



SODIM

Société de développement de l'industrie maricole inc.

*Bases physiologiques et génétiques de la
croissance chez la mye commune, *Mya
arenaria**

Rapport final

Dossier n° 710.145

Rapport commandité par la SODIM



Rapport final de projet PCRDA

1. **Numéro de projet:** Q-06-04-001
2. **Titre du projet:** Bases physiologiques et génétiques de la croissance chez la mye commune, *Mya arenaria*
3. **Durée du projet:** 1 an
4. **Chargé de projet:** Jean-Marie Sévigny
5. **Partenaire de l'industrie:** SODIM
6. **Vue d'ensemble du projet:**

L'objectif principal de ce projet était de déterminer les caractéristiques physiologiques et génétiques différenciant les myes communes, *Mya arenaria*, selon leur croissance afin d'évaluer la possibilité d'établir un mode de gestion des élevages ayant des taux de croissance élevée sans affaiblir les stocks en élevage.

Pour atteindre ces objectifs, il faudra :

- 1) Développer une technique de mesure physiologique individuelle à grande échelle pour des organismes endobenthiques;
- 2) Obtenir des myes caractérisées par différents niveaux de croissance;
- 3) Caractériser les paramètres physiologiques (filtration, assimilation, métabolisme) des individus sans, à faible et à forte croissance;
- 4) Caractériser les bases génétiques (microsatellites) des individus sans, à faible et à forte croissance;
- 5) Évaluer l'impact de l'élimination des individus à faible croissance sur la diversité génétique des populations en élevage et sur le budget métabolique (indicateur de la quantité d'énergie disponible pour résister aux stress et maladies).

Des myes ayant subi des croissances différentielles dans le Flupsy de PGS Noël au cours de l'été 2006 ont été obtenues et ont été transférées en septembre à la station aquicole de Pointe-aux-Pères. À chaque semaine les myes étaient nettoyées et redistribuées aléatoirement dans les différents silos afin d'éviter un effet zootechnique sur les croissances différentielles. Plus de 300 individus ont été acclimatés aux conditions de laboratoire de la station aquicole. Trois niveaux de croissance, ont pu être déterminés, soit faible (1-4 mm), moyenne (4-6 mm) et forte croissance (6-9 mm). Les myes étaient maintenues à température constante (18°C) et nourries en permanence avec des pompe péristaltiques selon une base de 3% de leur masse sèche avec une diète équilibrée en acide gras essentiel de *Chaetoceros gracillis*, *Isochrysis galbana* et *Nanochloropsis sp* (Pernet and Tremblay 2004). Ces conditions ont été maintenues durant 6 semaines pour permettre aux myes de palier



Rapport final de projet PCRDA

au stress du transport et homogénéiser les conditions énergétiques selon leur nouvel environnement.

Après cette période d'acclimations, les différences de performances métaboliques et physiologiques entre les différents niveaux de croissance ont été déterminées. Ainsi, les taux de filtration, de consommation d'oxygène et d'assimilation de la nourriture ont été estimés sur 280 individus afin de caractériser le potentiel de croissance (Widdows and Johnson 1988). Les mesures physiologiques ont été prises individuellement dans des chambres amovibles permettant aux animaux de s'enfouir dans le sédiment afin de ne pas affecter négativement les taux physiologiques des myes (Mohlenberg et Kiorboe 1981; Riisgård et al. 2003). À la fin de ces mesures, les animaux ont été sacrifiés pour la caractérisation de leur masse humide. Un bout de tissu a été prélevé et congelé à -80°C pour les analyses des microsatellites.

Développement des marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites n'étaient pas disponibles pour la mye commune. La première étape dans la réalisation de ce projet consistait donc à développer ces marqueurs.

Les protocoles utilisés pour développer les microsatellites de la mye sont comparables à ceux que nous avons utilisés pour d'autres espèces comme le crabe des neiges (Puebla et al. 2003).

Nous avons utilisé des sondes CA, ACAG, GATA et CATA pour récupérer près de 3000 clones ayant incorporé un fragment d'ADN. De ces clones, 336 se sont avérés positifs i.e. qu'ils contenaient potentiellement une séquence microsatellite. Ils ont tous été séquencés et les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Sequencher (*Gene Code Corporation*) afin d'identifier les clones qui contenaient une séquence microsatellite qui pouvaient être utilisées dans les étapes ultérieures. À partir de ces séquences, 61 paires d'amorces pour la PCR (réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN) ont été conçues à l'aide du logiciel Oligo6 (*Primer Analysis Software*). La mise au point des amorces permet ensuite de déterminer les paramètres de la PCR pour chaque microsatellite et de décrire ses caractéristiques (hétérozygoties observée et attendue, nombre d'allèles, déviation par rapport aux équilibres de Hardy-Weinberg etc). Les loci pour lesquels les déviations par rapport aux équilibres de Hardy-Weinberg étaient trop importantes ont été éliminés de ces analyses préliminaires.

Caractérisation génétique des myes de faible et de forte croissance

Les analyses génétiques ont été réalisées sur deux groupes de myes. Le premier groupe est constitué de 19 myes qui ont eu une croissance faible variant entre 2,54 et 4,00 mm (moyenne de 3,59; écart-type de 0,395) pendant la durée de l'expérience.



Rapport final de projet PCRDA

Le deuxième groupe comprend également 19 myes dont la croissance a varié entre 6,43 et 8,24 mm (moyenne de 7,07 mm; écart-type de 0,506) pendant la durée de l'expérience. La taille de deux groupes de myes n'était pas significativement différente au début de l'expérience ($t = -0,923$; $P=0,363$) mais elle l'était à la fin ($t = -23,646$; $P < 0,001$).

L'ADN total (nucléaire et mitochondrial) de chaque individu sélectionné a été extrait à partir de 15 mg du manteau des myes sélectionnées en utilisant le protocole pour tissus animaux (DNeasy tissu kit) de la compagnie QIAGEN. La concentration de l'ADN a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND 1000 à la longueur d'onde de 260 nm.

Les microsatellites ont été amplifiés au cours de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN) dans une solution de volume total de 12,5 μ L contenant 10-100 ng d'ADN, 200 μ M de chacun des dNTP, 0,1 μ g/ μ L BSA, 0,24 μ M de chacune des deux amorces, 0,35 U d'ADN polymérase («Expand High Fidelity Polymerase», Roche Diagnostic) et 1X d'une solution tampon «Expand High Fidelity #2» avec 1,5 mM $MgCl_2$ en utilisant un appareil à PCR Robocycler 96 gradient™ (Stratagene). Pour chaque microsatellite, les conditions de PCR sont les suivantes: dénaturation initiale de 50s à 94°C, suivie de 30 cycles de 30s à 94°C, 40s à la température d'anneau spécifiée au tableau X et d'une phase d'extension de 40s à 72°C suivi d'une extension finale de 3 min à 72°C. Les amorces ont été marquées avec les fluorochromes 6-FAM, VIC, NED (AppliedBiosystems; Tableau 1). La séparation des fragments a été effectuée sur un séquenceur automatique ABI 3130 (AppliedBiosystems) en utilisant le standard interne LIZ-1200 (AppliedBiosystems). Le logiciel GeneMapper™ (AppliedBiosystems) a été utilisé pour identifier les différents allèles.

Les indices statistiques décrivant et comparant les caractéristiques génétiques des myes de faible et de forte croissance ont été déterminés à l'aide des logiciels GENETIX 4.04 (Belkhir *et al.* 1996-2004) et FSTAT (Goudet, 2001). Le nombre d'allèles (N_{all}), la richesse allélique (R_{all}) (El Mousadik et Petit 1996), ainsi que les hétérozygoties observée (H_o) et attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg (H_e) ont été calculés. La statistique F_{is} , une mesure de la déviation de H_o par rapport à H_e , a été calculée selon la méthode de Weir et Cockerham (1984). L'hypothèse nulle $F_{is}=0$ a été testée par permutation des données. La statistique F_{st} , un indice de la différenciation génétique a été calculé et ces valeurs ont été comparées pour les deux groupes. L'hypothèse nulle $F_{st}=0$ a été testée par permutation des données.

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a aussi été effectuée à l'aide du logiciel GENETIX 4.04. Dans ce type d'analyse et de représentation, les catégories qui possèdent des valeurs semblables sont représentées graphiquement par des points très voisins.

Rapport final de projet PCRDA

7. Principaux résultats obtenus:

Les mesures physiologiques démontrent clairement que les différents lots de myes caractérisés par des taux de croissance différentielle, diffèrent par la consommation d'oxygène et leur taux de filtration, ce qui influe directement leur potentiel de croissance (Figure 1). La consommation d'oxygène ayant été mesurée sur des animaux nourris, celle-ci représente donc les mesures de métabolisme de routine de l'animal. La caractérisation du potentiel de croissance permet d'estimer l'énergie

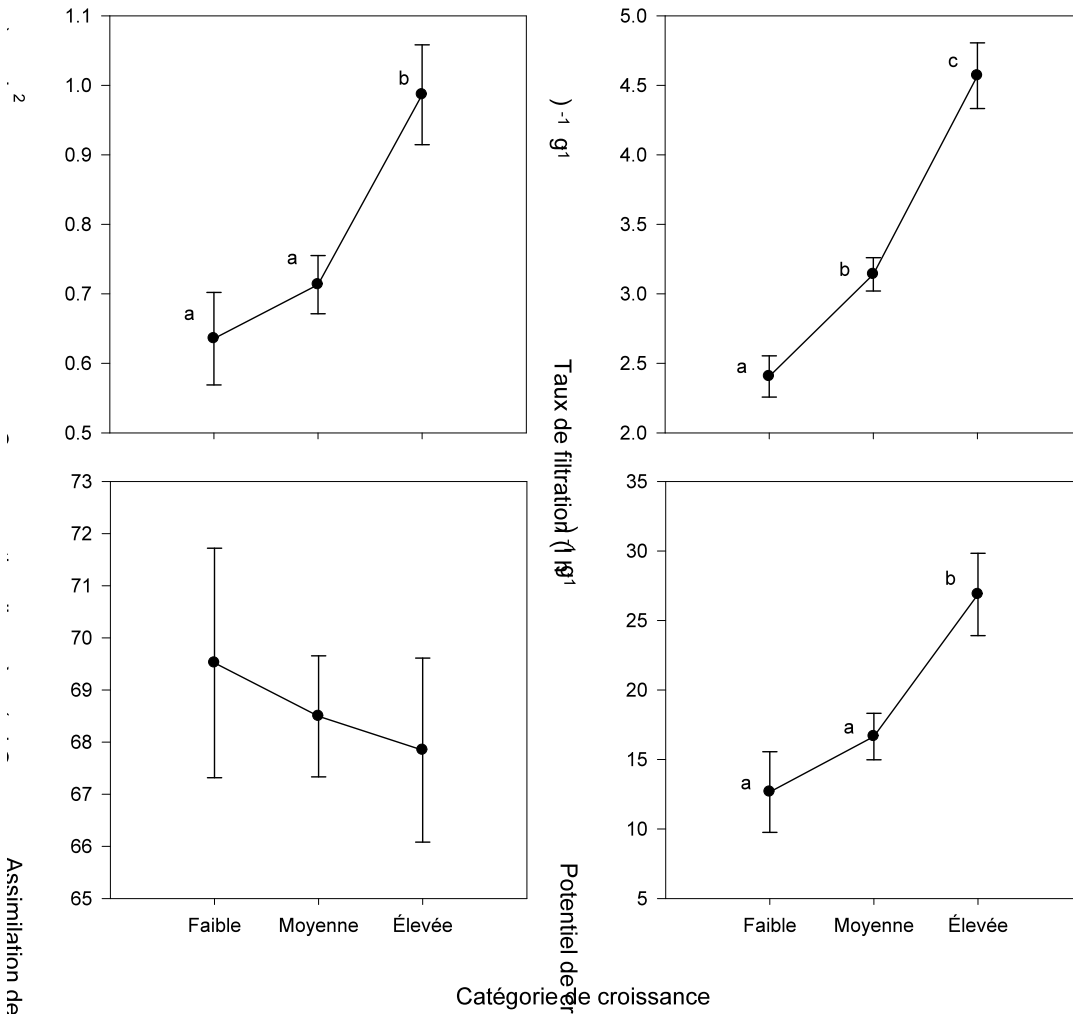


Figure 1. Mesures de la consommation d'oxygène (métabolisme de routine), de filtration, de l'assimilation de la nourriture et du potentiel de croissance chez les trois catégories de croissance de myes.

Rapport final de projet PCRDA

disponible pour le maintien de l'animal ainsi que l'énergie disponible pour la croissance et la survie (Tremblay et al. 1998). Nos résultats démontrent une relation directe entre la croissance des myes mesurée dans le flupsy et le potentiel de croissance, suggérant que les myes ont préférentiellement investi cette énergie dans la croissance.

Développement des marqueurs microsatellites

Au cours de la présente étude, nous avons pu développer cinq marqueurs microsatellites dont les caractéristiques apparaissent au tableau 1. Le développement de marqueurs microsatellites s'est avéré plus difficile qu'anticipée étant donné le grand nombre de loci pour lesquels nous n'avons pas détecté de variation. Il sera donc nécessaire, dans une étude ultérieure, de poursuivre le développement de ces marqueurs afin d'augmenter la puissance des analyses statistiques.

Tableau 1. Caractéristiques de cinq marqueurs microsatellites décrits chez la mye commune (*Mya arenaria*). Les caractéristiques sont celles observées au cours de la présente étude. Ta: température d'annelage.

Locus	Motif du microsatellite	Taille (pb)	No. Alleles	Séquence-amorces (5'-3')	Marqueur fluorescent 5'	Ta (°C)
Mya Mr4	(CA)12 (TA)1 (CA)16	138-242	18	F: ACT GAT GCA GAG GCA GTT CC R: TGA CTT GTG TGG TTT TGA TT	VIC	57
Mya 28104	(CA)3 (CG)1 (CA)19	188-192	17	F: CGC GAA GAC CGT ACT AGG TT R: GAA TTT TGG TCC CCA TCG AA	NED	52
Mya 36	(GACA)7	170-250	13	F: TTG GGT CAA AAC GTT CAC AA R: CAT GGC CAC TGG AAG TGT TA	VIC	57
Mya 12	(CG)3 (CA)8 GC (CA)12	201-279	20	F: AAG CCA CGT CTC AAG CCT TA R: TAT GCG TTC GTC CGT ATG TG	NED	57
Mya 2765	(CA)12	133-191	21	F: AGA AAT GTA AGA GGA GAT GC R: TCC GTA ACA TTT CAC GTC CA	6-FAM	52

Le tableau 2 résume les statistiques descriptives Nall., Rall., *Ho*, ainsi que les résultats des tests de déviation par rapport aux équilibres de Hardy-Weinberg (F_{is}). Les résultats sont présentés par locus et pour les individus de faible et de forte croissance.



Rapport final de projet PCRDA

Tableau 2. Statistiques décrivant les caractéristiques génétiques des deux groupes de croissance de la mye commune (*Mya arenaria*) par locus et par site: effectif (N), nombre d'allèles (N_{all}), richesse allélique (R_{all}) calculée pour un échantillon de 15 individus, hétérozygoties attendue (H_e) et observée (H_o), coefficient de consanguinité (F_{is}). Les valeurs significatives après corrections de Bonferroni ($P = 0,005$) sont indiquées en caractères gras.

LOCUSC	Croissance faible	Croissance forte
Mia 28104		
N	18	18
N_{all}	16	11
R_{all}	14,5	10,5
H_e	0,891	0,865
H_o	0,722	0,444
F_{is}	0,193	0,493
MiaMr4		
N	15	16
N_{all}	8	13
R_{all}	8	12,6
H_e	0,844	0,891
H_o	0,2	0,375
F_{is}	0,769	0,587
Mia 12		
N	19	19
N_{all}	16	16
R_{all}	14,2	14,3
H_e	0,928	0,916
H_o	0,947	0,842
F_{is}	-0,022	0,083
Mia 36		
N	19	19
N_{all}	10	9
R_{all}	8,7	8,1
H_e	0,791	0,761
H_o	0,842	0,684
F_{is}	-0,067	0,103

Rapport final de projet PCRDA

Tableau 2 (suite).

LOCUS	Croissance faible	Croissance forte
Mia 2765		
<i>N</i>	19	19
<i>N_{all}</i>	10	11
<i>R_{all}</i>	9,1	9,9
<i>H_e</i>	0,856	0,828
<i>H_o</i>	0,895	0,737
<i>F_{is}</i>	-0,046	0,113
He moyen	0,862	0,522
E.T.	0,051	0,061
Ho moyen	0,721	0,617
E.T.	0,303	0,199
Fis	0,168	0,283
No moy. d'allèles / locus	12,0	12,0

La richesse allélique des microsatellites, par site et par locus, varie entre 8,0 (MiaMr4, croissance faible) et 14,5 (Mia 28104, croissance faible). La variabilité génétique des loci étudiés est légèrement plus élevée chez le groupe à croissance faible (H_e moyen = 0,862; H_o moyen = 0,721) par rapport au groupe à forte croissance (H_e moyen = 0,522; H_o moyen = 0,617). Un déficit global en hétérozygote est observé chez les deux groupes de croissance (F_{is} moyen = 0,168 et 0,283 respectivement pour les groupes de faible et forte croissance). Ce déficit est principalement causé par les loci Mia 28104 et MiaMr4 (Tableau 2).

L'analyse factorielle des correspondances montre que les individus de forte et de faible croissance ont tendance à se différencier. En effet, les individus des deux groupes semblent former deux groupes distincts sur le premier axe de l'analyse (Figure 2).



Rapport final de projet PCRDA

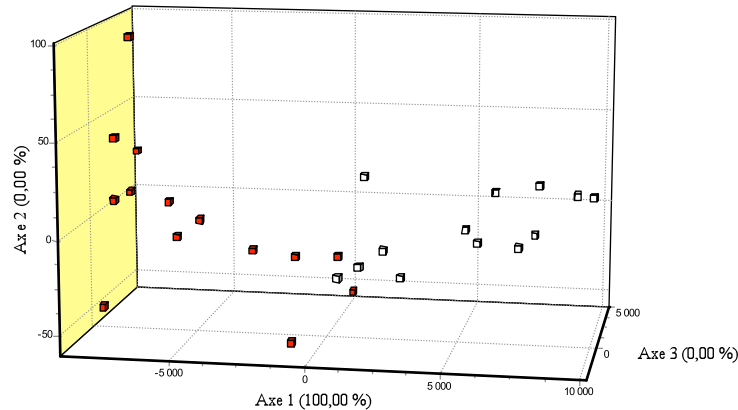


Figure 2. *Mya arenaria*. Coordonnées des individus de faible (carrés foncés) et de forte croissance (carrés blancs) sur les trois premiers axes de l'analyse factorielle des correspondances réalisée sur les données génétiques.

Les résultats de l'analyse factorielle des correspondances sont influencés par les données manquantes et la présence d'allèles rares (présents en une seule copie). Pour effectuer les analyses, tous les individus pour lesquels les génotypes à un ou plusieurs loci n'avaient pas été déterminés n'ont pas été pris en considération.

Bien que ces résultats semblent très intéressants, il sera nécessaire de les confirmer par l'analyse d'un plus grand nombre d'individus de chaque groupe et d'un plus grand nombre de loci par individu.

8. Impact du projet – Principaux bénéfices (i.e., est-ce que le problème initial a été résolu):

Nous avons réussi à répondre à la majorité de nos objectifs spécifiques, établissant que les différences de croissances des myes juvéniles sont caractérisées par une acquisition d'énergie via les taux de filtration différents ainsi que par une utilisation énergétique différentielle. Toutefois, ces niveaux métaboliques plus élevés des myes à forte croissance sont fortement compensés par une acquisition énergétique plus grande.

Pour le dernier objectif consistant à évaluer l'impact de l'élimination des individus à faible croissance sur la diversité génétique des populations en élevage et sur leur budget métabolique, nous ne pouvons répondre avec seulement les quelques

Rapport final de projet PCRDA

marqueurs microsatellites disponibles. En effet, le développement de ces marqueurs est plus difficile que prévu chez cette espèce, ce qui a entraîné un retard non négligeable dans l'analyse des résultats. Pour l'instant avec le financement disponible il n'est pas possible d'aller plus en avant. Le nombre de marqueurs devrait être sensiblement accru afin de répondre à cet objectif.

9. Transfert des connaissances / technologie aux décideurs et clients (inclure une copie des publications, rapports ou articles):

10. Dépenses et écarts budgétaires:

Contribution	Montant prévu initialement	Montant réellement dépensé	Différence
Industrie \$	4,000	4,000	Nil
Industrie (nature)	8,000	8,000	Nil
PCRDA (\$)	40,000	40,000	Nil
MPO (autre \$ et nature)	14,000	14,000	Nil
Partenaires UQAR et MAPAQ (\$ et nature)	18,000	18,000	Nil

11. Commentaires généraux:

Préparé par: Jean-Marie Sévigny et Réjean Tremblay

Date: 12 février 2009

Rapport final de projet PCRDA

Déclaration

Ce formulaire a été complété par Jean-Marie Sévigny et est, à ma connaissance, conforme à la réalité.

Responsable scientifique du MPO

Date

Partenaire de l'industrie

Date

Rapport final de projet PCRDA

Références

- Belkhir K., P. Borsa, J. Goudet, L. Chikhi et F. Bonhomme. 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- El Mousadik A. et R.J. Petit. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832–839.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485–486.
- Mohlenberg, F. et T. Kiorboe. 1981. Growth and energetics in *Spisula subtruncata* (Da Costa) and the effect of suspended bottom material. *Ophelia*, 20: 79-90.
- Pernet F et R. Tremblay. 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310: 73– 86. Pernet F, Tremblay R (2004) Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310: 73– 86
- Tremblay R, Myrand B, Sévigny J-M, Blier P, Guderley H (1998) Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 27-58
- Widdows J, Johnson D (1988) Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 113-121.
- Tremblay R, B. Myrand, J.-M. Sévigny, P. Blier et H. Guderley. 1998. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 27-58
- Weir B.S. et C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Widdows J. et D. Johnson. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 113-121.