonction discriminante DF1. La différence entre les populations des Marquises et le reste des origines explique 43,8% de la variance totale. La fonction discriminante DF2 semble séparer la population

d'Aratika du reste des Tuamotu, des Australes et des Marquises (Figure 1A et 2D). La fonction discriminante DF3 semble séparer la population de Takapoto du reste (Figure 1B). Cet isolement de la population des Marquises est aussi visualisable au niveau de la figure 2C.

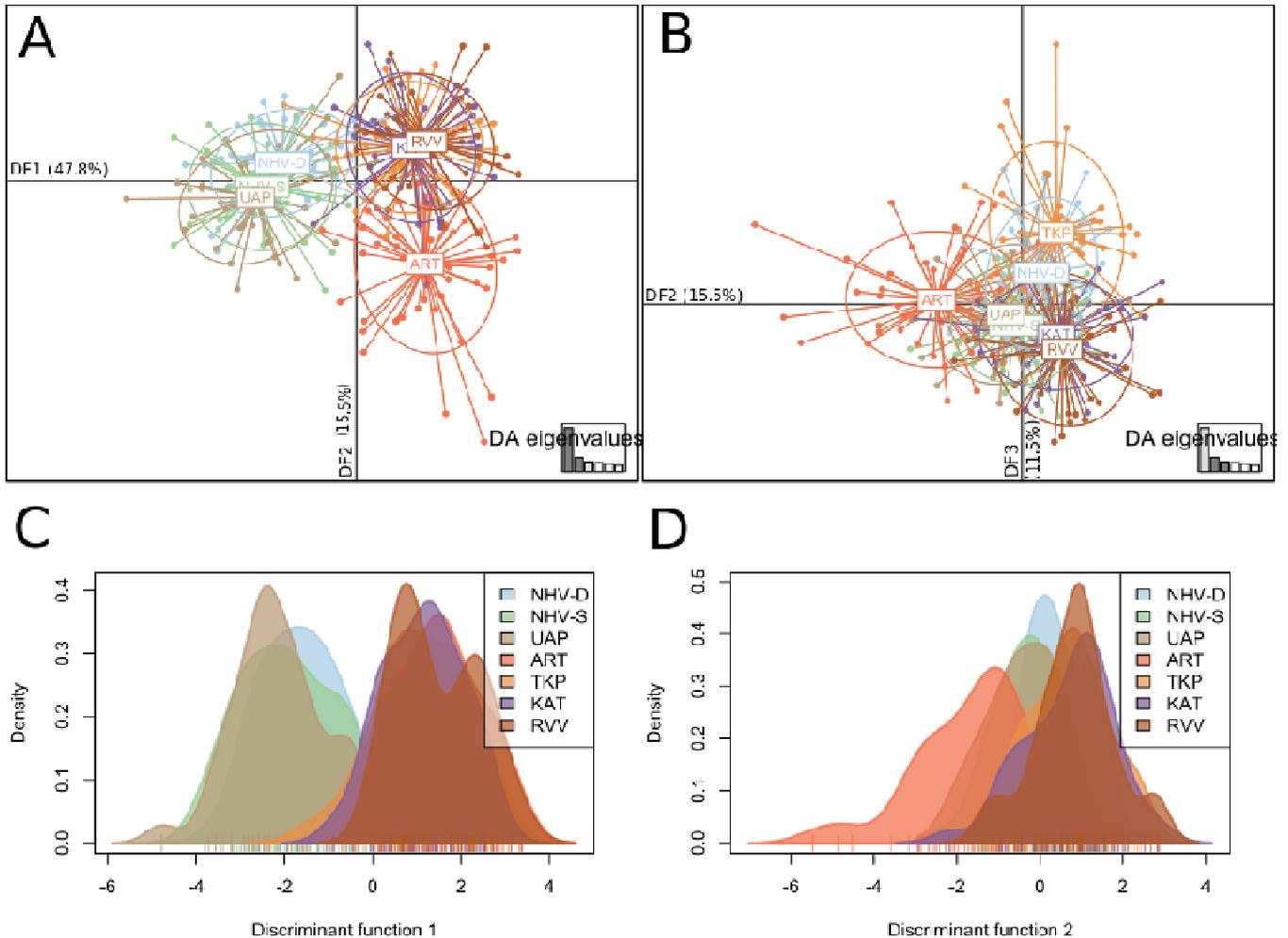


Figure 1. Résultats des analyses discriminantes en composantes principales (DAPC) : (A) Diagramme de dispersion des différentes populations d'huîtres perlières *P. margaritifera* collectées selon les fonctions discriminantes DF1 et DF2 ; (B) Diagramme de dispersion des différentes populations selon les fonctions discriminantes DF2 et DF3 ; (C) Distribution de chacune des populations selon l'axe DF1 ; (D) Distribution de chacune des populations selon l'axe DF2.

La figure 2 indique qu'il existe de faible échange entre les populations des Marquises et les autres. En effet, quelques individus des Marquises sont assignés aux populations des Tuamotu. En revanche, aucune huître des Marquises n'est assignée à l'archipel des Australes. Aucun isolement n'est observé pour la population des Australes, où de nombreux individus sont assignés à ceux de l'atoll de Katiu. Les individus échantillonnés à Katiu (Tuamotu) et Raivavae (Australie) présentent en effet les mêmes profils.

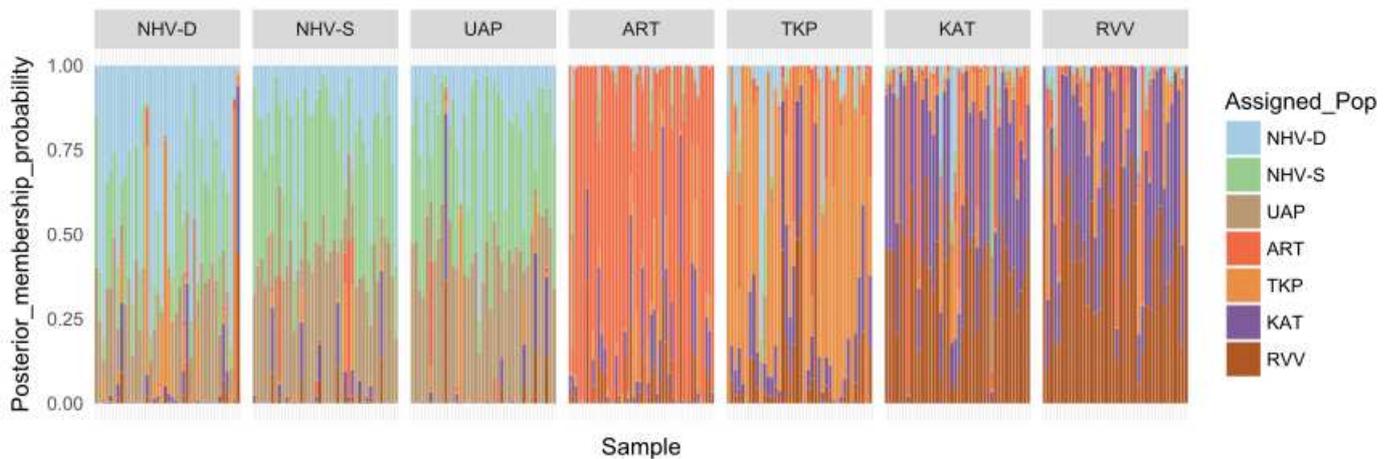


Figure 2. Diagramme illustrant la probabilité d'assignation de chacune des huîtres perlières *P. margaritifera* aux différentes populations.

Une publication scientifique, ayant pour titre : « Strong genetic isolation of the black-lipped pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in the Marquesas archipelago, French Polynesia » est en cours de préparation. D'un point de vue opérationnelle, des collectes complémentaires d'individus sauvages sont programmées aux Marquises, sur l'île de sur Ua Huka en décembre 2019, afin de conforter ces résultats. Des prélèvements tissulaires pour les extractions d'ADN et d'ARN seront réalisés sur place, ainsi que le rapatriement d'une cohorte à l'Ifremer en vue de réaliser une reproduction artificielle, dans le cadre de la prolongation de la présente convention (AmeliGEN-2).

3.2 Reproduction

Les reproductions en vue de produire des descendants G1 originaires des Marquises et des Australes ont été conduites en début de projet dans l'écloserie expérimentale d'Ifremer avec succès. L'action est donc réalisée (voir Rapport initial 2016).

3.3 Production de descendants G1

Les descendants G1 originaires des Marquises et des Australes ont été produits en novembre 2015 (hors convention) et avril 2016 respectivement. L'action est donc réalisée (voir Rapport initial 2016). Ces individus seront utilisés comme donneuses de greffon au sein des sites de producteurs partenaires dans le cadre du WP3.

4. WP3 Plasticité génétique

4.1 Cartographie de la qualité & 4.2 Analyses statistiques

Ces actions visent à cartographier la qualité des perles de culture produites à partir des huîtres perlières générées en éclosérie et dont les parents sont originaires des Marquises. Compte tenu des résultats obtenus au WP2, s'agissant du non isolement génétique de la population des Australes (échantillonnées à Raivavae), décision a été prise de ne maintenir dans les dispositifs de greffe que les populations des Marquises. En effet, les analyses de diversité génétique révèlent clairement la proximité des lots de Raivavae avec celle de l'atoll de Katiu. Seul le site de Raivavae (Tableau 5) aura à charge les greffes à partir de donneuses et receveuses originaire des Australes.

Le plan d'échantillonnage consiste en une vaste campagne de greffes expérimentales au niveau de 14 sites contrastés (Tableau 5 ci-dessous) à partir des descendants produits dans le WP2. Ainsi, 200 huîtres perlières produites en éclosérie (14 lots de 200) et originaires des Marquises serviront de donneuse de greffon. L'ensemble des lots ont été transférés en juin-août 2018. Sur chacun des sites, une sélection sévère des donneuses les plus colorées a été (ou sera) pratiqué. Le restant des huîtres transférées est systématiquement sacrifié post-greffe, excluant ainsi toute émission de gamètes possible en lien avec un maintien sur la durée des lots sur site. En accord avec la DRMM, seul le site de Rangiroa accueille le lot des Marquises en tant que receveuse.

	Sites	Producteurs	Greffes	Dates
Australe	Raivavae	MOE H	-	-
Gambier	Mangareva	DEVAUX D	ok	octobre 2017
	Mangareva	SICHOIX E	-	-
Tuamotu	Ahe	DEVON L	ok	Octobre 2018
	Apataki	HARRYS JM	ok	Juillet 2018
	Arutua	MOE AL	ok	Juillet 2018
	Manihi	MATAOA G	-	-
	Rangiroa	CABRAL P	ok	Octobre 2018
	Raroia	YU P	ok	Septembre 2018
Société	Tahaa	CHAN P	ok	Octobre 2018
	Tahaa	CHAMPON	ok	Octobre 2018
	Raiatea	BRODIEN H	ok	Octobre 2018
	Raiatea	BROTHERSON T	ok	Octobre 2018
	Raiatea	TUROA Landry	ok	Octobre 2018

Tableau 5. Partenaires hébergeant les greffes expérimentales au sein des 4 archipels de Polynésie française. En grisé, les partenaires hébergeant les sondes multi-paramétriques.

Parallèlement, des paramètres environnementaux seront relevés dans les lagons de quatre de ces sites (Arutua, Mangareva, Raivavae et Tahaa), via une acquisition automatisée par sondes multiparamétriques acquises en 2017 (budget "investissement DRMM" rattaché au projet – 4 sondes achetées au lieu des 5 prévues initialement). Les greffes expérimentales n'ont pu être conduites en 2017 ; les huîtres perlières n'ayant pas atteint une taille suffisante pour être exploitées. La majorité des récoltes auront lieu au delà du projet courant 2020, ainsi que l'ensemble des analyses en lien.

Une analyse descriptive permettra d'obtenir une simple cartographie de la qualité des récoltes obtenues en fin de projet. Une modélisation multi-variée tenant compte d'un certain nombre d'indicateurs propres aux sites d'exploitation permettra de proposer un modèle statistique prédictif de la qualité des perles, au travers d'indices phénotypiques associés à la coquille de l'huître donneuse (outil d'aide à la production et à la sélection).

4.3 Plasticité (Thèse)

La plasticité chromatique des coquilles a été appréhendée au travers d'une variable environnementale forçante, la profondeur. Les parties méthodologiques associées à ces expérimentations ont été décrites dans le rapport intermédiaire #1 (2017). En bref, l'expérience s'est déroulée dans la concession maritime d'Ifremer à Vairao, à deux profondeurs différentes (-8 mètres et -30 m.). Trente six huîtres perlières ont été utilisées pour cette expérience, soit 12 par phénotype de couleurs (vert, jaune et rouge) avec quatre stations, soit 9 huîtres perlières (3 par phénotype de couleur) par station. Cette expérience a duré 4 mois, durant lesquels les nasses ont séjourné successivement à 8 m, puis à 30 mètres puis de nouveau à 8 m. Durant l'expérimentation, 5 mm³ du manteau de chaque individu ont été échantillonnés.

Les individus ont statistiquement « foncé » lors de la mise en profondeur, et cette caractéristique s'est maintenue, même après 1 mois à 8 m de profondeur (Figure 3).

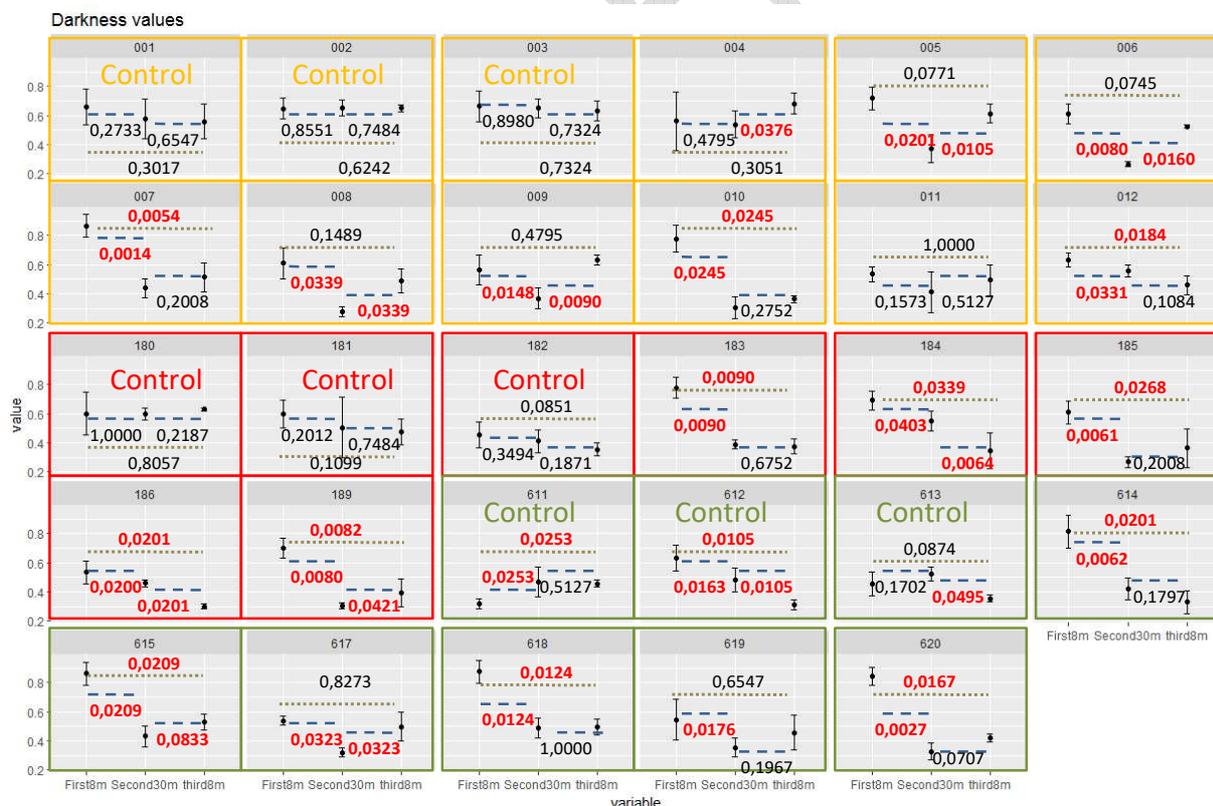


Figure 3. Valeurs de foncitude des coquilles interne pour les trois phénotypes, pendant les trois stades de l'expérimentation.

Afin d'avoir une idée des variations épigénétiques (notamment les modifications des queues d'acides aminés des histones) induites lors de la mise en profondeur, la technique novatrice de ChiP-Sequencing a été mise au point (voir description dans le rapport intermédiaire #1, 2017). La technique de ChiP-Sequencing a été mise au point par le biais de la technique de MNase sur l'huître perlière, avec pour témoin positif l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Nous trouvons bien l'ADN coupé à 150 pb comme attendu pour l'huître perlière, mais pas les bandes en échelle comme pour l'huître creuse (Figure 4). Après de nombreux tests, et dans le doute, il a été décidé de continuer la technique de ChiP-Sequencing par sonication. Un séquençage test a même été réalisé, et un signal apparaît bien. Il est néanmoins très faible.

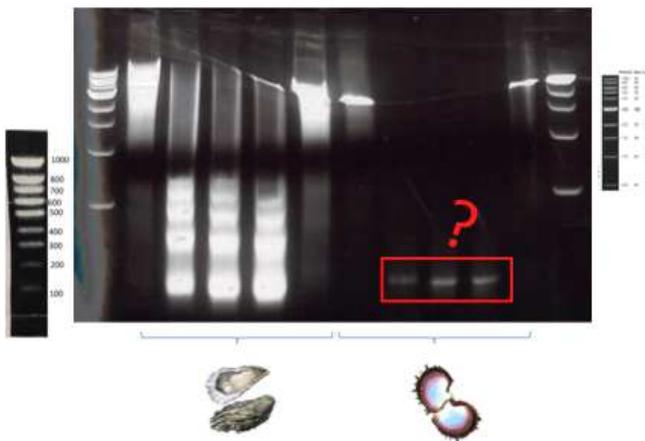


Figure 4. Digestion de l'ADN par MNase pour l'huître creuse (à gauche) et l'huître perlière (à droite).

La figure 5 nous démontre qu'il existe bien un signal particulier et que cette technique serait réellement très pertinente pour des études épigénétiques sur l'huître perlière. Néanmoins, la faiblesse du signal du au fait de la pauvreté en quantité d'ADN implique qu'une mise au point supplémentaire est nécessaire dans le but d'obtenir plus de matière.

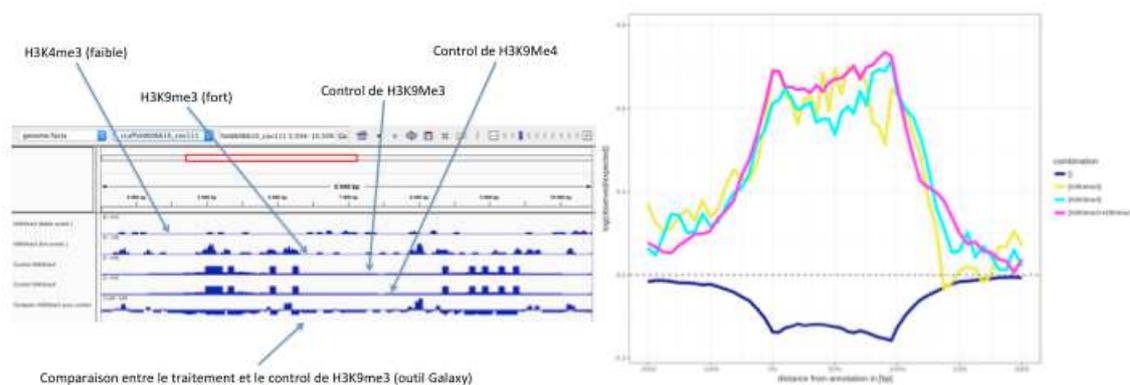


Figure 5. Ces graphiques, typiques des analyses ChiP-Seq, présentent à gauche la distribution des enrichissements sur le génome pour un fragment donné, et à droite, l'enrichissement des tous les gènes cumulés par rapport à leur TSS et TES.

Afin de pouvoir compléter les données issues de l'expérimentation « YoYo », la technique de BS-Seq, déjà mise au point sur l'huître perlière, a été utilisée en parallèle. Le séquençage a été réalisé en septembre 2018 et les données de séquences seront prochainement analysées.

5. WP4 Génétique moléculaire

5.1 Développement de SNP (post-doc)

L'objectif de cette composante est d'échantillonner la diversité de *P. margaritifera* dans les cinq archipels de la Polynésie française et d'étudier la biodiversité et la connectivité de leurs populations, ainsi que d'explorer l'histoire évolutive et géographique de *P. margaritifera*. Pour ce faire, un crible de ces populations à haute résolution à l'échelle du génome utilisant 3 000 à 5 000 SNP (pour *Single Nucleotide Polymorphism*) est en cours de réalisation. Cette étude est coordonnée par David JONES, post-doctorant recruté début 2017.

Un total de 989 échantillons a été obtenus (collectés récemment lors de missions sur le terrain ou identifiés dans des échantillons archivés) à partir de 26 sites dans les cinq archipels de Polynésie française (Tableau 6 ci-dessous). Ceux-ci sont disponibles pour le génotypage. L'avantage d'utiliser des échantillons archivés est qu'il permettra une comparaison directe avec l'ensemble des données microsatellite déjà génotypé.

Origine	N	Origine	N
Mangareva, Gambier (Collectionneurs)	33	Ahe, Tuamotu	50
Mangareva, Gambier (Adultes sauvages)	17	Manihi, Tuamotu	50
Peiriki, Gambier (2016 Collectionneur)	40	Takapoto, Tuamotu	50
Matautea, Gambier (2016 Collectionneur)	40	Aratika, Tuamotu	41
Rikitea, Gambier (2016 Collectionneur)	40	Teanga, Tuamotu	50
Morane, Gambier (collecté en 2008)	20	Katiu, Tuamotu	50
		Takume, Tuamotu	50
Hiva Oa, Marquises	3	Motutunga, Tuamotu (collecté en 2008)	20
Nuku Hiva, Marquises	97	Tepoto, Tuamotu (collecté en 2008)	20
Ua Pou, Marquises	12	Tuanake, Tuamotu (collecté en 2008)	20
Eiao, Marquises (collecté en 2008)	20	Tahanea, Tuamotu (collecté en 2008)	20
Hatutu, Marquises (collecté en 2008)	20	Hiti, Tuamotu (collecté en 2008)	20
Mopélie, Îles de la Société	7	Raivavae, Îles Australes	8
Scilly, Îles de la Société	91	Albino, écloserie de l'Ifremer	40
Motu one, Société (collecté en 2008)	20	Hybrides (Gambier x Marquesas)	40
			98
		TOTAL	9

Tableau 6. Liste des individus et populations recueillis à ce jour. Une sélection de ceux-ci sera incluse pour le génotypage SNP dans la composante population naturelle.

La découverte de SNP nécessite habituellement un effectif de plus de 100 individus (c'est-à-dire de préférence 1 à 2 plaques / 94 à 192 échantillons), afin d'accéder à une large diversité génétique, indispensable pour sa mise en évidence. Ces échantillons devraient représenter la diversité génétique des huîtres en production et / ou des populations naturelles pour lesquelles ils sont

destinés à être utilisés afin d'éviter les biais de détermination. Pour développer des SNP, plusieurs sociétés de séquençage ont été contacté. La méthode de génotypage par séquençage (GBS) (à savoir ddRAD ou DARTSeq), optimisant les coûts vis-à-vis du nombre d'échantillons a été privilégiée. Des estimations de prix ont été demandées à trois sociétés avec les critères suivants : l'espèce (*P. margaritifera*), 2 000 échantillons, 5 000 à 10 000 SNP souhaités, taille prévue du génome de 1,14 à 1,3 Gb, pour un budget de 30 000 € (\pm 10 000 €). Les coûts associés à ces fournisseurs de services dépendent fortement de la profondeur de séquençage habituellement modifiée par le nombre d'échantillons multiplexés dans une voie de séquençage et, par conséquent, les prix sont évolutifs. La décision de passer par la société GenomNZ en tant que fournisseur de services GBS pour ce projet a été prise le 30 avril 2018. Une description de cette justification et de leurs services (ainsi que d'autres fournisseurs de services alternatifs) est fournie ci-dessous.

Premier choix - GenomNZ - une branche d'AgResearch

(<https://www.genomnz.co.nz/species/aquaculture/>) :

- GenomNZ a une expérience considérable avec les méthodes GBS chez les mollusques et dispose d'un workflow bien développé et rationalisé, y compris un logiciel en aval pour la sélection et le filtrage des SNP.
- GenomNZ utilise un SGB à base d'enzymes de restriction et peut utiliser une variété d'enzymes et de profondeurs de séquençage (également GBS amplicon pour 20-200 SNPs). Ils incluent dans leur offre également l'extraction des ADN à partir des tissus fournis.
- Le développement et le génotypage subséquent sont rentables et les coûts de mise en place sont relativement faibles. Coûts associés à GBS à GenomNZ :
 - les coûts de mise en place (c'est-à-dire la sélection de l'enzyme et l'optimisation des rapports d'adaptation) sont d'environ 5 000 NZ, y compris le génotypage de 186 échantillons (2 plaques) ;
 - les coûts de génotypage subséquents sont de 25 à 35 dollars néo-zélandais par échantillon (en fonction de l'amélioration du flux de travail et de l'extraction de l'ADN). Structure des prix ci-dessous ;
 - Une estimation approximative pour 2000 échantillons et SNP 10-20K \$ NZ 75,000 (~ 49 000 €).

# échantillons par voie de séquençage	# séquences attendues / échantillon	\$ NZD / échantillon	Couverture de séquence attendue si 1% du génome de 1,4 Go est échantillonné
96	~ 2 400 000	45-50 \$	17x
182	~ 1 200 000	35 \$	8.5x
384	~ 600 000	25 \$	4,2x

- Données - GenomNZ permet d'accéder à toutes les données brutes (fichiers Fastq), à l'appel de génotypes et au soutien bioinformatique et à un accès continu et gratuit au logiciel pour traiter les résultats dans un format adapté à une variété d'applications.
- Analyse - il existe un potentiel d'analyse collaborative, y compris les valeurs génomiques et la filiation génétique.
- GenomNZ peut utiliser un échafaudage génomique pour augmenter le nombre de SNP identifiés et génotypés (potentiellement jusqu'à 60-100K SNP).

- Leur délai de traitement des échantillons est raisonnable à 4-6 semaines (6-8 semaines pour la configuration initiale).

Deuxième choix - Diversity Arrays Technologies, Australie (DARTSeq)

<http://www.diversityarrays.com/> :

- Une expérience antérieure avec Diversity Arrays les a placés au second rang en raison de retards dans la fourniture de données, de goulets d'étranglement dans le traitement des échantillons, de communication minimale sur les résultats, de qualité des données fournies et de filtrage en aval.
- Diversity Arrays a déjà été testé et optimisé pour générer des SNP à la fois pour *P. margaritifera* (~ 20K SNP total, ~ 8K SNP fiables, Lal et al 2018) et *P. maxima* (~ 18K SNPs total, 5K SNPs fiables, Jones communication personnelle).
- Diversity Arrays offre tous les composants d'une plate-forme GBS basée sur ddRAD appelée « DARTseq ». Cela s'étend de l'extraction de l'ADN à la préparation de la bibliothèque, au séquençage, au démultiplexage et à l'appel du génotype, ainsi qu'à la fourniture de données.
- Deux logiciels de filtrage « post génotype » ont été développés pour DARTseq (DART_QC et DartR) permettant un filtrage SNP simplifié pour des applications en aval spécifiques.
- DARTseq s'appuie sur le re-clustering de tous les échantillons pour effectuer de nouveaux appels de génotype après que plus de plaques d'échantillons ont été séquencées. Cela permet la découverte de plus de SNP en raison de la diversité accrue des échantillons.
- Les coûts totaux estimés vont de 63 176 AUD à 85 718 USD (40 à 54 k€) en fonction de la structure du plan de génotypage.

Troisième choix - Université Laval, Québec

<http://www.ibis.ulaval.ca/?pg=sequencage> :

- Brian Boyle, de l'Université Laval, a donné beaucoup d'informations sur leur plateforme GBS. C'est un service commercial à haut débit mais qui ne donne aucune flexibilité pour l'optimisation.
- Citation fournie. Synthèse de la bibliothèque et séquençage ion-proton pour 96 échantillons 4 512 \$ CAN = ~ 2850 € (47 \$ CAN / ~ 30 euros / échantillon). Un coût estimé pour ~ 2.350 échantillons / 25 plaques = 112.800 CAN / ~ 71 000 €.
- Voir les minutes de réunion connexes pour plus d'informations.

Quatrième choix - Génome Québec

<http://gqinnovationcenter.com/services/genotyping/serviceSNPGenotyping.aspx?l=e> :

Génome Québec N'offre pas le SGB, avec ses technologies majeures utilisant les matrices à semi-conducteurs Illumina Infinium. Cette technologie de matrices à semi-conducteurs nécessiterait une étape distincte de découverte, de filtrage et de conception de SNP pour créer les matrices Illumina avant de les utiliser pour le génotypage. En 2011, cette méthodologie d'identification et de génotypage de 3 000 SNP pour 1 500 individus de *P. maxima* a coûté 180 000 AUD à la JCU. Génome Québec a fourni les coordonnées de Brian Boyle de l'Université Laval.

Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/agricultural-biotechnology/agrigenomics/agriseq-targeted-genotyping-sequencing.html>).

Les deux technologies proposées par ThermoFisher (Axiom et Eureka) nécessitent des sondes SNP ou des amplicons déjà conçus. Ils sont également beaucoup plus chers que le GBS d'autres fournisseurs de services à 36 € par échantillon pour 5000 SNP, mais cela n'inclut pas la découverte de SNP et la conception sonde / amplicon (qui peut aller jusqu'à 40 000 €). Prix de David SCHIKORSKI du Laboratoire Labofarm en France.

Analyse des génotypes SNP à l'échelle du génome : avec la décision de confier les travaux à GenomNZ en tant que fournisseur de services, l'analyse se fera dans leurs pipelines. Les données fournies consistent en des appels de génotypes et des comptages de lecture pour les deux allèles SNP produits en KGD qui utilise les programmes Tassel, UNEAK, GBSX, STACKS et Tagdigger. Le logiciel KGD est open source et disponible sur GitHub (<https://github.com/AgResearch/KGD>). Il traite les sorties fastq brutes et les métadonnées associées et inclut le contrôle de séquence, l'appel et le filtrage SNP, le calcul des matrices de relations génomiques (coûteuses en calcul) et les tracés d'échantillons PCA. Il y a une visionneuse 3D associée et des parcelles de distribution de fréquences alléliques mineures (MAF). Il est utile pour la génétique des populations, la diversité génomique, l'assignation de parenté, mais peut nécessiter plus de variantes pour les GWAS à haute densité. Tous les SNP peuvent être alignés sur le génome de référence et, si nécessaire, annotés à l'aide de l'analyse Blast2GO et KEGG pour ajouter une structure physique et un contexte biologique aux SNP (indépendamment de la carte de liaison).

5.2 Séquençage du génome

En 2016, le génome d'une huitre mâle sauvage de grande taille (24,6 cm de haut pour 1,7 kg) et originaire des Gambier a été séquençé. En 2017, les travaux ont consistés à traiter les données de séquences obtenus en amorçant son assemblage et son annotation (voir rapport intermédiaire 2017). Ces travaux ont été menés par Jérémie VIDAL-DUPIOL (Ifremer IHPE Montpellier) et Céline REISSER (Ifremer CIP). En 2018, ces travaux d'assemblage et d'annotations se sont poursuivis et détaillés ci-dessous. Enfin, le travail d'annotation structurel et fonctionnel est initié et devrait aboutir courant 2019.

Les étapes de filtration par qualité (illumina toutes banques), de correction et « d'homozygotage » (banque illumina shotgun, SGA_ICE ; banques mate-pair, NextClip) ont été effectuées avec succès. Par la suite, les données de séquences de la banque illumina shotgun ont pu être utilisées pour corriger les séquences issues de la technologie PacBio à l'aide du meilleur logiciel disponible à ce jour, proovread. Nous nous sommes malheureusement heurtés à de très nombreux problèmes informatiques lors de cette étape ce qui nous a fait perdre beaucoup de temps (6 mois).

Un premier assemblage a été réalisé avec l'assembleur Platanus et les banques shotgun et mate-pair issues de la technologie illumina. Les premiers résultats ont été extrêmement encourageants et auraient pu être utilisés et publiés en l'état. Ainsi la longueur total de l'assemblage obtenue (1,47 Gb) est proche de l'attendu (1.3 Gb). Le scaffold le plus long mesure 1040 kb et le N50 de l'assemblage est de 78,8 kb ce qui signifie qu'une proportion très significative de l'assemblage est d'une longueur suffisante pour être informative (il contient cependant beaucoup de base inconnue liée à l'usage de banque mate pair ; 14010 N/100kb). C'est sur ce squelette que la suite de l'assemblage s'est appuyé avec l'introduction des reads PacBio. De très nombreux essais impliquant divers assembleurs ont été menés pour cette étape (pbJelly, SSPACE et SSPACE Long Read GapFiller, GapCloser, CANU).

C'est finalement DBG2OLC qui a permis d'obtenir l'assemblage hybride (illumina plus PacBio) le meilleur. A ce jour le N50 est de 44,5 Kb, le scaffold le plus long est de 33 Kb, la longueur totale de l'assemblage est de 1.25Gb et la teneur en N de 0.00 N/ 100Kb. En termes de composition en gène, les résultats obtenus avec BUSCO sont en adéquation avec nos attentes et démontrent une qualité excellente (plus de 85% des gènes les plus conservés chez les eucaryotes et les métazoaires sont retrouvés dans l'assemblage).

Trois voies d'amélioration de l'assemblage peuvent être envisagées :

- i) l'utilisation des banques mate-pair pour augmenter le scaffolding ce qui aura pour effet d'augmenter le nombre de N ;
- ii) l'utilisation d'une carte de liaison génétique haute densité pour organiser entre eux les différents scaffolds produits (en cours) ;
- iii) l'utilisation d'une nouvelle approche de séquençage complémentaire, le Hi-C.

5.3 Analyses du transcriptome (Thèse)

P. margaritifera a la capacité de produire les perles les plus variées et les plus colorées du monde. L'expression de la couleur dans la coquille interne, qui est corrélée à la couleur des perles produites à l'aide du même individu, est sous contrôle génétique et environnemental. Au jour d'aujourd'hui, les mécanismes d'apparition de ces phénotypes de couleurs sont encore mal compris au niveau moléculaire. Dans le cadre de la thèse de Pierre-Louis Stenger, le phénotypage moléculaire des gènes exprimant la coloration de la face interne des coquilles de trois phénotypes cibles (vert, jaune et rouge) a été réalisé par la technique de RNA-Seq. Cette approche comparative est pertinente pour explorer les différentes voies moléculaires déterminant l'apparition des trois phénotypes cibles.

Pour rappel, les échantillonnages associés et la technique RNAseq ont été présentés dans le rapport intermédiaire #1 (2017). En bref, quatre individus de chaque phénotype de couleur ont été sélectionnés. Ces individus proviennent d'un programme de sélection pour leur couleur réalisé en partenariat avec la société SCA Regahiha Pearls (Ile de Mangareva, archipel des Gambier). Les individus ont été réceptionnés et placés ensemble pendant deux mois sur les filières perlicoles de la concession maritime Ifremer du lagon de Vairao. Ces conditionnements préalablement aux échantillonnages ont permis de limiter au maximum les biais liés à l'environnement. Des morceaux de 0,5 cm³ de manteau (le tissu biominéralisation de l'huitre perlière, et permettant l'intégration de pigments dans la coquille) ont été échantillonnés et placés dans du RNA-Later puis stockés à température ambiante pendant 24 h puis placé à 4°. L'ARN a été extrait à l'aide d'une technique par Trizol®-Chloroform-isopropanol, la RNase a été inhibée avec du RNA secure reagent® et un DNase kit (Ambion® RNA Life Technologies™ AM1906). L'ARN a été purifié avec du PureLink™ RNA Mini Kit d'Ambion® RNA Life Technologies™. La qualité de l'ARN a été vérifiée avec un Nanodrop 1000© et un Agilent 2100 Bioanalyzer® d'Agilent Technologies™. Les banques ont été réalisées en fr-FristSytrand et séquencées sur un Illumina® HiSeq® 4000 par la société Génome Québec (MPS Canada). Le pipeline informatique n'est ici pas détaillé, mais il suit les différentes étapes présentées dans la figure 6.

Les expressions des gènes ont été comparées entre les différents phénotypes (vert contre jaune, jaune contre rouge et rouge contre vert) afin d'obtenir une expression différentielle. Les

analyses d'expression différentielle préliminaires des transcrits ne démontrent pas à première vue un groupement net des gènes par clusterisation des trois phénotypes (Figure 7).

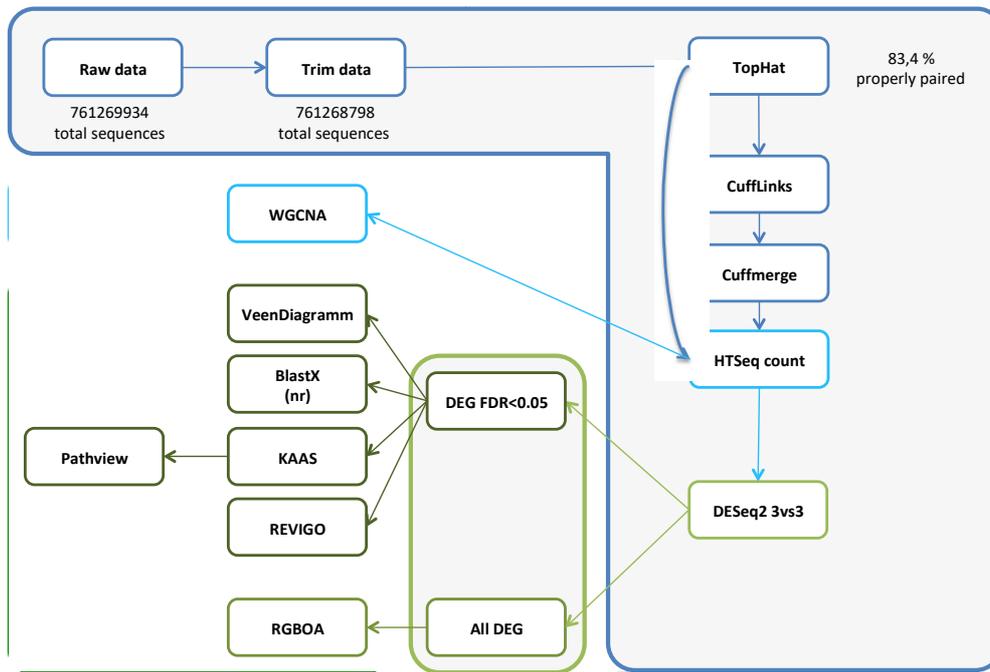


Figure 6. Pipeline bioinformatique pour le traitement du RNA-Seq

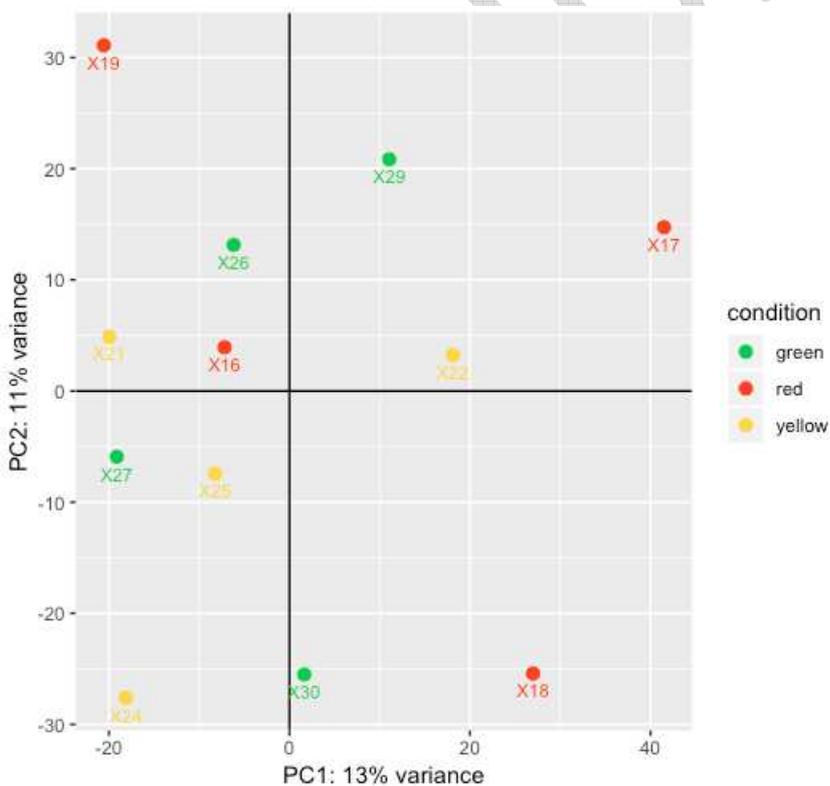


Figure 7 : ACP présentant la variance des échantillons selon l'expression différentielle des gènes.

Les diagrammes de Veen (Figure 8) et le tableau (Tableau 7) ci-dessous montrent les gènes exprimés différemment (DEG) avec un FDR < 0,05 donné par DeSeq2.

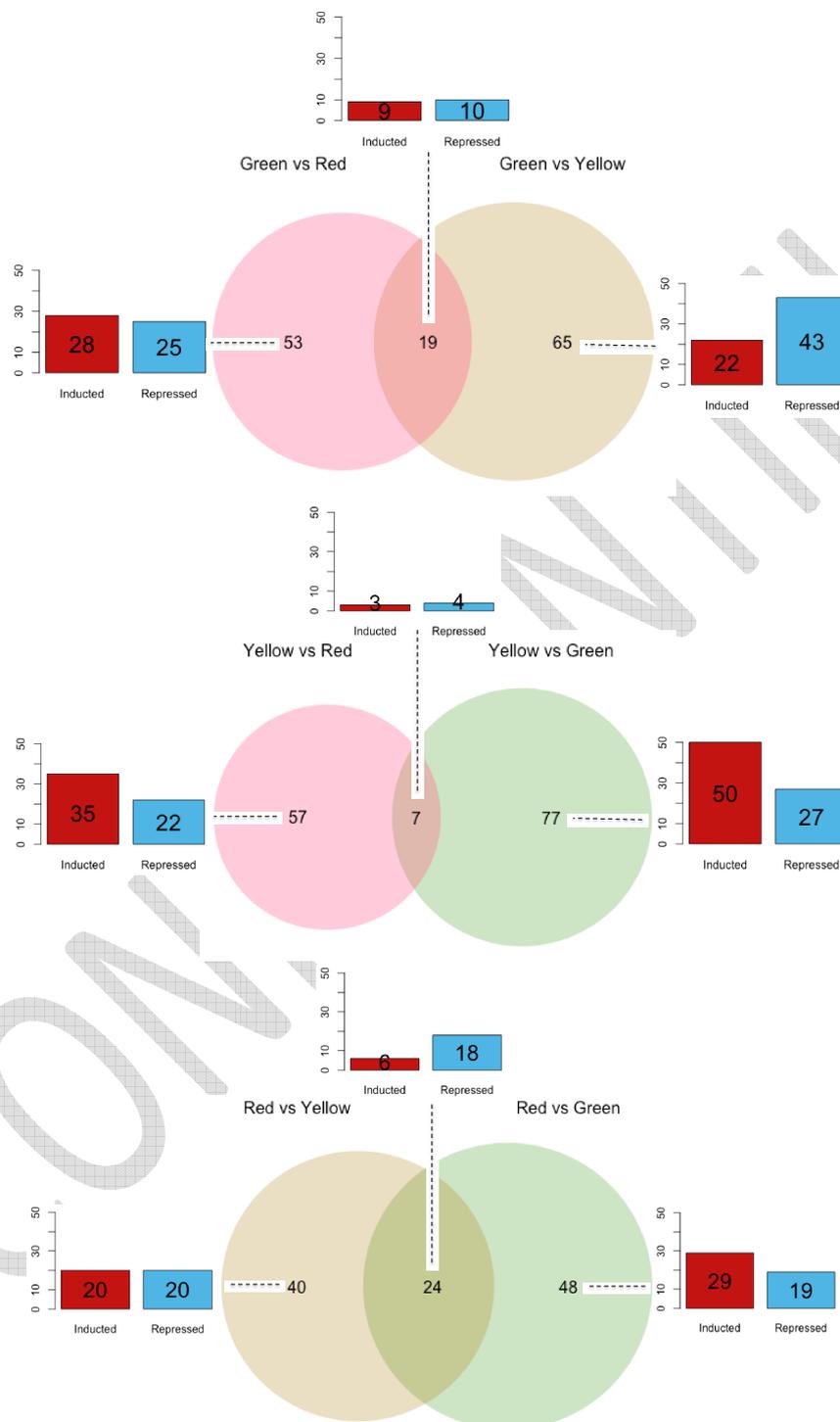


Figure 8 : Diagramme de Veen pour l'expression différentielle des gènes de couleurs avec un de FDR < 0, 05.

	YG	YR	RG	RY	GY	GR
DEG	84	64	72	64	84	72
In common DEG	7		24		19	
In com. DEG +	3		6		9	
In com. DEG -	4		18		10	
DEG not in common	77	57	48	40	65	53
DEG not in common +	50	35	29	20	22	28
DEG not in common -	27	22	19	20	43	25

Tableau 7. Expression différentielle des gènes avec un FDR de <0,05 (“+” = Inducted; “-” = Repressed.)

La comparaison entre le jaune et le vert présente le nombre le plus élevé de DEG (pour Differential Expression Genes) (84). Elle montre également que la comparaison entre le phénotype vert et le rouge avec 72 DEG et enfin la comparaison entre le jaune et le rouge montre le faible nombre de DEG avec 64 DEG. Le phénotype rouge a le nombre le plus élevé de DEG communs (24) avec 18 DEG réprimés (-) et 6 DEG induits (+), le phénotype jaune a beaucoup plus de DEG communs avec 19 DEG (9 induits et 10 réprimés). Le phénotype vert a le plus petit nombre de DEG communs avec 7 DEG (3 induits et 4 réprimés). Lorsque le jaune et vert sont comparés au jaune et au rouge, 77 DEG sont spécifiques à la comparaison jaune et verte (50 induits et 27 réprimés), et 57 DEG sont spécifiques à la comparaison jaune et rouge (35 induits et 22 réprimés). Lorsque le rouge et le vert sont comparés au rouge et au jaune, 48 DEG sont spécifiques à la comparaison rouge et verte (29 induits et 19 réprimés), et 40 DEG sont spécifiques à la comparaison rouge et jaune (20 induits et 20 réprimés). Lorsque le vert et le jaune sont comparés au vert et au rouge, 65 DEG sont spécifiques à la comparaison verte et jaune (22 induits et 43 réprimés), et 53 DEG sont spécifiques à la comparaison verte et rouge (28 induits et 25 réprimés). Les analyses REVIGO (Figures 9, 10 et 11) nous informent des grandes catégories fonctionnelles expliquant les différences génétiques entre les comparaisons présentées ci-dessus.

Le diagramme en treemap pour la comparaison rouge contre verts (Figure 9) présente les fonctions moléculaires «activité transférase», «transfert de groupes glycosyle» et «activité oxydoréductase», comme étant les fonctions moléculaires les plus importantes dans les DEG avec un FDR > 0,05. «Constituant structural du ribosome», «liaison aux ions zinc», «liaison à la chitine», «activité du récepteur des particules de lipoprotéine» et «activité catalytique» sont également exprimés de manière différentielle entre les phénotypes rouge et vert.

Le diagramme en treemap pour la comparaison rouge contre jaune (Figure 10) présente «activité de transférase, les groupes de transfert de glycosyle» et «activité d'endopeptidase de type aspartique», comme étant les fonctions moléculaires les plus importantes pour les DEG avec un FDR > 0,05. «Liaison à l'acide hyaluronique», «activité catalytique», «liaison aux protéines de choc thermique», «activité oxydoréductase» et «liaison aux nucléotides» sont également exprimées différemment entre les phénotypes rouge et jaune.

Le diagramme en treemap pour la comparaison jaune contre vert (Figure 11) présente «liaison aux ions zinc», «liaison à la chitine», «activité du transporteur transmembranaire de l'ammonium» et «constituant structural du ribosome», comme étant les fonctions moléculaires les plus importantes dans les DEG avec un FDR > 0,05. "Liaison aux protéines de choc thermique", "activité de la

méthyltransférase", "activité de l'ester carboxylique hydrolase", "activité de l'oxydoréductase" et "activité de la phosphore-oxygène lyase" sont également exprimées de manière différentielle entre les phénotypes jaune et vert.



Figure 9. REVIGO treemap pour la comparaison rouge contre verts.



Figure 10. REVIGO treemap pour la comparaison rouge contre jaune.

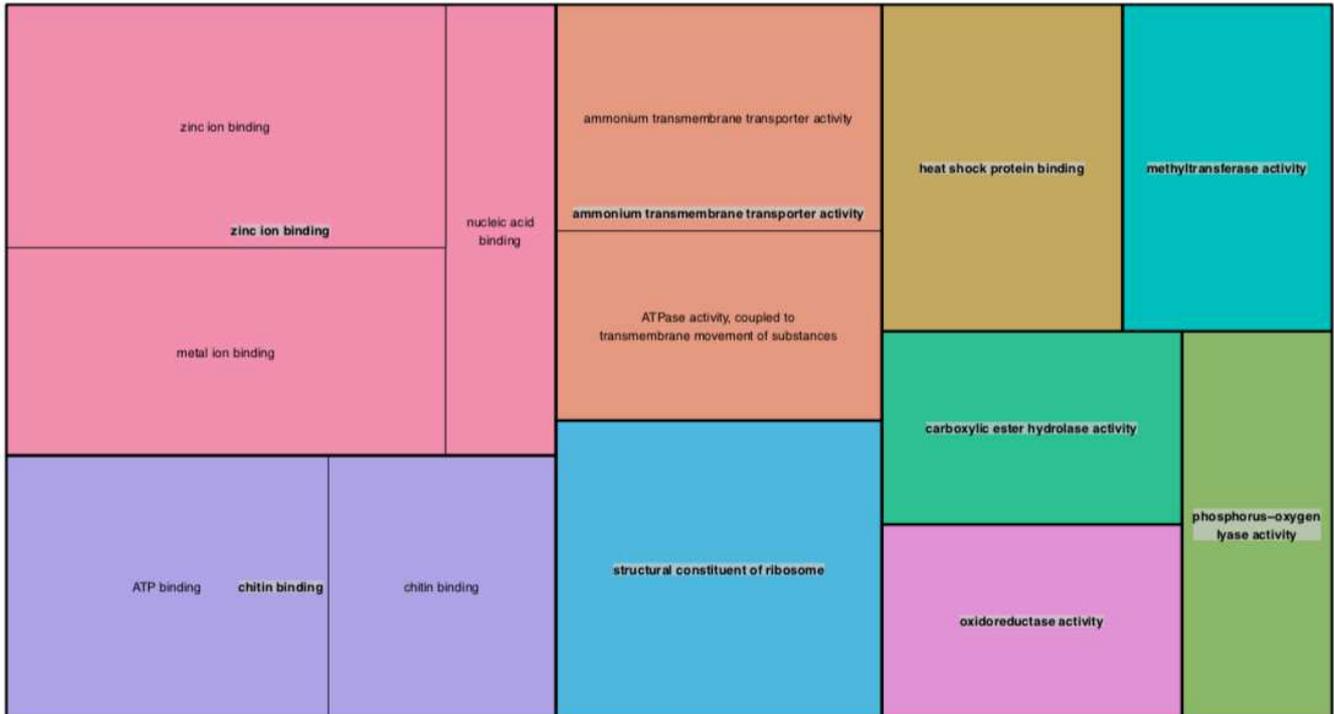


Figure 11. REVIGO treemap pour la comparaison jaune contre vert.

Dans un souci de clarté, ne seront présentés ici que les gènes exprimés différemment retrouvés dans les différentes comparaisons étant communs à un seul phénotype. Ces informations ont été obtenues à l'aide de Blast.

Pour le phénotype rouge, quatre «porphobilinogène déaminase», deux «protéines hypothétiques» sans domaine conservateur, une «UDP-glucuronosyltransférase», une «sous-unité décaprényl-diphosphate synthase», deux «glycosyltransférase» et une «xylosyl- et glucuronosyltransférase» ; deux «protéines hypothétiques» sans domaine conservateur et une «protéine contenant un domaine WSC» sont réprimés. Dix autres DEG n'ont «aucune similitude significative trouvée» (7 induits, 3 réprimés). L'analyse combinée de KEEG, KAAS et pathview nous précisent que les porphobilinogène déaminase permettent d'obtenir une hydroxyméthylbilane, qui devient spontanément (réaction non enzymatique) de l'uroporphyrin I qui est un pigment rouge (Figure 12). Les autres gènes peuvent avoir plusieurs autres fonctions autres que l'apparition de pigment.

Pour le phénotype vert, quatre DEG sont induits et six réprimés dont l'une avec «protéine non caractérisée» et une «protéine hypothétique» sans domaine conservateur. Parmi les induits, on identifie «acylCoa», «3-oxoacyl réductase», «zinc finger ZZ type», «ribosomal protein». Parmi les réprimés il y a une méthyltransférase, une histone lysine, une protéine ribosomale et une protéine riche en leucine. Les 9 autres DEG n'ont «aucune similitude significative trouvée» (6 induits, 3 réprimés). Ces gènes peuvent avoir plusieurs autres fonctions autres que l'apparition de pigment.

Pour le phénotype jaune, 4 DEG sont induits dont trois avec «aucune similarité significative trouvée» (l'autre étant un exportin) et trois DEG sont réprimés (un facteur de transcription, une superoxyde

dismutase et une protéine SSHU2). Ces gènes peuvent avoir plusieurs autres fonctions autres que l'apparition de pigment.

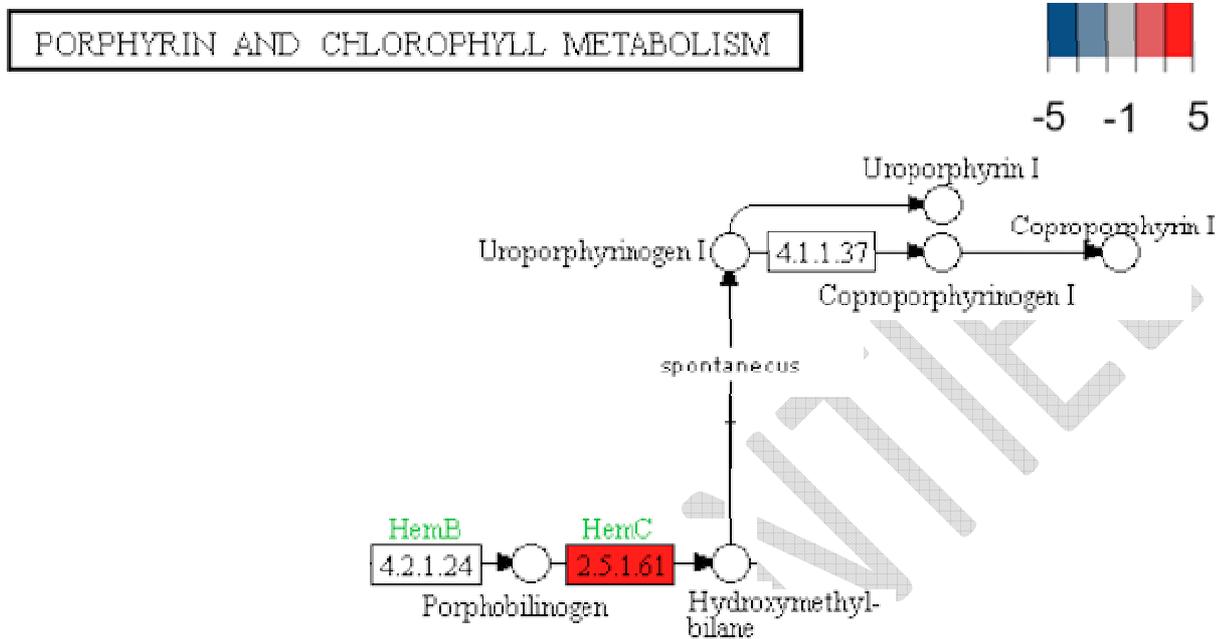


Figure 12. Résultats combinés de KEEG, KAAS et pathview pour les prophobilinogen deaminase.

Afin de connaître la véritable utilité des gènes pouvant avoir d'autres fonctions que l'apparition de pigment, une analyse d'enrichissement a été réalisée avec RGOA. Seuls les résultats principaux seront ici présentés, et feront office de conclusion préliminaire aux résultats globaux de ce RNA-Seq.

La méta-analyse de nos résultats nous indique que la voie de passage de l'hème est perturbée sur plusieurs étapes, selon le phénotype de couleur interne de l'huître perlière (Figure 13). Les hèmes ont un rôle biologique très important (Bezwođa *et al.* 1983). L'hémoglobine et la myoglobine en sont par exemple composées et permettent aux globules rouges de transférer de l'oxygène (Shaanan 1982). Les hèmes sont aussi importants dans les chaînes respiratoires des mitochondries (Jones *et al.* 1969). Dans le cas des huîtres perlières, la voie de passage des hèmes est toujours fonctionnelle, mais certaines étapes sont plus (ou moins) productives, permettant l'apparition de pigments. Pour le phénotype rouge, les porphobilinogen deaminases sont surexprimées permettant l'apparition spontanée d'uroporphyrines, un pigment rouge foncé (Comfort, 1951). Pour le phénotype vert, les hèmes sont bien produites, mais elles sont comparativement aux autres phénotypes dégradées en biliverdine par l'hème oxygénase. La biliverdine est un pigment vert (Virtanen, Miettinen, 1949). La dégradation s'arrête à cette étape. Pour le phénotype jaune, la dégradation se poursuit sur une étape supplémentaire, par le biais de la biliverdine réductase permettant d'obtenir de la bilirubine, qui est un pigment biliaire jaune (Tenhunen *et al.* 1968). L'étape de dégradation suivante par une UDP-glucuronosyl transférase est ici aussi réprimée.

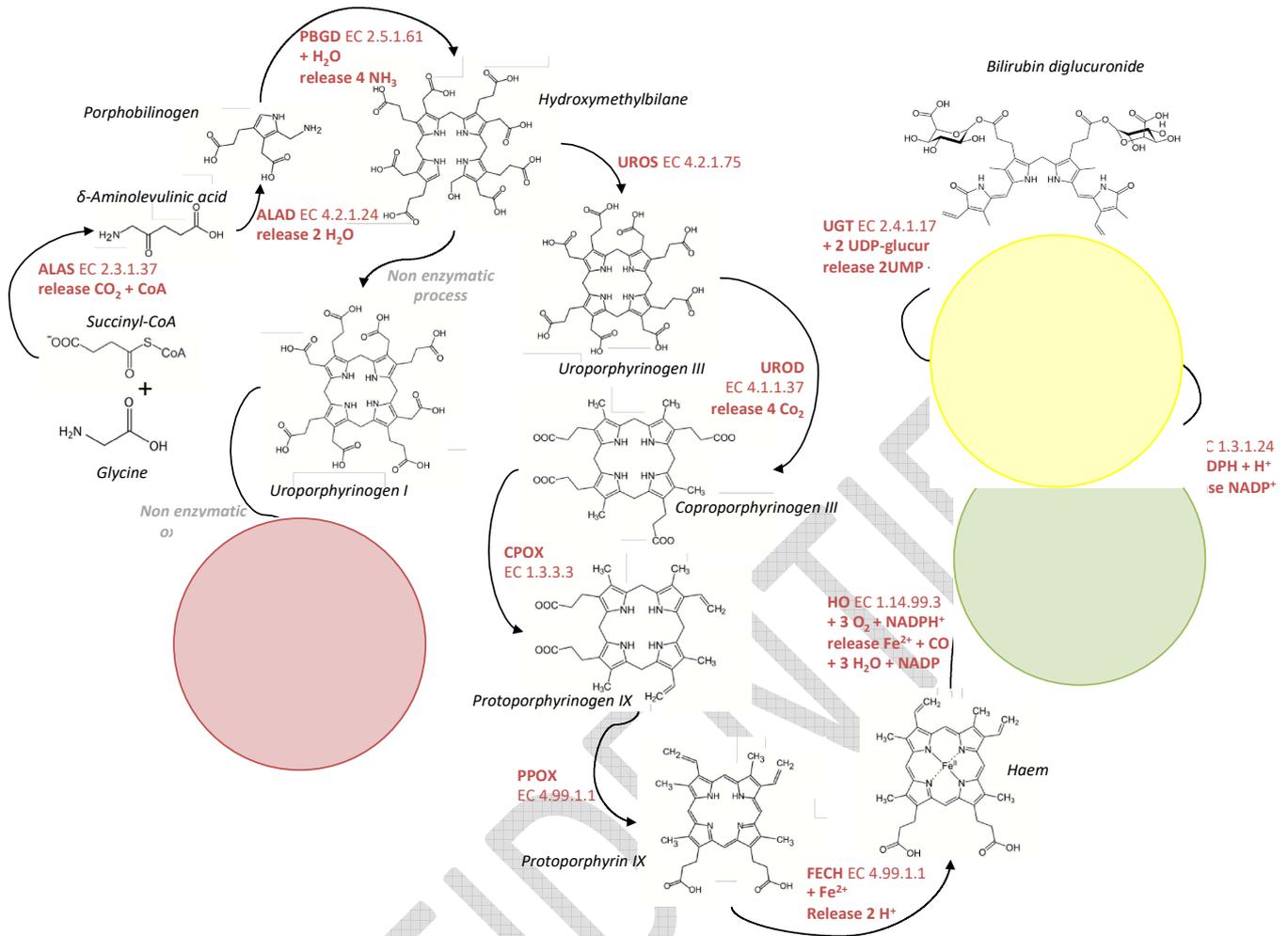


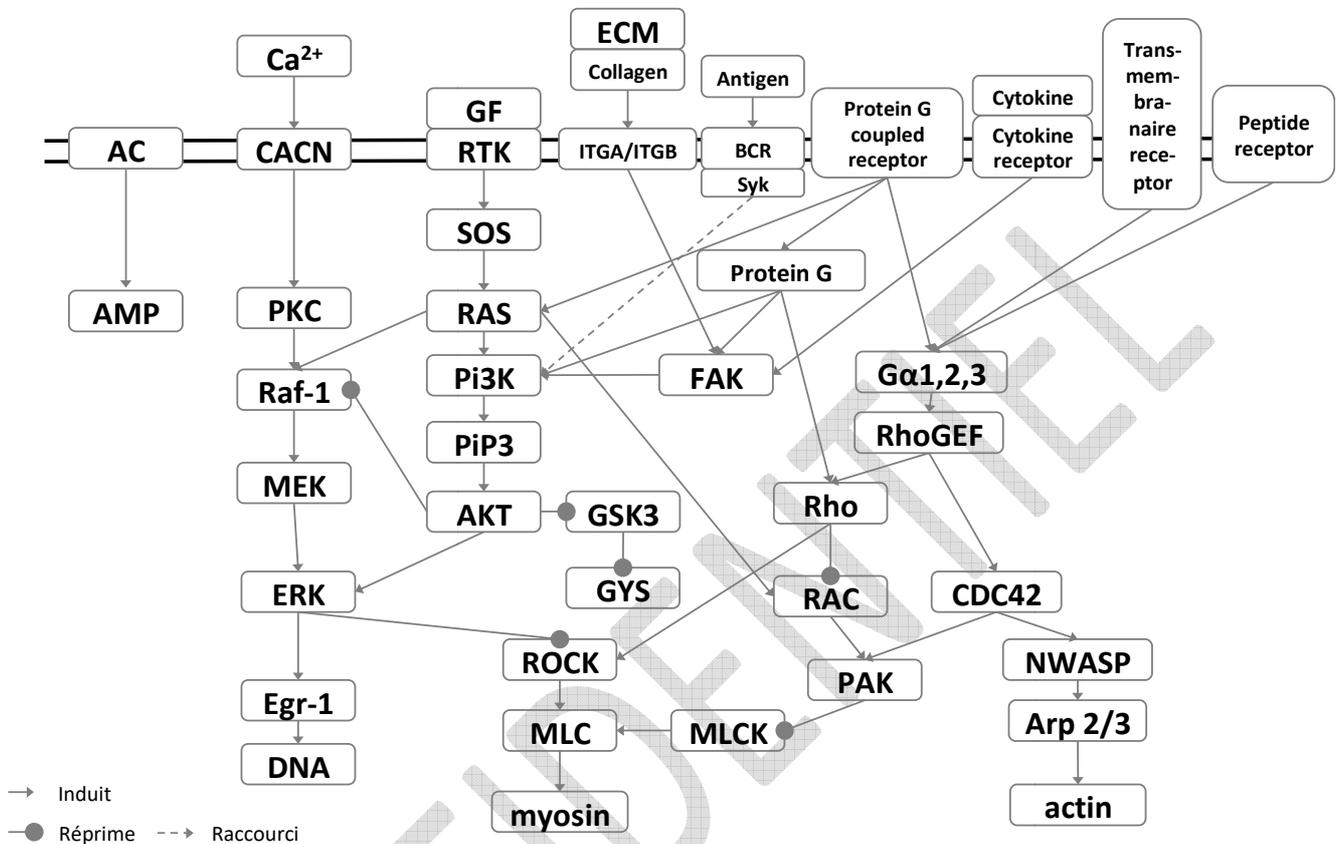
Figure 13. Voie de passage de l'hème et sa voie de dégradation.

Afin de pouvoir transporter ces pigments, une chaîne de cascade s'active (Figure 14), afin de pouvoir remodeler l'actin du cytosquelette et laisser passer les vésicules pigmentaires et permettre par la suite leur intégration dans la coquille.

Le système d'intégration des pigments dans la coquille se fait probablement par la voie des glycanes mais être encore approfondies.

En conclusion, les trois différents profils de coloration interne des coquilles étudiées sont dûs à une perturbation de la voie de synthèse hémique, ainsi qu'à sa dégradation. Le phénotype rouge est dû principalement à de l'uroporphyrin, le phénotype jaune, essentiellement à de la bilirubine, et le phénotype vert à de la biliverdine. Ce RNA-Seq a permis, en plus de déceler la voie de synthèse principale de ces pigments, de savoir comment ils sont vectorisés au sein de la cellule, et probablement dérive de leur intégration de la coquille. Une analyse approfondie supplémentaire de ces résultats permettra de valider ces hypothèses. Il est aussi nécessaire de réaliser des qPCR sur les différents gènes clés de ces différentes voies de passage dans le but de pouvoir affirmer ces découvertes. Ces qPCR seront réalisées sur des individus sauvages (non issus d'écloserie) dans le

but de pouvoir confirmer que l'apparition de ces pigments par la perturbation de la voie de passage de hème n'est pas dû à un effet de famille des individus utilisés pour le RNA-Seq.



AKT: AKT serine/threonine kinase; Arp 2/3: actin related protein 2/3 complex subunit 5; CACN: calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C; CDC42: cell division cycle 42; Egr-1: early growth response 1; ERK: mitogen-activated protein kinase; FAK: protein tyrosine kinase; GF: Growth factor; GSK3: glycogen synthase kinase 3; GYS: glycogen synthase, IGGA/B: integrin subunit; Gα1,2,3: guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; MLC: myosin light chain; MLCK: myosin light chain kinase family member; NWASP: Wiskott-Aldrich syndrome; PAK: p21 (RAC1) activated kinase 4; Pi3K: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PKC: protein kinase C alpha; Rac: Rac family small GTPase 1; Raf-1: Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase; RAS: HRas proto-oncogene, GTPase; Rho: ras homolog family member A; RhoGEF: Rho guanine nucleotide exchange factor 12; ROCK: Rho associated coiled-coil containing protein kinase; RTK: Receptor tyrosine kinase; SOS: SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1

Figure 14. Remodulation de l'actine du cytosquelette permettant le passage des vésicules pigmentaires.

6. Références

Bezwoda, W. R., Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Torrance, J. D., MacPhail, A. P., Derman, D. P., & Mayet, F. (1983). The relative dietary importance of haem and non-haem iron. *South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 64(14), 552-556.

Comfort, A. (1951). The pigmentation of molluscan shells. *Biological Reviews*, 26(3), 285-301.

Jones, M. S., & Jones, O. T. G. (1969). The structural organization of haem synthesis in rat liver mitochondria. *Biochemical Journal*, 113(3), 507-514.

Shaanan, B. (1982). The iron–oxygen bond in human oxyhaemoglobin. *Nature*, 296(5858), 683-684.

Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 748-755.

Virtanen, A. I., & Miettinen, J. K. (1949). Formation of biliverdin from legcholeoglobin, the green pigment in leguminous root nodules. *Acta chem. scand*, 3, 17-21.

CONFIDENTIEL