(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
26 juin 2014 (26.06.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/096688 A2

(51) Classification internationale des brevets : *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2013/053144

(22) Date de dépôt international : 17 décembre 2013 (17.12.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1262140 17 décembre 2012 (17.12.2012) FR

(71) Déposants : **IFREMER (INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER)** [FR/FR]; 155 rue Jean-Jacques Rousseau, F-92138 Issy-les-Moulineaux (FR). **DIRECTION DES RESSOURCES MARINES** [FR/FR]; BP 20, F-98713 Papeete (FR). **SKULDTECH** [FR/FR]; 1682 rue de la Valsière - Cap Delta, ZAC Euromédecine II, F-34790 Grabels (FR).

(72) Inventeurs : **JOUBERT, Caroline**; Rue du Puits, 27, CH-2300 La Chaux-de-Fonds (CH). **TAYALE, Alexandre**; Rue du Puits, 27, CH-2300 La Chaux-de-Fonds (CH). **MONTAGNANI, Caroline**; 18 rue de l'Harmattan, F-34830 Jacou (FR). **SAULNIER, Denis**; BP 7004, F-98719 Taravao (Tahiti) (FR). **GUEGUEN, Yannick**; 9 rue de Chemin Vert, F-94100 Saint-Maur-des-Fossés (FR). **PIQUEMAL, David**; 826b chemin des Pensions, F-30380 Saint Christol lès Alès (FR).

(74) Mandataire : **ICOSA**; 83 avenue Denfert-Rochereau, F-75014 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

(54) **Title** : SIGNATURE PREDICTIVE OF THE BIOMINERALIZATION CAPACITY OF A GRAFT-DONOR PEARL OYSTER

(54) **Titre** : SIGNATURE PRÉDICTIVE DE LA CAPACITÉ DE BIOMINÉRALISATION D'UNE HUÎTRE PERLIÈRE DONNEUSE DE GREFFONS

(57) **Abstract** : The present invention relates to a signature predictive of the biomineralization capacity of a graft-donor oyster, said signature comprising the expression profile of at least one biomarker comprising or consisting of a nucleotide sequence selected from SEQ ID NO 1 to SEQ ID NO 42, variants thereof and fragments thereof. Another subject of the invention is a graft-donor pearl oyster with a high biomineralization capacity, characterized in that it has a predictive signature according to the invention. The invention also relates to a biomarker predictive of the biomineralization capacity of a graft-donor pearl oyster, said biomarker being selected from the list consisting of SEQ ID NO 1 to SEQ ID NO 42.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne une signature prédictive de la capacité de biominéralisation d'une huître donneuse de greffons, ladite signature comprenant le profil d'expression d'au moins un biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments. Un autre objet de l'invention est une huître perlière donneuse de greffons de haute capacité de biominéralisation, caractérisée en ce qu'elle présente une signature prédictive selon l'invention. L'invention concerne également un biomarqueur prédictif de la capacité de biominéralisation d'une huître perlière donneuse de greffons, ledit biomarqueur étant sélectionné parmi la liste consistant en SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42.

WO 2014/096688 A2

SIGNATURE PRÉDICTIVE DE LA CAPACITÉ DE BIOMINÉRALISATION D'UNE HUÎTRE PERLIÈRE DONNEUSE DE GREFFONS

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine de la perliculture. La présente invention concerne plus précisément une signature prédictive de la capacité de biominéralisation d'une huître perlière donneuse de greffons. La présente invention concerne également une huître perlière de haute capacité de biominéralisation comprenant la signature selon l'invention.

ÉTAT TECHNIQUE ANTÉRIEUR À L'INVENTION

La perliculture est une activité humaine consistant en la culture, en milieu naturel, d'huîtres perlières *Pinctada sp* en vue de la production de perles de culture. Dans une première étape, les huîtres perlières qui serviront soit d'huîtres donneuses soit d'huîtres receveuses sont collectées et élevées, pour atteindre le niveau de développement nécessaire à la réussite de la greffe. La greffe est une opération chirurgicale au cours de laquelle le greffon, une partie du manteau de l'huître donneuse (environ 4 mm^2) est inséré dans la poche perlière de l'huître receveuse, en combinaison avec une bille de nacre, le nucléus. Une fois insérée dans l'huître perlière receveuse, la bordure épithéliale minéralisatrice du greffon se multiplie et tapisse la poche perlière pour former le sac perlier qui englobe le nucléus. Ledit sac perlier dépose alors des couches de nacre autour du nucléus, formant ainsi la perle (Cochennec-Laureau et al, Aquatic Living Resource, 2010 : 23, 131–140).

On estime que seules 3 à 5% en moyenne des perles produites sont de très bonne qualité. La majorité des perles présentent ainsi des défauts de surface, une couleur non-homogène ou une épaisseur de nacre trop faible. Du fait de l'importance économique de la perliculture, notamment en Polynésie française, il existe un besoin certain d'outils ou de méthodes permettant d'augmenter le pourcentage de perles de qualité produites.

Afin d'identifier les huîtres perlières donneuses ou receveuses présentant des propriétés spécifiques permettant la production de perles de qualité, des approches génétiques, et particulièrement génomiques et transcriptomiques, ont été utilisées.

Les travaux de Wada et Komaru (Aquaculture, 1996, 142 :25-32) ont ainsi permis d'observer un « effet donneuse », correspondant à une influence de l'huître perlière donneuse sur les caractéristiques des perles, et notamment sur leur couleur et leur lustre.

Le brevet américain US 7,163,795 décrit une méthode pour identifier les huîtres capables d'exprimer la protéine Nacrein (une protéine constituant la nacre et potentiellement impliquée dans le processus de biominéralisation), qui peuvent être utilisées en perliculture. Ce brevet décrit également une méthode pour identifier les conditions optimales pour la formation de la perle, ladite méthode comprenant l'analyse de l'expression de la Nacrein. Cependant, la perliculture étant traditionnellement pratiquée en pleine mer, une adaptation des conditions de cultures paraît difficilement réalisable.

Dans deux études successives, Inoue et al. ont décrit la relation entre la qualité de la perle produite et le profil d'expression génique de six gènes impliqués dans la biominéralisation au sein du sac perlier (Inoue et al., Zoological Science, 2011, 28 :32-6 ; Inoue et al., Mar Biotechnol, 2011, 13 :48-55). Les résultats présentés par Inoue et al. 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 obtenue.

En 2011, Kinoshita et al. ont publié les résultats d'une étude à grande échelle d'identification de gènes impliqués dans la biominéralisation chez *Pinctada fucata*, par une approche transcriptomique (Kinoshita et al., PLoS One, 2011;6(6):e21238). Cependant, cette étude ne fait pas de lien entre l'expression génique et la qualité de la perle.

Dans le but d'identifier des huîtres perlières donneuses de greffons de haute capacité de biominéralisation, les Inventeurs ont réalisé une étude transcriptomique et protéomique de grande échelle, et ont analysé la relation entre (1) le profil d'expression génique et (2) la qualité et la croissance (épaisseur de nacre) de la perle lors d'une greffe

expérimentale. Cette étude leur a permis d'identifier une signature génique particulière prédictive de la qualité des perles.

RÉSUMÉ

La présente invention concerne donc une signature prédictive de la capacité de biominéralisation d'une huître donneuse de greffons, ladite signature comprenant le profil d'expression d'au moins deux biomarqueurs comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, ladite signature est prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues et/ou de la vitesse de dépôt nacré autour du nucléus en utilisant ladite huître donneuse.

La présente invention concerne également une signature prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant une huître donneuse et/ou de la vitesse de dépôt nacré autour du nucléus en utilisant ladite huître donneuse, ladite signature comprenant le profil d'expression dans le manteau de ladite huître donneuse d'au moins un biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1, 4, 5, 8, 11, 14, 18, 23, 26, 27, 28, 36, 39, 40 et 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, la signature de l'invention comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 3, 4, 5, 11 et 14, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature est prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant ladite huître donneuse.

Selon un mode de réalisation, la signature de l'invention comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 8, 18, 23, 26, 27, 36, 39 ou 40, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature est prédictive de la vitesse de dépôt nacré autour du nucléus en utilisant ladite huître donneuse.

Selon un mode de réalisation, la signature de l'invention comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 28 ou 42, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature est en outre prédictive du nombre de défauts de surface des perles obtenues en utilisant ladite huître donneuse.

Un autre objet de l'invention est une huître donneuse de greffons de haute capacité de biominéralisation, caractérisée en ce qu'elle présente une signature prédictive telle que définie ci-dessus.

La présente invention concerne également un procédé d'identification d'une huître donneuse selon l'invention, dans lequel :

(a) on détermine, dans un échantillon biologique de ladite huître, le niveau d'expression d'au moins deux biomarqueurs prédictifs tel que décrit ci-dessus, et

(b) on compare le niveau d'expression obtenu à l'étape (a) à un niveau d'expression témoin.

La présente invention concerne également un procédé de sélection d'une huître donneuse selon l'invention, dans lequel :

(a) on détermine, dans un échantillon biologique de ladite huître, le niveau d'expression d'au moins deux biomarqueurs prédictifs tel que décrit ci-dessus, et

(b) on compare le niveau d'expression obtenu à l'étape (a) à un niveau d'expression témoin.

Un autre objet de l'invention concerne en outre un kit permettant la mise en œuvre du procédé selon l'invention, comprenant des moyens de détermination du profil d'expression d'au moins un biomarqueur tel que décrit dans la présente invention. Selon un premier mode de réalisation, lesdits moyens permettent de déterminer le profil d'expression au niveau transcriptomique par RT-PCR, RT-qPCR, PCR quantitative à haut débit. Selon un second mode de réalisation, lesdits moyens permettent de déterminer le profil d'expression au niveau protéique.

Un autre objet de l'invention est un greffon caractérisé en ce qu'il présente une signature prédictive telle que définie ci-dessus, ledit greffon étant une partie de l'épithélium du manteau d'une huître donneuse selon l'invention.

L'invention concerne également une huître receveuse greffée avec un greffon tel que défini ci-dessus, dans laquelle un nucléus est présent.

L'invention concerne en outre un procédé de production d'au moins une perle de qualité supérieure, comprenant la culture d'au moins une huître receveuse selon l'invention, ladite huître comprenant la signature prédictive de l'invention et/ou ayant été identifiée selon le procédé d'identification et/ou de sélection d'huître selon l'invention ; ainsi que la perle obtenue par ledit procédé.

L'invention concerne en outre un biomarqueur prédictif de la capacité de biominéralisation d'une huître donneuse de greffons, ledit biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné parmi la liste consistant en SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné parmi la liste consistant en SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments, pour déterminer la capacité de biominéralisation d'une huître donneuse de greffons. Selon un mode de réalisation, le biomarqueur est sélectionné parmi la liste consistant en SEQ ID NO : 1, 4, 5, 8, 11, 14, 18, 23, 26, 27, 28, 36, 39, 40 et 42, leurs variants et leurs fragments.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 3, 4, 5, 11 et 14, de préférence de la séquence SEQ ID NO : 4, pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles de haute qualité commerciale.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 28 et SEQ ID NO : 42, de préférence la séquence SEQ ID NO : 28 pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles présentant un faible nombre de défauts de surface.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 8, 18, 23, 26, 27, 36, 39 et 40, pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles présentant un faible nombre de défauts de surface.

DÉFINITIONS

Dans la présente invention, les termes suivants ont la signification suivante :

Par « **Perliculture** », on entend une activité humaine ayant pour but la production de perle de cultures par des huîtres perlières, appartenant généralement au genre *Pinctada sp*. Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huître appartient au genre *Pinctada sp*., de préférence, aux espèces *Pinctada fucata*, *Pinctada maxima* ou *Pinctada margaritifera*.

Par « **biomarqueur prédictif de la haute capacité biominéralisatrice d'une huître perlière donneuse** », (ci-après dénommé « biomarqueur prédictif »), on entend une séquence nucléotidique, de préférence un gène, dont le profil d'expression dans une huître donneuse est prédictif de la haute capacité de biominéralisation de ladite huître perlière donneuse, et par conséquent est prédictif de la qualité des perles produites en utilisant cette huître perlière comme donneuse de greffons. Selon un mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif de l'invention comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les 42 séquences nucléotidiques du Tableau 1 ci-dessous, leurs variants et leurs fragments :

Identifiant	Nom	Accession Number (GeneBank)
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2	
SEQ ID NO : 2	C3	
SEQ ID NO : 3	CALC-1	HQ654770
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1	
SEQ ID NO : 5	DERM-2	
SEQ ID NO : 6	C9	
SEQ ID NO : 7	1	
SEQ ID NO : 8	MUCO-2	
SEQ ID NO : 9	C88bis	
SEQ ID NO : 10	shem5-1	HE610376
SEQ ID NO : 11	shem7-2	
SEQ ID NO : 12	C85	
SEQ ID NO : 13	C14	
SEQ ID NO : 14	C18	
SEQ ID NO : 15	C22	
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1	HE610400
SEQ ID NO : 17	C2	
SEQ ID NO : 18	C46	
SEQ ID NO : 19	Cbind-3	
SEQ ID NO : 20	C66ter	
SEQ ID NO : 21	C17	
SEQ ID NO : 22	PLW-2	
SEQ ID NO : 23	PIF-2	HE610401
SEQ ID NO : 24	46	
SEQ ID NO : 25	C6	
SEQ ID NO : 26	C26bis	
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)	
SEQ ID NO : 28	mp11-2	HE610374
SEQ ID NO : 29	PMMG1-2	
SEQ ID NO : 30	73	
SEQ ID NO : 31	C23	
SEQ ID NO : 32	C1	
SEQ ID NO : 33	MNK-1	
SEQ ID NO : 34	PLC-2	
SEQ ID NO : 35	mp9-2	
SEQ ID NO : 36	C75bis	
SEQ ID NO : 37	13	
SEQ ID NO: 38	C35bis	
SEQ ID NO: 39	2	
SEQ ID NO: 40	mp2-2	
SEQ ID NO: 41	C8	
SEQ ID NO: 42	Protinh2-1	HE610399

Tableau 1

Selon un mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif de l'invention comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les 15 séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), mp11-2 SEQ ID NO : 28), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42).

Selon un mode de réalisation de l'invention, les fragments sont des séquences d'acides nucléiques de plus de 25 nucléotides, de préférence de plus de 50, 100, 150, 200 ou plus de 500 nucléotides. Selon un mode de réalisation de l'invention, un fragment d'une séquence SEQ ID NO : X correspond à une séquence nucléotidique de plus de 25 nucléotides contigus, de préférence de plus de 50, 100, 150, 200 ou plus de 500 nucléotides contigus de SEQ ID NO : X.

Selon un mode de réalisation, on entend par variant d'une séquence SEQ ID NO : X toute séquence d'acide nucléique comprenant plus de 25 nucléotides, de préférence de plus de 50, 100, 150, 200 ou plus de 500 nucléotides contigus d'une séquence d'acides nucléotidiques SEQ ID NO : X.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on entend par variant d'une séquence SEQ ID NO : X une séquence comprenant la séquence SEQ ID NO : X et entre 1 à 500, de préférence 1 à 200, plus préférentiellement 1 à 100 acides nucléiques additionnels en 5' et/ou en 3'.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on entend par variant d'une séquence SEQ ID NO: X une séquence présentant des modifications structurelles mineures et conservant la fonction de SEQ ID NO: X. Des exemples de telles modifications structurelles mineures incluent, sans y être limités, des délétions, substitutions ou additions de bases, affectant 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 acides nucléiques.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on entend par variant d'une séquence SEQ ID NO : X une séquence nucléotidique comprenant plus de 25, de préférence plus

de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000 ou 3000 nucléotides ayant une identité de plus de 75%, 80%, 90%, 95%, ou plus de 96%, 97%, 98%, 99% avec la séquence SEQ ID NO : X.

Au sens de la présente invention, le terme «identité», lorsqu'il est utilisé dans une relation entre les séquences de deux ou plusieurs séquences nucléotidiques, se réfère au degré de parenté entre ces séquences nucléotidiques, tel que déterminé par le nombre de correspondances entre les chaînes de deux bases ou plus.

Selon l'invention, l' « identité » correspond à un pourcentage d'identité entre deux (ou plus de 2) séquences. Ce pourcentage est défini comme le nombre de positions pour lesquelles les bases sont identiques lorsque les séquences sont alignées de manière optimale, divisé par le nombre total de bases de la plus petite des 2 séquences. Les différences entre les séquences peuvent être réparties au hasard et sur toutes leurs longueurs.

Deux séquences sont dites alignées de manière optimale lorsque le pourcentage d'identité est maximal. Par ailleurs, comme cela apparaîtra de manière claire à l'homme du métier, il peut être nécessaire de faire appel à des ajouts de positions lacunaires (des « gaps ») de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences. Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques peut donc être déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acides nucléiques à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est alors calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Préférentiellement, les méthodes de détermination de l'identité sont conçues pour donner la plus grande concordance possible entre les séquences comparées.

Le pourcentage d'identité peut être déterminé par un modèle mathématique particulier ou par un programme d'ordinateur (généralement désigné par le terme d'« algorithme »). Des méthodes de calcul de l'identité entre des séquences nucléotidiques sont bien connues de l'homme du métier. Des exemples non limitatifs de telles méthodes incluent celles décrites dans les documents suivants : Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; et Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48, 1073 (1988).

Des méthodes de détermination de l'identité ont été décrites dans des programmes d'ordinateurs accessibles au public. Des exemples préférés de méthodes utilisant des programmes d'ordinateurs incluent, sans y être limités, le progiciel GCG, incluant GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. \2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, et FASTA (Altschul et al., J. MoI. Biol. 215, 403-410 (1990)). Le programme BLASTX est disponible auprès du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et d'autres sources (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). L'algorithme de Smith-Waterman, qui est bien connu de l'homme du métier, peut également être utilisé pour déterminer le pourcentage d'identité entre deux séquences.

Par « **Signature prédictive** », on entend un profil d'expression génique particulier, dont la présence dans une huître perlière donneuse est prédictive de la haute capacité de biominéralisation de ladite huître donneuse, et par conséquent est prédictive de la qualité des perles produites et/ou de la vitesse de dépôt nacré autour du nucleus en utilisant cette huître donneuse. Selon un mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive de l'invention comprend de 1 à 42 biomarqueurs prédictifs tels que décrits ci-dessus.

Par « **Huître donneuse de haute capacité de biominéralisation** », on entend une huître donneuse de greffons permettant l'obtention de perles de qualité supérieure, et/ou l'obtention plus rapide de perles de qualité supérieure. Ainsi, selon un mode de réalisation, une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation permet l'obtention d'une perle présentant une épaisseur de nacre autour du nucléus supérieure ou égale à 0.8 mm, de préférence supérieure ou égale à 1.5 mm, en moins de 24 mois, de préférence en moins de 21 mois, plus préférentiellement en moins de 18 mois. Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huître donneuse de haute capacité de biominéralisation de l'invention conduit à l'obtention de 100% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure à 0.8 mm après 18 mois de culture, et/ou à l'obtention de 30,2 % de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure à 1,5 mm après 18 mois de culture. Par comparaison, en l'absence de sélection des huîtres donneuses, ces pourcentages sont respectivement de 80,9 et 13,4 %.

Par « **perles de qualité supérieure** », on entend une perle ayant une caractéristique d'épaisseur de nacre autour du nucleus (obtention d'un dépôt nacré autour du nucleus plus important avec le même temps de culture), et/ou un nombre de défaut à la surface, et/ou une qualité commerciale supérieurs ou inférieurs à des seuils prédéterminés. Dans le cadre de la présente invention, la qualité d'une perle peut être évaluée par 3 variables : une variable « épaisseur de nacre », une variable « nombre de défauts à la surface des perles », et une variable « qualité commerciale ». Selon l'invention, une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation est une huître présentant au moins un biomarqueur prédictif selon l'invention et/ou au moins une signature prédictive de l'invention.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'épaisseur de nacre d'une perle correspond à l'épaisseur en millimètres de nacre présente autour du nucleus de la perle. Celle-ci peut être mesurée, par exemple, par soustraction du diamètre du nucléus au plus petit diamètre de la perle et division de la différence de diamètre par 2. Selon un mode de réalisation de l'invention, les diamètres des perles et des nucléi peuvent être mesurés par informatique à partir d'images de perles et de nucléus scannés. Un exemple non-limitatif de logiciel d'analyse qui peut être utilisé pour la mesure de la taille des perles

et des nucléus est le logiciel ImageJ. Selon un mode de réalisation de l'invention, une perle de qualité supérieure présente une épaisseur de nacre de plus de 0.8 mm, de préférence de plus de 1.2 mm, encore plus préférentiellement de plus de 1.5 mm.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'estimation de la qualité des perles en fonction du nombre de défauts correspond à la classification de chaque perle dans une classification comprenant 4 classes, en fonction du nombre de défauts observés à leur surface. Les défauts pris en considération pour cette classification sont les piqûres, les boursouflures et les comètes. Selon un mode de réalisation de l'invention, la première classe comprend les perles sans défaut ; la seconde classe comprend les perles présentant de 1 à 5 défauts ; la troisième classe comprend les perles présentant plus de 5 défauts et la quatrième classe comprend les perles entièrement recouvertes de défauts. Selon un mode de réalisation de l'invention, une perle de qualité supérieure appartient à la première classe relative au nombre de défauts, i.e. ne présente aucun défaut.

Selon un mode de réalisation, la qualité commerciale de la perle s'apprécie selon l'état de surface (présence ou absence d'imperfections) et le lustre (éclat ou brillance) de la perle, conformément à la définition donnée dans la Délibération n°2005-42 du 4 février 2005 (Journal Officiel de la Polynésie). Selon cette délibération, l'appréciation de la qualité de la perle correspond à la classification des perles en 5 catégories de qualité, de la classe A à la classe D et à la classe « Rebut ». Selon un mode de réalisation de l'invention, une perle de qualité supérieure appartient à la classe A.

Au sens de la présente invention, le terme « **environ** », placé devant un nombre, signifie plus ou moins 10% de la valeur nominale de ce nombre.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE

La présente invention a pour objet une huître perlière donneuse de haute capacité de biominéralisation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence

en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, de préférence supérieure ou égale à environ 1.2 mm, plus préférentiellement supérieure ou égale à environ 1.5 mm.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de 100% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, après une période de culture d'environ 15 mois, de préférence d'environ 16 mois, plus préférentiellement d'environ18 mois.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de plus d'environ 30% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 1.5 mm, après une période de culture d'environ 15 mois, de préférence d'environ 16 mois, plus préférentiellement d'environ 18 mois.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface. Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention d'environ 10 à 20%, de préférence d'environ 12.5 à 17.5%, plus préférentiellement d'environ 14.3% de perles ne présentant aucun défaut de surface. Par comparaison, les Inventeurs ont montré que les huîtres donneuses de greffons habituellement utilisées ne permettent l'obtention que d'environ 5.2% de perles ne présentant aucun défaut de surface.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10%, 20%, plus préférentiellement de plus de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B. Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses

de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention d'environ 10 à 50%, de préférence d'environ 20 à 30%, plus préférentiellement d'environ 24.3% de perles de catégorie A. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention d'environ 25 à 70%, de préférence d'environ 40 à 60%, encore plus préférentiellement d'environ 51.4% de perles de catégorie A ou B. Par comparaison, les Inventeurs ont montré que les huîtres donneuses de greffons habituellement utilisées ne permettent l'obtention que d'environ 4.6% de perles de catégorie A et d'environ 19.5% de perles de catégorie A ou B.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation (1) permettent l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, et (2) permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation (1) permettent l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, et (2) permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention (1) de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface, et (2) de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent (1) l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm; (2) l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface, et (3) l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon la présente invention, l'huître donneuse de haute capacité de biominéralisation comprend un biomarqueur prédictif de la qualité biominéralisatrice, et/ou une signature prédictive de la qualité biominéralisatrice.

La présente invention concerne donc également un biomarqueur prédictif de la capacité de biominéralisation d'une huître.

La présente invention a donc également pour objet une signature prédictive de la capacité biominéralisatrice d'une huître donneuse de greffons.

Selon l'invention, le biomarqueur prédictif de la capacité de biominéralisation d'une huître est une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi la liste comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42 présentées dans le tableau 1, leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif de l'invention comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les 15 séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), mp11-2 SEQ ID NO : 28), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42).

Selon l'invention, la signature prédictive de l'invention comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi la liste comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42 présentées dans le tableau 1, leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive de l'invention comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les 15 séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), mp11-2 SEQ ID NO : 28), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42).

Selon un mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive de l'invention comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ou 42 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi la liste comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42 présentées dans le tableau 1, leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive de l'invention comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les 15 séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), mp11-2 SEQ ID NO : 28), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42).

Selon un mode de réalisation, l'huître donneuse de haute capacité de biominéralisation selon l'invention permet l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, de préférence supérieure ou égale à environ 1.2 mm, plus préférentiellement supérieure ou égale à environ 1.5 mm.

Selon ce mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du Tableau 2, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 10	shem5-1
SEQ ID NO : 11	shem7-2
SEQ ID NO : 12	C85
SEQ ID NO : 13	C14
SEQ ID NO : 14	C18
SEQ ID NO : 15	C22
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1
SEQ ID NO : 17	C2
SEQ ID NO : 18	C46
SEQ ID NO : 19	Cbind-3
SEQ ID NO : 20	C66ter
SEQ ID NO : 21	C17
SEQ ID NO : 22	PLW-2
SEQ ID NO : 23	PIF-2
SEQ ID NO : 24	46
SEQ ID NO : 25	C6
SEQ ID NO : 26	C26bis
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)
SEQ ID NO : 29	PMMG1-2
SEQ ID NO : 30	73

SEQ ID NO : 31	C23
SEQ ID NO : 32	C1
SEQ ID NO : 33	MNK-1
SEQ ID NO : 34	PLC-2
SEQ ID NO : 35	mp9-2
SEQ ID NO : 36	C75bis
SEQ ID NO : 37	13
SEQ ID NO: 38	C35bis
SEQ ID NO: 39	2
SEQ ID NO: 40	mp2-2
SEQ ID NO: 41	C8

Tableau 2

Selon un mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40).

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le Tableau 2, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le Tableau 2, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 séquences nucléotidiques sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques suivantes, leurs variants et leurs fragments : MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40).

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface.

Selon ce mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif du nombre de défauts à la surface de la perle, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du Tableau 3, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 21	C17
SEQ ID NO : 22	PLW-2
SEQ ID NO : 23	PIF-2
SEQ ID NO : 24	46
SEQ ID NO : 25	C6
SEQ ID NO : 26	C26bis
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)
SEQ ID NO : 28	mp11-2
SEQ ID NO: 42	Protinh2-1

Tableau 3

Selon ce mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif du nombre de défauts à la surface de la perle, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques mp11-2 (SEQ ID NO : 28) et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42).

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné dans le tableau 3, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 3, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts de surface et comprend le profil d'expression d'1 ou de 2 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi les séquences nucléotidiques mp11-2 (SEQ ID NO : 28) et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10%, 20%, plus préférentiellement de plus de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon ce mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif de la qualité commerciale de la perle, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du Tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 10	shem5-1
SEQ ID NO : 11	shem7-2
SEQ ID NO : 12	C85
SEQ ID NO : 13	C14
SEQ ID NO : 14	C18
SEQ ID NO : 15	C22
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1
SEQ ID NO : 17	C2
SEQ ID NO : 18	C46
SEQ ID NO : 19	Cbind-3
SEQ ID NO : 20	C66ter
SEQ ID NO : 28	mp11-2

Tableau 4

Selon ce mode de réalisation, le biomarqueur prédictif est prédictif de la qualité commerciale de la perle, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), leurs variants et leurs fragments.

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné dans le tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation (1) permettent l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, et (2) permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface.

Selon ce mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif est prédictif de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et du nombre de défauts à la surface de la perle et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du Tableau 5, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 21	C17
SEQ ID NO : 22	PLW-2
SEQ ID NO : 23	PIF-2
SEQ ID NO : 24	46
SEQ ID NO : 25	C6
SEQ ID NO : 26	C26bis
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)

Tableau 5

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et du nombre de défauts à la surface de la perle et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 5, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et du nombre de défauts à la surface de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 5, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et du nombre de défauts à la surface de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 2, leurs variants et leurs fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 3, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus et du nombre de défauts à la surface de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), leurs variants et leurs

fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou de 2 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi les séquences nucléotidiques mp11-2 (SEQ ID NO : 28) et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation (1) permettent l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm, et (2) permettent l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon ce mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif est prédictif de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du tableau 6, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 10	shem5-1
SEQ ID NO : 11	shem7-2
SEQ ID NO : 12	C85
SEQ ID NO : 13	C14
SEQ ID NO : 14	C18
SEQ ID NO : 15	C22
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1
SEQ ID NO : 17	C2
SEQ ID NO : 18	C46
SEQ ID NO : 19	Cbind-3
SEQ ID NO : 20	C66ter

Tableau 6

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 6, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 6, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 2, leurs variants et leurs fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), leurs variants et leurs fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CALC-1

(SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent l'obtention (1) de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles ne présentant aucun défaut de surface, et (2) de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon ce mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif est prédictif du nombre de défauts à la surface de la perle et de la qualité commerciale de la perle et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du tableau 7, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis
SEQ ID NO : 28	mp11-2

Tableau 7

Selon ce mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 7, leurs variants et leurs fragments.
Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 7, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 3, leurs variants et leurs fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou de 2 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi les séquences nucléotidiques mp11-2 (SEQ ID NO : 28) et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42),leurs variants et leurs fragments ; et (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation permettent (1) l'obtention, en moins de 24 mois de culture, de préférence en moins de 21 mois de culture, plus préférentiellement en moins de 18 mois de culture, de plus d'environ 25%, de préférence d'environ 30%, plus préférentiellement de plus d'environ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore plus préférentiellement de plus d'environ 95% de perles présentant une épaisseur de nacre supérieure ou égale à environ 0.8 mm; (2) l'obtention de plus de 5%, de préférence de plus de 10%, plus préférentiellement de plus de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%

de perles ne présentant aucun défaut de surface, et (3) l'obtention de plus de 5%, de préférence plus de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de perles de catégorie A et/ou B.

Selon ce mode de réalisation de l'invention, le biomarqueur prédictif est prédictif de l'épaisseur, du nombre de défauts à la surface et de la qualité commerciale de la perle, et comprend ou consiste en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques du tableau 8, leurs variants et leurs fragments.

Identifiant	Nom du gène
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2
SEQ ID NO : 2	C3
SEQ ID NO : 3	CALC-1
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1
SEQ ID NO : 5	DERM-2
SEQ ID NO : 6	C9
SEQ ID NO : 7	1
SEQ ID NO : 8	MUCO-2
SEQ ID NO : 9	C88bis

Tableau 8

Selon ce mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, du nombre de défauts et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 8, leurs variants et leurs fragments.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, du nombre de défauts et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 8, leurs variants et leurs fragments.

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts, de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une

séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 2, leurs variants et leurs fragments ; (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 3, leurs variants et leurs fragments ; et (3) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ou d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée dans le tableau 4, leurs variants et leurs fragments.

Selon ce mode de réalisation, la signature prédictive est prédictive du nombre de défauts, de l'épaisseur et de la qualité commerciale de la perle et comprend le profil d'expression (1) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C46 (SEQ ID NO : 18), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C26bis (SEQ ID NO : 26), C54(C53bis) (SEQ ID NO : 27), C75bis (SEQ ID NO : 36), 2 (SEQ ID NO : 39), mp2-2 (SEQ ID NO : 40), leurs variants et leurs fragments ; (2) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou de 2 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi les séquences nucléotidiques mp11-2 (SEQ ID NO : 28) et Protinh2-1 (SEQ ID NO : 42), leurs variants et leurs fragments ; et (3) d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique d'1 ou d'une combinaison de 2, 3, 4, 5 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), shem7-2 (SEQ ID NO : 11), C18 (SEQ ID NO : 14), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive de l'invention n'est pas constituée par les profils d'expression de SEQ ID NO : 28 et de SEQ ID NO : 42.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive de l'invention n'est pas constituée par les profils d'expression de SEQ ID NO : 42 ou de SEQ ID NO : 28.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive de l'invention comprend ou est constituée par le profil d'expression de SEQ ID NO : 4. Selon un mode de réalisation, cette signature prédictive est prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant une huître donneuse dotée de ladite signature.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive de l'invention comprend ou est constituée par le profil d'expression de SEQ ID NO : 28. Selon un mode de réalisation, cette signature prédictive est prédictive du nombre de défauts de surface des perles obtenues en utilisant une huître donneuse dotée de ladite signature.

Selon un mode de réalisation, la signature prédictive de l'invention comprend ou est constituée par la combinaison des profils d'expression de SEQ ID NO : 28 et SEQ ID NO : 4. Selon un mode de réalisation, cette signature prédictive est prédictive du nombre de défauts de surface des perles obtenues et de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant une huître donneuse dotée de ladite signature.

Selon un mode de réalisation de l'invention, une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation présente une surexpression ou une sous-expression d'au moins un biomarqueur prédictif par rapport à un échantillon témoin.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la signature prédictive de l'invention correspond à une surexpression ou à une sous-expression d'au moins un biomarqueur prédictif au sein du tissu biominéralisateur d'une huître perlière donneuse de greffons par rapport à un échantillon témoin tel que défini ci-dessous.

Selon un mode de réalisation de l'invention, une surexpression ou une sous-expression d'une séquence nucléotidique par rapport à un échantillon témoin correspond à une différence du niveau d'expression d'un facteur supérieur ou égal à 2, de préférence supérieur ou égal à 5, plus préférentiellement supérieur ou égal à 10 et encore plus préférentiellement d'un facteur supérieur ou égal à 25 par rapport à l'échantillon témoin.

Selon un mode de réalisation, une huître perlière donneuse de haute capacité de biominéralisation présente une surexpression ou une sous-expression d'au moins un

biomarqeur prédictif par rapport à l'échantillon témoin tel que défini ci-dessous, selon le tableau 9 ci-dessous.

Identifiant	Nom	Variable impactée	Surexpression / Sous-expression
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 2	C3	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 3	CALC-1	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 5	DERM-2	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	-
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 6	C9	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	-
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 7	1	Épaisseur	-
		Nombre de défauts	-
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 8	MUCO-2	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 9	C88bis	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	-
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 10	shem5-1	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 11	shem7-2	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 12	C85	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 13	C14	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 14	C18	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 15	C22	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 17	C2	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	-

SEQ ID NO : 18	C46	Épaisseur	-
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 19	Cbind-3	Épaisseur	-
		Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 20	C66ter	Épaisseur	+
		Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 21	C17	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 22	PLW-2	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	-
SEQ ID NO : 23	PIF-2	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 24	46	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 25	C6	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	-
SEQ ID NO : 26	C26bis	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)	Épaisseur	+
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 28	mp11-2	Qualité commerciale	-
		Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 29	PMMG1-2	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 30	73	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 31	C23	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 32	C1	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 33	MNK-1	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 34	PLC-2	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 35	mp9-2	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 36	C75bis	Épaisseur	+
SEQ ID NO : 37	13	Épaisseur	+
SEQ ID NO: 38	C35bis	Épaisseur	-
SEQ ID NO: 39	2	Épaisseur	-
SEQ ID NO: 40	mp2-2	Épaisseur	-
SEQ ID NO: 41	C8	Épaisseur	+
SEQ ID NO: 42	Protinh2-1	Nombre de défauts	-

+ : surexpression par rapport à l'échantillon témoin
- : sous-expression par rapport à l'échantillon témoin

Tableau 9

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'échantillon témoin correspond à un ensemble d'huîtres perlières donneuses de greffons représentatif de la population naturelle (sauvage) d'huîtres perlières donneuses à disposition des professionnels de la perliculture, et utilisées dans le cadre de greffes à but commercial.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le niveau d'expression relatif des biomarqueurs prédictifs est déterminé par PCR quantitative selon la méthode du 2^-ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001) selon la formule suivante : fold = 2^-ΔΔCt = ^-[DCt cible – DCt calibrator], par la comparaison des deux groupes d'huitres perlières donneuses suivants :

- le « Groupe A » (cible), correspondant, selon ce mode de réalisation de l'invention, aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité supérieure (épaisseur de nacre importante, peu de défauts de surface et/ou meilleure classification de qualité) ; et
- le « Groupe B » (témoin ou calibrator) correspondant, selon ce mode de réalisation, à un ensemble d'huîtres perlières donneuses de greffons représentatif de la population naturelle (sauvage) d'huîtres perlières donneuses à disposition des professionnels de la perliculture, et utilisées dans le cadre de greffes à but commercial.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode de PCR quantitative est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes. Le Ct correspond au numéro du cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise par lesdites sondes dépasse un seuil prédéterminé.

Selon un premier mode de réalisation, le DCt cible correspond à la moyenne des différences de Ct entre les biomarqueurs prédictifs d'intérêt et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe cible « A » ; et le DCt calibrator correspond à la moyenne des différences de Ct entre les biomarqueurs prédictifs et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe calibrator « B ».

Selon un second mode de réalisation, le DCt cible correspond à la médiane des différences de Ct entre les biomarqueurs prédictifs et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe cible « A » ; et le DCt calibrator correspond à la médiane des différences de Ct entre les biomarqueurs prédictifs et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe calibrator « B ».

La présente invention concerne également un greffon issu d'une huître perlière donneuse de haute capacité de biominéralisation selon l'invention.

La présente invention concerne donc un greffon comprenant un biomarqueur prédictif selon l'invention et/ou une signature prédictive selon l'invention.

La présente invention concerne également une huître receveuse greffée comprenant un greffon issu d'une huître donneuse identifiée par le procédé d'identification de l'invention.

Selon un mode de réalisation, suite à la greffe d'une huître receveuse par un greffon issu d'une huître donneuse selon l'invention, la signature prédictive selon l'invention peut être retrouvée au niveau du sac perlier de ladite huître receveuse.

Selon un mode de réalisation, ladite signature prédictive chez l'huître receveuse est prédictive du nombre de défauts à la surface de la perle, et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique, de préférence de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CLEC2-2 (SEQ ID NO : 1) ; C9 (SEQ ID NO : 6) ; MUCO-2 (SEQ ID NO : 8) ; C26bis (SEQ ID NO : 26) ; C54 (SEQ ID NO : 27) ; CALC-1 (SEQ ID NO : 3) ; C18 (SEQ ID NO : 14) et Cbind-3 (SEQ ID NO : 19), leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite signature prédictive correspond à une surexpression de CLEC2-2 (SEQ ID NO : 1), C9 (SEQ ID NO : 6), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C26bis (SEQ ID NO : 26) et/ou C54 (SEQ ID NO : 27), leurs variants et leurs fragments ; et/ou à une sous-expression de CALC-1 (SEQ ID NO : 3) ; C18 (SEQ ID NO : 14) et/ou Cbind-3 (SEQ ID NO : 19), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, ladite signature prédictive chez l'huître receveuse est prédictive de la qualité commerciale de la perle, et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique, de préférence de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi C3 (SEQ ID NO : 2) ; CALC-1 (SEQ ID NO : 3) ; CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4) ; MUCO-2 (SEQ ID NO : 8) ; C2 (SEQ ID NO : 17) ; C46 (SEQ ID NO : 18) et Cbind-3 (SEQ ID NO : 19), leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite signature prédictive correspond à une

sous-expression de C3 (SEQ ID NO : 2), CALC-1 (SEQ ID NO : 3), CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C2 (SEQ ID NO : 17), C46 (SEQ ID NO : 18) et/ou Cbind-3 (SEQ ID NO : 19), leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, ladite signature prédictive chez l'huître receveuse est prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, et comprend le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique, de préférence de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 séquences nucléotidiques sélectionnées parmi CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4) ; DERM-2 (SEQ ID NO : 5) ; MUCO-2 (SEQ ID NO : 8) ; C88bis (SEQ ID NO : 9) ;C18 (SEQ ID NO : 14) ; Protinh3-1 (SEQ ID NO : 16) ;C17 (SEQ ID NO : 21) ; PIF-2 (SEQ ID NO : 23) ; C6 (SEQ ID NO : 25) ; C26bis (SEQ ID NO : 26) ; C54 (SEQ ID NO : 27) ; CALC-1 (SEQ ID NO : 3) ; C46 (SEQ ID NO : 18) ; PMMG1-2 (SEQ ID NO : 29) et C35bis (SEQ ID NO : 38), leurs variants et leurs fragments. Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite signature prédictive correspond à une surexpression de CLEC3-1 (SEQ ID NO : 4), DERM-2 (SEQ ID NO : 5), MUCO-2 (SEQ ID NO : 8), C88bis (SEQ ID NO : 9), C18 (SEQ ID NO : 14), Protinh3-1 (SEQ ID NO : 16), C17 (SEQ ID NO : 21), PIF-2 (SEQ ID NO : 23), C6 (SEQ ID NO : 25), C26bis (SEQ ID NO : 26) et/ou C54 (SEQ ID NO : 27), leurs variants et leurs fragments ; et/ou à une sous-expression de CALC-1 (SEQ ID NO : 3), C46 (SEQ ID NO : 18), PMMG1-2 (SEQ ID NO : 29) et/ou C35bis (SEQ ID NO : 38), leurs variants et leurs fragments.

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation.

Selon la présente invention, le procédé d'identification d'huîtres donneuses de haute capacité de biominéralisation comprend :

(a) la détermination du profil d'expression d'un biomarqueur prédictif ou de plusieurs biomarqueurs prédictifs formant une signature prédictive dans un échantillon d'une huître donneuse de greffons, ladite signature étant prédictive de la qualité biominéralisatrice, et

(b) la comparaison du profil d'expression obtenu à l'étape (a) à un profil d'expression témoin obtenu au sein d'un groupe d'huîtres perlières donneuses de greffons représentatif de la population naturelle (groupe B « calibrator »).

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention comprend la détermination de la présence d'une signature prédictive de l'épaisseur de nacre autour du nucléus, du nombre de défauts à la surface de la perle et/ou de la qualité commerciale de la perle, comme décrite ci-dessus.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention permet la comparaison des capacités biominéralisatrices de deux groupes d'huîtres donneuses (groupe « cible » A et groupe « calibrator » B), et le niveau d'expression du groupe d'huîtres perlières donneuses « calibrator » B sert de référence à l'établissement d'un profil d'expression au sein du groupe d'huîtres perlières donneuses de haute propriété de biominéralisation « cible » A.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'analyse du profil d'expression est réalisée sur un greffon de l'huître donneuse, de préférence à la suite de l'étape de prélèvement.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'analyse du profil d'expression est réalisée sur le manteau d'huîtres donneuses de greffon, avant l'étape de greffe.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'analyse du profil d'expression est réalisée sur le sac perlier d'huîtres ayant reçu un greffon, après l'étape de greffe.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la détermination du profil d'expression est réalisée au niveau de l'ARN, de l'ADN et/ou de la protéine.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la détermination du profil d'expression correspond à la détermination du niveau de transcription du ou des biomarqueur(s) prédictif(s) considéré(s). Les méthodes de détermination du niveau de transcription d'une séquence nucléotidique sont bien connues de l'homme du métier, et comprennent, sans y être limitées, les méthodes suivantes : RT-PCR, RT-PCR quantitative (RT-qPCR), RT-qPCR à haut débit, puce à ADN, puce à ARN.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la détermination du profil d'expression est réalisée au niveau protéique, et correspond au niveau de traduction du ou des biomarqueurs(s) prédictifs(s) considéré(s). Les méthodes de détermination du niveau de traduction d'une séquence nucléotidique (i.e. d'expression de la protéine traduite) sont bien connues de l'homme du métier, et comprennent, sans y être limitées, les méthodes suivantes : Western-Blot, immunochimie, ELISA, ELISA Sandwich, PAGE…

La présente invention a également pour objet une huître identifiée par le procédé d'identification de l'invention. Selon ce mode de réalisation, l'huître identifiée possède un profil d'expression spécifique d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

La présente invention a également pour objet un kit pour déterminer la présence d'un biomarqueur prédictif selon l'invention ou d'une signature prédictive selon l'invention.

Le kit selon l'invention permet donc la mise en œuvre du procédé d'identification de l'invention.

Selon l'invention, le kit comprend au moins un moyen permettant de déterminer le profil d'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné parmi la liste comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend un échantillon témoin correspondant à du matériel biologique de tissus biominéralisateur (manteau) d'huîtres perlières donneuses de greffons issues de la population naturelle.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le kit selon l'invention comprend des moyens permettant de déterminer le profil d'expression au niveau transcriptomique par RT-PCR, RT-qPCR, PCR quantitative à haut débit.

Selon ce mode de réalisation, le kit comprend des moyens d'extraction de l'ARN total, des moyens de rétro-transcription, et/ou des moyens d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique

sélectionnée parmi la liste comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les moyens d'amplification comprennent une polymérase et un tampon, des nucléotides libres et au moins un couple d'amorces, dont chaque amorce s'hybride de façon spécifique et efficace avec une séquence sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les couples d'amorces sont sélectionnés parmi les couples du Tableau 10 ci-dessous :

Identifiant	Nom	Amorce sens	Amorce antisens
SEQ ID NO : 1	CLEC2-2	AGCTACTGGCGCTCGATG (SEQ ID NO: 43)	TGCAGATGAAGCCATGTGAG (SEQ ID NO: 44)
SEQ ID NO : 2	C3	ATTTCCACCACAGCCAGTAAAC (SEQ ID NO: 45)	CGTGGTACGGTGTGTCCTAAC (SEQ ID NO: 46)
SEQ ID NO : 3	CALC-1	CTCCATGCACAGACATGACC (SEQ ID NO: 47)	GCCAGTAATACGGACCTTGG (SEQ ID NO: 48)
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1	CATCGGTGACCATAGCCATAC (SEQ ID NO: 49)	CGTCTTTCAAGGAAGCTGTTG (SEQ ID NO: 50)
SEQ ID NO : 5	DERM-2	CACAGTGGTCACGAGGACAG (SEQ ID NO: 51)	TGATGCAACTTGGGGTCAG (SEQ ID NO: 52)
SEQ ID NO : 6	C9	CCGGACACTGGAAGTCATTAG (SEQ ID NO: 53)	TGCTCTGCACCCAGAATATG (SEQ ID NO: 54)
SEQ ID NO : 7	1	CAATAAATAAAATACGGCACAGTTC (SEQ ID NO: 55)	AGAAAATGCTGCTATTAAATGGTG (SEQ ID NO: 56)
SEQ ID NO : 8	MUCO-2	AGTGGAACCGGAACTGGTG (SEQ ID NO: 57)	CACATCTCCAACTCCAGCAAG (SEQ ID NO: 58)
SEQ ID NO : 9	C88bis	CCGGCTCCGTTACCACTAC (SEQ ID NO: 59)	CCTATGGGCTGGTCGTACTC (SEQ ID NO: 60)
SEQ ID NO : 10	shem5-1	GTCCGAAACCAAATCGTCTG (SEQ ID NO: 61)	CTGTGGTGATGGTGACTTCG (SEQ ID NO: 62)
SEQ ID NO : 11	shem7-2	TAGCAAGCGCCAAATATGC (SEQ ID NO: 63)	AAGTGATGCCGAACCTAACC (SEQ ID NO: 64)
SEQ ID NO : 12	C85	AGTTCGTTTTGGTCCACCTG (SEQ ID NO: 65)	TTCAGGGTGCCATCTTGTC (SEQ ID NO: 66)
SEQ ID NO : 13	C14	TGCATTTCGCATTGTTGTATG (SEQ ID NO: 67)	CATGTGCAGCCTCAAGGTATC (SEQ ID NO: 68)
SEQ ID NO : 14	C18	CCGCGTCAAGACCATATACG (SEQ ID NO: 69)	GCAGCATTTGTAAACCATTCG (SEQ ID NO: 70)
SEQ ID NO : 15	C22	CAACAAACCATCGGTCCTTAC (SEQ ID NO: 71)	TGCATAGGTCCCGGTAAAATAG (SEQ ID NO: 72)
SEQ ID NO : 16	Protinh3-1	TATGCGTGTGACTGTCCTGA (SEQ ID NO: 73)	TCAATGCAAACGATCTGTCC (SEQ ID NO: 74)

SEQ ID NO : 17	C2	TGTTGGGTGGTCATCGTAAG (SEQ ID NO: 75)	CCACATGCGGCAGATACTC (SEQ ID NO: 76)
SEQ ID NO : 18	C46	CCTGTTTGCCTGATGTTGTG (SEQ ID NO: 77)	CGACAGCCATACTCATCCAG (SEQ ID NO: 78)
SEQ ID NO : 19	Cbind-3	CATTGTGCGTGAGTTTGGAG (SEQ ID NO: 79)	TGCTGATTGGTTCATTGAGG (SEQ ID NO: 80)
SEQ ID NO : 20	C66ter	GGCTGGTGGAGCCAATATG (SEQ ID NO: 81)	TGACTTGAAATTCCCTTTTGTTG (SEQ ID NO: 82)
SEQ ID NO : 21	C17	CCCTTGGGAACAAAGGTACAG (SEQ ID NO: 83)	CATTGAATAAACGCCAACAAGTAG (SEQ ID NO: 84)
SEQ ID NO : 22	PLW-2	AATTCTTCAGCCCGGATATTG (SEQ ID NO: 85)	TCCTGACCTCCAGGGTGTAG (SEQ ID NO: 86)
SEQ ID NO : 23	PIF-2	TGATAACGGAGACGACGATG (SEQ ID NO: 87)	AGGCACAATCACGAGAACTG (SEQ ID NO: 88)
SEQ ID NO : 24	46	TGAACAAACAAATTGCAAAGTC (SEQ ID NO: 89)	TCAAAGCAAAGAAACAGTAAAGC (SEQ ID NO: 90)
SEQ ID NO : 25	C6	GCGATGACGACGTTTCTACC (SEQ ID NO: 91)	GGATTGGTTCGTTGTAAGCTATG (SEQ ID NO: 92)
SEQ ID NO : 26	C26bis	GGGAGTTTGTCAGGGATTACTCC (SEQ ID NO: 93)	GGTTCTCGCAAATTCCTTTCTG (SEQ ID NO: 94)
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)	TGCAACCCTGATCCTACTCC (SEQ ID NO: 95)	CGGAGATTGAACCAAAGCAG (SEQ ID NO: 96)
SEQ ID NO : 28	mp11-2	GTCCGAGGAATCATGGTAGC (SEQ ID NO: 97)	GTGCAGAGGTCCCGACAG (SEQ ID NO: 98)
SEQ ID NO : 29	PMMG1-2	CGGAAACTGGAAAGTTCAGG (SEQ ID NO: 99)	CATAGGACTGAAGGTCACATGG (SEQ ID NO: 100)
SEQ ID NO : 30	73	TTGAGCGTATCCACATCCAG (SEQ ID NO: 101)	GCAACACATTTGGAATGCAC (SEQ ID NO: 102)
SEQ ID NO : 31	C23	CCCAACCCTCCTATTATATGTCC (SEQ ID NO: 103)	TGACCGCGTCCTTATGATTAC (SEQ ID NO: 104)
SEQ ID NO : 32	C1	ACCCAAAGGCTGGAGATACG (SEQ ID NO: 105)	TTCACCGTCAGGTCTTACGTAGTAG (SEQ ID NO: 106)
SEQ ID NO : 33	MNK-1	TAGGAAATCGTGAGGGCAAC (SEQ ID NO: 107)	TCGCTTAGCCAATCCTGAAC (SEQ ID NO: 108)
SEQ ID NO : 34	PLC-2	CAGCGCCGACGAATTTAC (SEQ ID NO: 109)	AACCATAGCGTCCGTAGCAC (SEQ ID NO: 110)
SEQ ID NO : 35	mp9-2	TGGTTTGTTGGGTCAGATTG (SEQ ID NO: 111)	TTGCTACCCCTTGGCATC (SEQ ID NO: 112)
SEQ ID NO : 36	C75bis	TTCATTTTGGTGGTTATGGAATG (SEQ ID NO: 113)	CCGTTTCCACCTCCGTTAC (SEQ ID NO: 114)

SEQ ID NO : 37	13	TTCTCTTGACTTCAGTTCTTCATTG (SEQ ID NO: 115)	CAGTCAGGGACCATTTTGTG (SEQ ID NO: 116)
SEQ ID NO: 38	C35bis	TGTGTCGGATTTGGCACTG (SEQ ID NO: 117)	GGGGTGTTTGTGTGTATTTGTTC (SEQ ID NO: 118)
SEQ ID NO: 39	2	TCTGTGACCCACTCTTTCTGG (SEQ ID NO: 119)	ACAACAACGGCAATGGAATC (SEQ ID NO: 120)
SEQ ID NO: 40	mp2-2	AGCTGATCCCGTCTTCACAG (SEQ ID NO: 121)	ATGCAAGGGGAAGACAGATG (SEQ ID NO: 122)
SEQ ID NO: 41	C8	CGCTCCCAACATCTTTGTAC (SEQ ID NO: 123)	GTGGTTGCTGATTTGTCACTATC (SEQ ID NO: 124)
SEQ ID NO: 42	Protinh2-1	TGCAGGTTTTCGTATGTCCA (SEQ ID NO: 125)	GCCCAGGAAAACAAAGTCAG (SEQ ID NO: 126)

Tableau 10

Selon un mode de réalisation de l'invention, le kit selon l'invention comprend des moyens permettant de déterminer le profil d'expression par détermination du profil d'expression au niveau protéique (par analyse protéomique).

Selon ce mode de réalisation, le kit comprend un ou plusieurs anticorps reconnaissant spécifiquement une ou plusieurs des protéines encodées par les séquences nucléotidiques comprenant ou consistant en SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

Selon un mode de réalisation, le kit comprend également des moyens d'extraction des protéines totales.

La présente invention a également pour objet un dispositif comprenant un support comprenant une ou plusieurs sondes spécifiques d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques identifiées sous les numéros SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments pour la mise en œuvre du procédé d'identification selon l'invention.

Dans le cadre de la présente invention on entend par sonde tout fragment d'ADN simple brin ou d'ARN simple brin dont la séquence est complémentaire à une séquence

recherchée : celle-ci pourra ainsi être décelée par hybridation avec la sonde marquée (par incorporation de nucléotides couplés à des atomes/isotopes radioactifs ou de groupements fluorescents/fluorochromes), qui joue le rôle d'un "hameçon" moléculaire.

Selon des modes de mise en œuvre préférés, le support dudit dispositif est choisi parmi une membrane de verre, une membrane métallique, une membrane polymère, une membrane de silice.

De tels dispositifs sont par exemple des puces à ADN ou à ARN comprenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques identifiées sous les numéros SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments, ou une ou plusieurs séquences complémentaires des séquences nucléotidiques identifiées sous les numéros SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 42, leurs variants et leurs fragments.

L'invention a également pour objet un procédé de greffe d'huîtres perlières receveuses comprenant l'insertion dans la poche perlière de l'huître perlière receveuse d'un greffon issu d'une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation selon l'invention, correspondant à de l'épithélium du manteau de l'huître donneuse, en combinaison avec un nucléus. Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huître donneuse de haute capacité de biominéralisation a été identifiée selon le procédé de l'invention.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de greffe comprend (i) l'ouverture de l'huître perlière receveuse, (ii) la réalisation d'une incision dans les tissus de l'huître perlière receveuse pour accéder à la poche perlière et permettre, dans une troisième étape (iii) l'insertion dans la poche perlière de l'huître perlière receveuse d'un greffon, correspondant à une partie de l'épithélium du manteau de l'huître donneuse selon l'invention (environ 4 mm^2), en combinaison avec un nucléus.

La présente invention concerne également un procédé de production d'une perle de qualité supérieure, comprenant la greffe dans une huître receveuse, d'un greffon issu d'une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation selon l'invention. Il est bien entendu que l'huître receveuse comprend un nucléus. Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de production de perle comprend la greffe d'un nucléus dans

la poche perlière d'une huître receveuse, et la greffe d'une partie de l'épithélium du manteau d'une huître donneuse de haute capacité de biominéralisation selon l'invention.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit procédé de production de perle comprend une première étape comprenant la collecte et l'élevage des huîtres perlières pour obtenir des huîtres perlières donneuses selon l'invention et des huîtres perlières receveuses ; avantageusement, les huîtres perlières donneuses selon l'invention sont ensuite nettoyées pour retirer d'éventuels parasites ; puis les huîtres perlières receveuses sont mises en culture, de préférence pendant une durée de 10 à 24 mois, de préférence de 12 à 20 mois, encore plus préférentiellement de 16 à 18 mois. Pendant la période de culture, la bordure épithéliale externe minéralisatrice du greffon se multiplie et tapisse la poche perlière, pour donner un sac perlier englobant le nucléus, et qui va déposer des couches de nacre autour du nucleus, résultant ainsi en la production d'une perle.

La présente invention concerne également la perle obtenue par le procédé d'obtention de perle tel que décrit ci-dessus, utilisant une huître de haute capacité de biominéralisation selon l'invention comme huître donneuse de greffon.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Présentation de l'approche expérimentale mise en place.

Figure 2 : Protocole utilisé pour la validation de biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera*.

EXEMPLES

La présente invention sera mieux comprise et interprétée au vu des exemples ci-dessous.

L'objectif de cette étude était de développer une signature prédictive de la qualité de la perle récoltée, pour la sélection d'huîtres donneuses de greffons de « haute qualité minéralisatrice ».

Démarche expérimentale

La démarche mise en place a consisté à développer une approche globale d'analyse du transcriptome afin d'identifier des séquences nucléotidiques exprimées différentiellement au sein des cellules épithéliales des tissus responsables de la biominéralisation de la coquille (manteau) et de la perle (greffons et sacs perliers contenus dans les poches perlières) (**Figure 1**). La démarche a consisté à développer deux approches transcriptomiques complémentaires sur les tissus minéralisateurs (manteau, greffon et sac perlier) et une approche protéomique globale en parallèle sur les tissus minéralisés (coquilles et perles) de *P. margaritifera*. Quatre banques de données SAGE ont été mises en place sur des tissus minéralisateurs de la perle, greffons et poches perlières, dans l'objectif d'identifier des séquences nucléotidiques différentiellement exprimées en fonction d'huitres perlières donneuses de greffons différentes potentiellement associées à des qualités de perles contrastées. 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 de *P. margaritifera* afin d'identifier les protéines qui composent la coquille et la perle. La mise en place des approches transcriptomiques et protéomique globales a permis d'aboutir à la sélection par « approche candidat » ou « en aveugle » de biomarqueurs de la qualité de la perle candidats codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation chez *P. margaritifera*. La validation des biomarqueurs a été entreprise grâce à la réalisation d'une greffe expérimentale qui a permis d'une part d'évaluer la qualité des perles récoltées et de mettre en évidence un « effet donneuse », et d'autre part de disposer de matériel biologique (greffons et poches perlières) à l'origine de la production de perles de qualité contrastées. La validation des biomarqueurs candidats a par la suite été entreprise par PCR quantitative à haut-débit et a consisté à corréler statistiquement le niveau d'expression des biomarqueurs candidats à une réalité biologique (la qualité des perles). L'analyse du taux d'expression des biomarqueurs prédictifs 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 prédictifs de la qualité des perles.

Matériels et méthodes

Huîtres

Des huîtres perlières *P. margaritifera* ont été utilisées dans le cadre des analyses transcriptomiques globales, de l'analyse protéomique globale et de la greffe expérimentale pour la validation des biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle.

Greffe expérimentale (G1)

40 huîtres perlières de Polynésie française *P. margaritifera* de 3 ans environ ont été utilisées comme huîtres donneuses de greffons. Une trentaine de greffons ont été découpés à partir du manteau de chaque valve de chaque huître perlière donneuse. Un minimum de 2 greffons en provenance de chaque donneuse a été conservé. 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.

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

Extraction des ARN totaux

Les ARN ont été isolés à partir d'un échantillon de manteau, de greffon ou de poches perlières issus de la greffe expérimentale et conservés dans du RNAlater® (Ambion). Les tissus ont été 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 s'est déroulée sur agitateur sur la nuit à 4°C. Les tubes ont ensuite été mis à incuber au bain-marie 5 min à 30°C, puis vortexés pendant 30 sec. Le broyat a été centrifugé à 12000 g pendant 10 min à température ambiante, et 1mL de surnageant a été prélevé et transféré dans un nouveau tube. La séparation des acides nucléiques et des protéines a été réalisée en ajoutant 200 µL de chloroforme par tube, et en mélangeant par inversion. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les tubes ont été centrifugés à 12000g pendant 10 min à 4°C. La phase supérieure, d'environ 500 µL et contenant les ARN, a été transférée dans un nouveau tube. Les ARN ont été 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 ont été centrifugés 30 min à 15000 g. Le surnageant a été vidé, et le culot d'ARN a été lavé deux fois au vortex avec 1 mL d'éthanol à 70% suivi d'une étape de centrifugation de 15000 g à 4°C pendant 15 min. Les culots ont ensuite été séchés sous la hotte 10 min à température ambiante puis repris dans 50 µL d'eau RNAse free. Les tubes ont alors été mis à incuber au bain-marie 10 min à 55°C, avant d'être homogénéisés à la main. Les ARN ont été stockés à -80°C. La qualité et la quantité des ARN obtenus ont été 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).

Transcription inverse

La synthèse des ADNc de greffons et de poches perlières pour la détermination du niveau d'expression relatif des biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle candidats a été réalisée à partir de 800 ng d'ARN de greffons et de poches perlières, en utilisant le kit SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (InvitrogenTM- Cat. No: 18064-014) selon les instructions du fournisseur.

PCR quantitative

La mesure du niveau d'expression des biomarqueurs prédictifs candidats de la qualité de la perle a été réalisé par qPCR haut-débit sur le système BioMark™ HD (Fluidigm Corporation) en utilisant le kit 2XTaqManPreAmp Master Mix (Applied Biosystems – P/N 4384266) pour l'étape de préamplification et le kit 2XTaqMan 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 DynamicArray Real Time PCR (BMK-M-96.96) ont été utilisées. 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^-ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001) selon la formule suivante : fold = 2^-ΔΔCt = 2^-[DCt cible - DCtcalibrator]. Le DCt cible correspond à la moyenne des différences de Ct entre les biomarqueurs prédictifs 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 biomarqueurs prédictifs et les gènes de référence 18S et SAGE1 pour les échantillons de greffons ou de poches perlières du groupe calibrator « B », tel que décrit dans la présente invention.

Évaluation de la qualité des perles

Préalablement à leur évaluation, les perles récoltées dans le cadre de la greffe expérimentale ont été lavées au gros sel, rincées dans de l'eau douce, essuyées avec un chiffon propre et lustrées.

Afin de procéder à l'évaluation globale de la qualité des perles, les paramètres de qualité des perles ont été décomposés en différentes variables de la manière suivante : une variable « Épaisseur 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 « Épaisseur 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 et division de la différence de diamètre par 2. 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 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 4 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 expérimentale. Pour la variable « Épaisseur 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.

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 contrastée, deux groupes d'huîtres perlières donneuses de greffons ont été créés pour chacune des variables « Épaisseur », « 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 expérimentale. Le « Groupe A » (cible), correspondant aux huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité supérieure (épaisseur de nacre importante, peu de défauts de surface et/ou meilleure classification de qualité). Le « Groupe B » (témoin ou calibrator) correspondant à un ensemble d'huîtres perlières donneuses de greffons représentatif de la population naturelle (sauvage) d'huîtres perlières donneuses à

disposition des professionnels de la perliculture, et utilisées dans le cadre de greffes à but commercial.

La constitution des « Groupes A » (cible) 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.

Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques réalisées dans le cadre de la validation des biomarqueurs prédictifs de la 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 $\chi 2$ 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 a été défini de manière automatique. Le test de Wilcoxon a été utilisé avec un seuil α de 5% et de manière unilatérale.

Résultats

L'approche globale d'analyse du transcriptome a permis d'identifier un grand nombre de séquences nucléotidiques exprimées 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 permis d'identifier 82 séquences nucléotidiques 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 a permis d'identifier 130 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 biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle candidats et, dont 205 codent des protéines inconnues à ce jour chez *P. margaritifera*. Sur les 268 biomarqueurs identifiés, 224 couples d'amorces efficaces et spécifiques ont été mis au point et 188 biomarqueurs prédictifs candidats ont été sélectionnés et testés.

La validation des biomarqueurs prédictifs candidats en tant que biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle a consisté à corréler le niveau d'expression de ces biomarqueurs prédictifs à la qualité commerciale, à l'épaisseur et au nombre de défauts des perles obtenues dans le cadre de la greffe (**Figure 2**).

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 séquences nucléotidiques différentiellement exprimées en fonction de la qualité des perles récoltées. Une séquence nucléotidique est considérée comme différentiellement exprimée si l'expression relative de ladite séquence nucléotidique dans le groupe A est supérieure ou inférieure d'un facteur, ou « fold », supérieur ou égal à 2 à l'expression de la même séquence nucléotidique dans le groupe B, tel que décrit dans la présente invention.

L'analyse conjointe des analyses du niveau d'expression des séquences nucléotidiques en corrélation avec la qualité des perles a abouti à la validation d'un ensemble de 42 biomarqueurs prédictifs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* (tableau 11).

Variable	Sens du niveau d'expression des biomarqueurs (groupe A vs. groupe B)	Nombre de biomarqueurs différentiellement exprimés au sein des greffons	Nombre total de biomarqueurs non redondants entre les variables
Épaisseur	Surexpression	37	42
	Sous-expression	6	
Défauts	Surexpression	11	
	Sous-expression	7	
Qualité commerciale	Surexpression	7	
	Sous-expression	14	

Tableau 11 : *Nombre de biomarqueurs de la qualité de la perle chez P. margaritifera, présentant un fold supérieur ou égal à 2.*

La liste complète des 42 biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle obtenus est présentée dans les tableaux 1 et 12.

		Différence d'expression entre les huîtres du groupe A et les huîtres du groupe B pour les critères					
		Épaisseur		**Qualité commerciale**		**Défauts**	
Identifiant	**Nom**	Greffon	Poches	Greffon	Poches	Greffon	Poches
SEQ ID NO: 1	**CLEC2-2**	4,986	0,581	0,040	0,847	2,626	19,279
SEQ ID NO: 2	**C3**	9,535	1,000	0,254	0,229	2,707	1,097
SEQ ID NO: 3	**CALC-1**	3,990	0,335	0,003	0,004	2,218	0,024
SEQ ID NO: 4	**CLEC3-1**	3,399	6,109	0,067	0,202	15,906	1,507
SEQ ID NO: 5	**DERM-2**	3,245	3,649	0,188	1,171	0,188	1,781
SEQ ID NO: 6	**C9**	9,793	1,482	0,094	0,960	0,094	2,672
SEQ ID NO: 7	**1**	0,210	1,608	0,136	0,569	0,206	0,569
SEQ ID NO: 8	**MUCO-2**	19,752	2,164	2,128	0,245	8,262	3,504
SEQ ID NO: 9	**C88bis**	11,366	2,350	4,244	1,323	0,193	1,563
SEQ ID NO: 10	**shem5-1**	45,682	1,478	10,853	0,784	0,528	1,516
SEQ ID NO: 11	**shem7-2**	7,064	1,825	7,670	0,905	0,918	0,972
SEQ ID NO: 12	**C85**	6,565	1,959	2,523	1,224	0,633	1,640
SEQ ID NO: 13	**C14**	29,368	1,612	0,211	0,978	1,723	0,581
SEQ ID NO: 14	**C18**	17,062	2,323	0,173	0,733	0,925	0,242
SEQ ID NO: 15	**C22**	12,098	1,714	0,427	0,560	1,722	2,742
SEQ ID NO: 16	**Protinh3-1**	8,790	2,573	0,439	1,340	0,572	2,265
SEQ ID NO: 17	**C2**	6,480	1,091	0,257	0,433	0,643	0,998
SEQ ID NO: 18	**C46**	0,199	0,040	2,902	0,462	0,517	1,217
SEQ ID NO: 19	**Cbind-3**	0,470	1,508	0,135	0,131	1,136	0,118
SEQ ID NO: 20	**C66ter**	5,562	1,777	2,696	0,762	0,925	1,541

SEQ ID NO: 21	**C17**	22,072	2,210	0,990	1,040	3,654	0,388
SEQ ID NO: 22	**PLW-2**	19,542	1,336	0,823	0,942	0,317	1,789
SEQ ID NO: 23	**PIF-2**	7,020	5,150	0,642	1,303	3,094	1,310
SEQ ID NO: 24	**46**	6,497	1,936	0,623	0,719	3,023	1,465
SEQ ID NO: 25	**C6**	6,153	2,619	0,563	1,198	0,260	0,565
SEQ ID NO: 26	**C26bis**	5,437	6,844	1,156	1,257	2,553	2,880
SEQ ID NO: 27	**C54(C53bis)**	9,155	4,211	0,965	0,448	6,646	2,288
SEQ ID NO: 28	**mp11-2**	1,178	3,283	0,441	1,618	5,525	2,593
SEQ ID NO: 29	**PMMG1-2**	12,967	0,268	0,502	0,129	1,296	3,741
SEQ ID NO: 30	**73**	8,999	1,052	0,869	1,004	0,936	0,509
SEQ ID NO: 31	**C23**	7,991	1,515	0,721	0,816	0,788	0,760
SEQ ID NO: 32	**C1**	6,654	1,289	0,985	0,650	0,736	0,867
SEQ ID NO: 33	**MNK-1**	6,218	1,294	1,674	0,745	1,384	1,030
SEQ ID NO: 34	**PLC-2**	6,153	1,316	1,338	0,747	0,856	0,107
SEQ ID NO: 35	**mp9-2**	6,140	1,569	1,169	0,978	1,169	1,248
SEQ ID NO: 36	**C75bis**	5,703	1,512	0,604	1,155	0,604	0,882
SEQ ID NO: 37	**13**	5,210	1,724	1,129	0,990	1,129	1,501
SEQ ID NO: 38	**C35bis**	0,198	0,364	0,986	0,589	0,566	1,269
SEQ ID NO: 39	**2**	0,153	1,061	1,012	0,716	0,593	1,586
SEQ ID NO: 40	**mp2-2**	0,056	1,054	1,839	1,007	1,220	1,007
SEQ ID NO: 41	**C8**	5,595	1,280	1,163	0,543	0,808	0,950
SEQ ID NO: 42	**Protinh2-1**	1,175	1,335	0,619	0,972	0,025	1,022

Tableau 12 : *Liste des gènes biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle chez P. margaritifera (les résultats correspondent à la différence d'expression entre les huîtres du groupe A et les huîtres du groupe B)*

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence une signature prédictive de la capacité de biominéralisation d'une huître perlière donneuse.

15 des 42 biomarqueurs SEQ ID NO : 1 à 42 ont par la suite été évalués à partir d'un jeu de données résultant de deux campagnes de greffes supplémentaires et indépendantes de celle décrite ci-dessus.

Greffes expérimentales

Lors de greffe G2, 67 huitres donneuses de greffons ont été utilisées. Lors de la greffe G3, 64 huitres donneuses de greffons provenant d'un autre lot que celui des huîtres G2 ont été utilisées. Cinquante greffons ont été découpés à partir du manteau de chaque

valve de chaque huître perlière donneuse. Deux greffons en provenance de chaque donneuse ont été conservés (1 greffon par valve) afin de déterminer, selon la méthode décrite dans la présente invention, les niveaux d'expression de 15 des 42 biomarqueurs SEQ ID NO : 1 à 42. Les greffons restant en provenance de chaque valve de chaque huître perlière donneuse ont été greffés dans des huîtres perlières receveuses, 3208 huitres pour G2 et 3051 huîtres pour G3, en utilisant des nucléus de diamètre identique. Les perles de G2 ont été récoltées 15 mois post-greffe, celles de G3 à 16 mois post-greffe.

Classement des donneuses de greffons pour les greffes G2 et G3

Une note a été attribuée à chaque huître perlière donneuse sur la base de l'évaluation de la qualité des perles récoltées et selon le mode de calcul décrit dans la présente invention. Un total de 2074 et 1879 perles provenant des greffes G2 et G3 respectivement ont été analysées sur chacune des 3 variables « Epaisseur de nacre à la surface de la perle », « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale ». Pour chacune des greffes G2 et G3, 4 huîtres perlières donneuses produisant en moyenne des perles de qualité supérieure (épaisseur de nacre importante, peu de défauts de surface et/ou meilleure classification de qualité) et constituant le Groupe A (cible), ont été sélectionnées (**Tableau 13**). Le Groupe B (témoin ou calibrator) correspond à un ensemble de 23 huîtres perlières donneuses de greffons représentatif de la population d'huîtres perlières utilisées lors des greffes G2 et G3.

Tableau 13 : Comparaison des moyennes des variables « Epaisseur de nacre à la surface de la perle », « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale » selon les groupes d'huîtres donneuses utilisées lors des greffe G2 et G3. Le gain de qualité des perles produites par les donneuses du groupe A par rapport à celles du groupe B, exprimé en pourcentage, est indiqué en gras et entre parenthèse.

	Valeur moyenne des variables de qualité selon les groupes d'huître donneuses étudiées, pour chacune des greffes G2 et G3					
Greffes	**G2**			**G3**		
Moyennes des variables / Groupe de donneuses	**Toutes donneuses**	**B**	**A**	**Toutes donneuses**	**B**	**A**
Epaisseur	1,707	1,688	2,196 **(+30%)**	1,597	1,585	2,022 **(+28%)**
Nombre de défauts	1,529	1,447	0,771 **(+47%)**	1,688	1,673	0,970 **(+42%)**
Qualité commerciale	1,557	1,594	2,429 **(+52%)**	1,356	1,276	2,118 **(+66%)**

Résultats

En ce qui concerne l'analyse des perles de la greffe G2, le gain de qualité des perles produites par les donneuses du groupe A par rapport à celles du groupe B sur chacune des variables « Epaisseur de nacre à la surface de la perle », « Nombre de défauts à la surface des perles » et « Qualité commerciale » est de 30%, 47% et 52% respectivement (**Tableau 13**). Pour la greffe G3, le gain de qualité des perles produites par les donneuses du groupe A est de 28%, 42% et 66% respectivement. Les valeurs moyennes de chaque variable obtenues dans le groupe B et dans le groupe constitué par l'ensemble des donneuses utilisées lors de la greffe sont similaires, quelle que soit la greffe G2 ou G3 considérée. Ces résultats illustrent la représentativité des donneuses du groupe B sélectionnées au sein de la population de donneuses utilisées lors des deux greffes indépendantes G2 et G3.

Les niveaux d'expression relatifs de 15 biomarqueurs prédictifs de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* ont été déterminés par PCR en temps réel selon la méthodologie décrite dans la présente invention. Ainsi les niveaux d'expression dans le groupe des donneuses A et B ont été calculés pour chacune des greffes G2 et G3 et chacune des 3 variables d'intérêt : Epaisseur / Qualité commerciale / Défauts.

Les niveaux d'expression mesurés ont été comparés à ceux obtenus lors de la première greffe (G1) et confirment les résultats préalablement obtenus. Les niveaux de surexpression ou de sous-expression significatifs (fold supérieur ou égal 2, notés « + » et « - » respectivement) pour chacun des 15 biomarqueurs de haute capacité de biominéralisation, obtenus lors des greffes G1, G2 et G3, sont indiqués dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Comparaison des niveaux de surexpression ou de sous-expression des biomarqueurs de haute capacité de biominéralisation des huîtres perlières donneuses du groupe A par rapport à l'échantillon témoin selon la greffe considérée, selon la greffe considérée.

Identifiant	**Nom**	**Variable impactée**	**Surexpression / Sous-expression**
SEQ ID NO : 3	CALC-1	Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 4	CLEC3-1	Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 5	DERM-2	Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 8	MUCO-2	Epaisseur	+
SEQ ID NO : 11	shem7-2	Qualité commerciale	+
SEQ ID NO : 14	C18	Qualité commerciale	-
SEQ ID NO : 18	C46	Epaisseur	-
SEQ ID NO : 23	PIF-2	Epaisseur	+
SEQ ID NO : 26	C26bis	Epaisseur	+
SEQ ID NO : 27	C54(C53bis)	Epaisseur	+
SEQ ID NO : 28	mp11-2	Nombre de défauts	+
SEQ ID NO : 36	C75bis	Epaisseur	+
SEQ ID NO: 39	2	Epaisseur	-
SEQ ID NO: 40	mp2-2	Epaisseur	-
SEQ ID NO: 42	Protinh2-1	Nombre de défauts	-

L'analyse conjointe des analyses du niveau d'expression de 15 des 42 biomarqueurs SEQ ID NO : 1 à 42 en corrélation avec la qualité des perles obtenues lors de trois greffes expérimentales indépendantes a donc abouti à la définition d'une liste affinée de 15 biomarqueurs prédictifs de la croissance et de la qualité de la perle chez *P. margaritifera* (**Tableau 14**).

REVENDICATIONS

1. Signature prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant une huître donneuse et/ou de la vitesse de dépôt nacré autour du nucléus en utilisant ladite huître donneuse, ladite signature comprenant le profil d'expression dans le manteau de ladite huître donneuse d'au moins un biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 1, 4, 5, 8, 11, 14, 18, 23, 26, 27, 28, 36, 39, 40 et 42, leurs variants et leurs fragments.

2. Signature prédictive selon la revendication **1**, ladite signature comprenant le profil d'expression dans le manteau de ladite huître donneuse d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 3, 4, 5, 11 et 14, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature étant prédictive de la qualité commerciale des perles obtenues en utilisant ladite huître donneuse.

3. Signature prédictive selon la revendication **1** ou la revendication **2**, ladite signature comprenant le profil d'expression dans le manteau de ladite huître donneuse d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 8, 18, 23, 26, 27, 36, 39 ou 40, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature étant prédictive de la vitesse de dépôt nacré autour du nucléus en utilisant ladite huître donneuse.

4. Signature prédictive selon l'une quelconque des revendications **1** à **3**, ladite signature comprenant le profil d'expression dans le manteau de ladite huître donneuse d'au moins une séquence nucléotidique sélectionnée parmi SEQ ID NO : 28 ou 42, leurs variants et leurs fragments, et ladite signature étant en outre prédictive du nombre de défauts de surface des perles obtenues en utilisant ladite huître donneuse.

5. Procédé d'identification et/ou de sélection d'une huître donneuse de greffons de haute capacité de biominéralisation, dans lequel :

(a) on détermine, dans un échantillon biologique de ladite huître, le niveau d'expression d'au moins deux biomarqueurs prédictif tel que décrit dans l'une quelconque des revendications **1** à **4**, et

(b) on compare le niveau d'expression obtenu à l'étape (a) à un niveau d'expression témoin.

6. Kit permettant la mise en œuvre du procédé selon la revendication **5**, comprenant des moyens de détermination du profil d'expression d'au moins un biomarqueur tel que décrit dans l'une quelconque des revendications **1** à **4**, dans lequel lesdits moyens permettent de déterminer le profil d'expression au niveau transcriptomique par RT-PCR, RT-qPCR, PCR quantitative à haut débit.

7. Kit permettant la mise en œuvre du procédé selon la revendication **5**, comprenant des moyens de détermination du profil d'expression d'au moins un biomarqueur tel que décrit dans l'une quelconque des revendications **1** à **4**, dans lequel lesdits moyens permettent de déterminer le profil d'expression au niveau protéique.

8. Procédé de production d'au moins une perle de qualité supérieure, comprenant la culture d'au moins une huître receveuse comprenant la signature prédictive selon l'une quelconque des revendications **1** à **4**, ou identifiée selon le procédé d'identification de la revendication **5**.

9. Utilisation d'au moins un biomarqueur comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique sélectionné parmi la liste consistant en SEQ ID NO : 1, 4, 5, 8, 11, 14, 18, 23, 26, 27, 28, 36, 39, 40 et 42, leurs variants et leurs fragments, pour déterminer la capacité de biominéralisation d'une huître donneuse de greffons.

10. Utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 3, 4, 5, 11 et 14, de préférence de la séquence SEQ ID NO : 4, pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles de haute qualité commerciale.

11. Utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 28 et SEQ ID NO : 42, de préférence la séquence SEQ ID NO : 28 pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles présentant un faible nombre de défauts de surface.

12. Utilisation d'au moins un biomarqueur sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO : 8, 18, 23, 26, 27, 36, 39 et 40, pour prédire la capacité d'une huître donneuse de greffon à produire des perles présentant un faible nombre de défauts de surface.

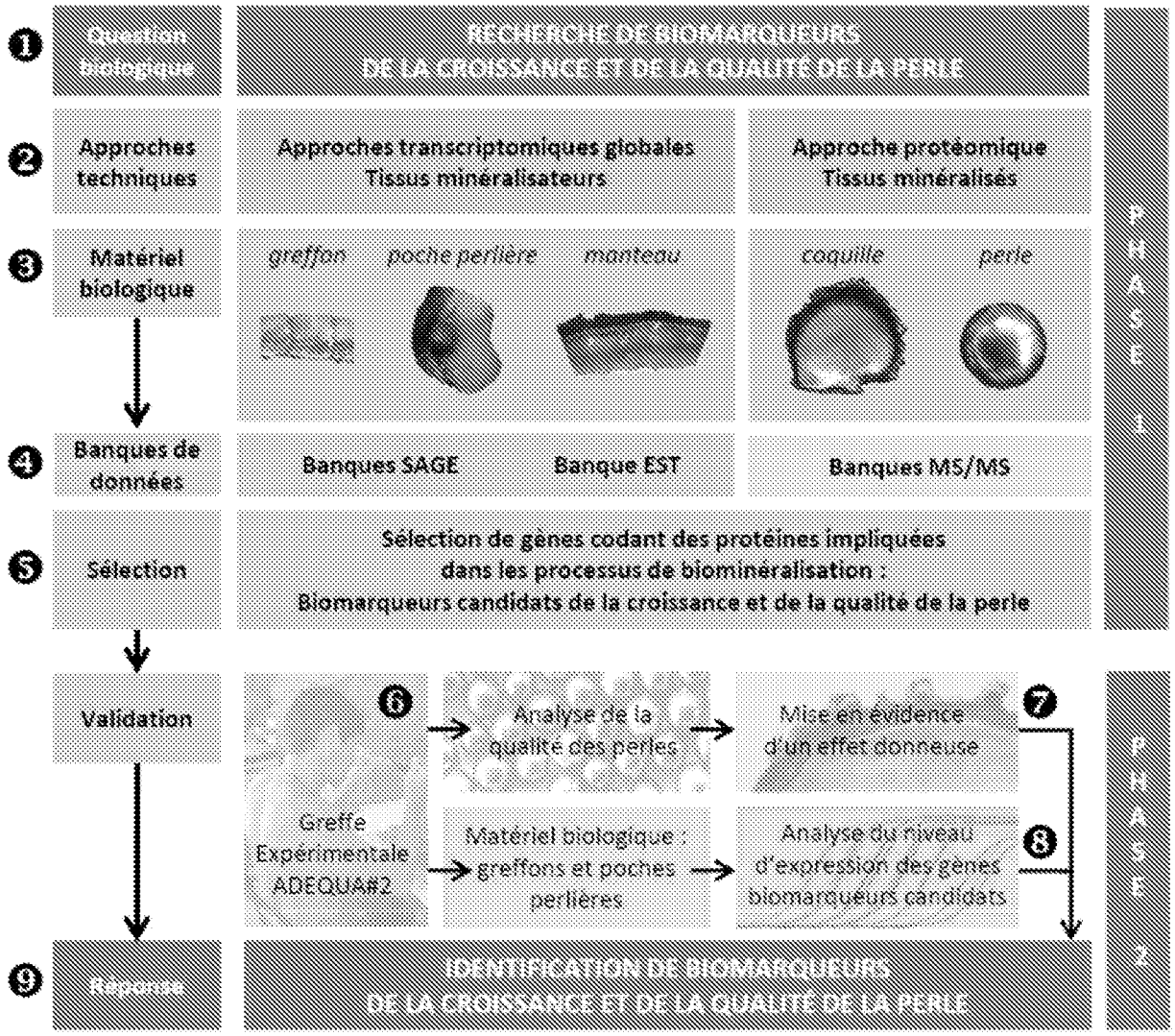

1
Question biologique
RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE LA CROISSANCE ET DE LA QUALITE DE LA PERLE
2
Approches techniques
Approches transcriptomiques globales Tissus minéralisateurs
Approche protéomique Tissus minéralisés
3
Matériel biologique
greffon
poche perlière
manteau
coquille
perle
4
Banques de données
Banques SAGE
Banque EST
Banques MS/MS
5
Sélection
Sélection de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de biominéralisation : Biomarqueurs candidats de la croissance et de la qualité de la perle
PHASE 1
Validation
6
Greffe Expérimentale ADEQUA#2
Analyse de la qualité des perles
Matériel biologique : greffons et poches perlières
7
Mise en évidence d'un effet donneuse
8
Analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats
PHASE 2
9
Réponse
IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS DE LA CROISSANCE ET DE LA QUALITE DE LA PERLE

FIG. 1

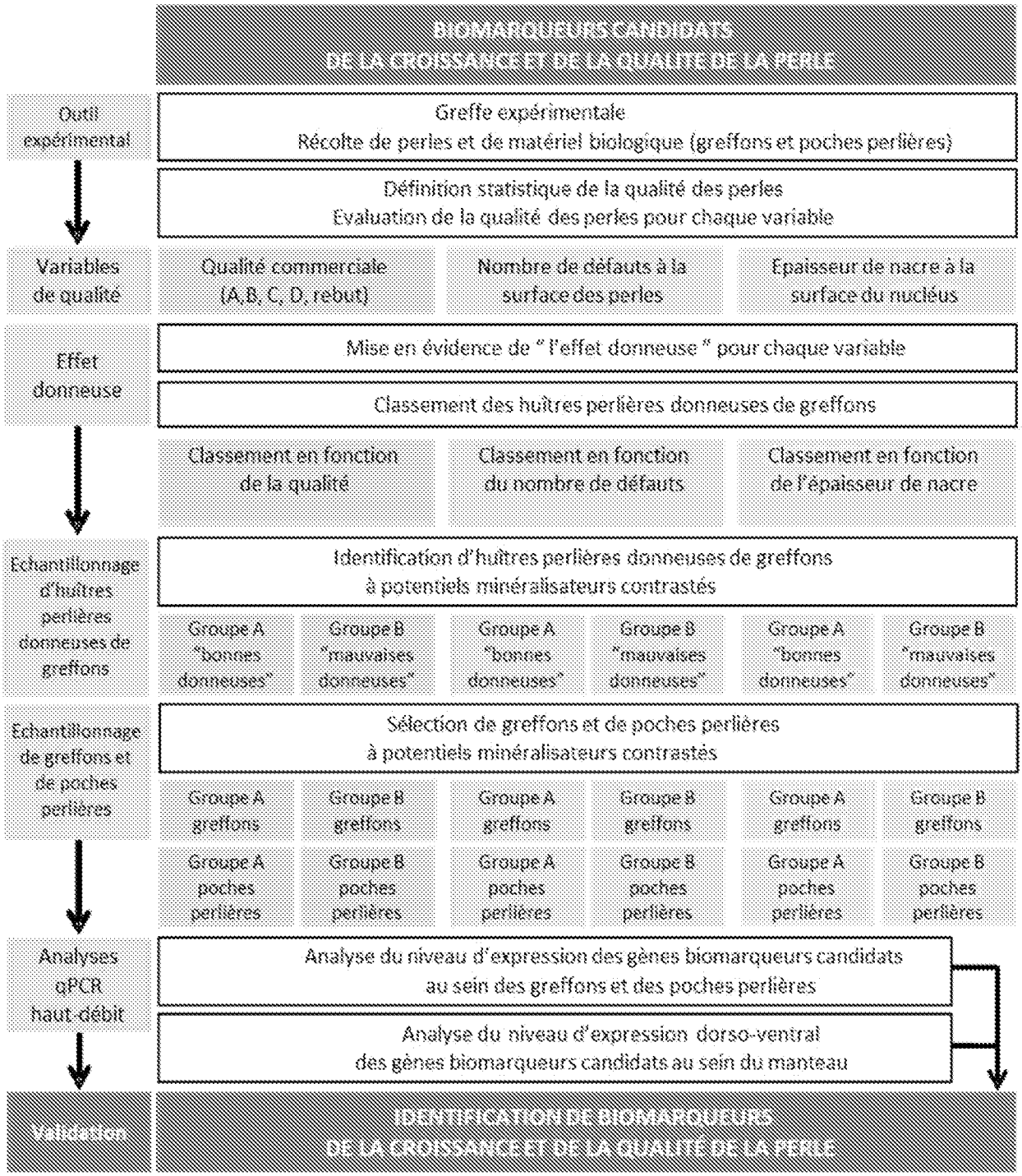

BIOMARQUEURS CANDIDATS
DE LA CROISSANCE ET DE LA QUALITE DE LA PERLE
Outil expérimental
Greffe expérimentale
Récolte de perles et de matériel biologique (greffons et poches perlières)
Définition statistique de la qualité des perles
Evaluation de la qualité des perles pour chaque variable
Variables de qualité
Qualité commerciale (A,B, C, D, rebut)
Nombre de défauts à la surface des perles
Epaisseur de nacre à la surface du nucléus
Effet donneuse
Mise en évidence de " l'effet donneuse " pour chaque variable
Classement des huîtres perlières donneuses de greffons
Classement en fonction de la qualité
Classement en fonction du nombre de défauts
Classement en fonction de l'épaisseur de nacre
Echantillonnage d'huîtres perlières donneuses de greffons
Identification d'huîtres perlières donneuses de greffons à potentiels minéralisateurs contrastés
Groupe A "bonnes donneuses"
Groupe B "mauvaises donneuses"
Groupe A "bonnes donneuses"
Groupe B "mauvaises donneuses"
Groupe A "bonnes donneuses"
Groupe B "mauvaises donneuses"
Echantillonnage de greffons et de poches perlières
Sélection de greffons et de poches perlières à potentiels minéralisateurs contrastés
Groupe A greffons
Groupe B greffons
Groupe A greffons
Groupe B greffons
Groupe A greffons
Groupe B greffons
Groupe A poches perlières
Groupe B poches perlières
Groupe A poches perlières
Groupe B poches perlières
Groupe A poches perlières
Groupe B poches perlières
Analyses qPCR haut-débit
Analyse du niveau d'expression des gènes biomarqueurs candidats au sein des greffons et des poches perlières
Analyse du niveau d'expression dorso-ventral des gènes biomarqueurs candidats au sein du manteau
Validation
IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS
DE LA CROISSANCE ET DE LA QUALITE DE LA PERLE

FIG. 2