

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

ACCLIMATATION THERMIQUE DE LA PALOURDE AMÉRICAINE,
MERCENARIA MERCENARIA : EXPÉRIMENTATION EN JARDIN COMMUN

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Comme exigence partielle
du programme de maîtrise en océanographie

PAR

GENEVIÈVE J. PARENT

Juin, 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Effet de la température sur la structure lipidique des membranes biologiques ..	2
1.1.1 Théorie de l'adaptation homéovisqueuse.....	3
1.1.2 Composantes lipidiques membranaires.....	5
<i>1.1.2.1 Descriptions et rôles des phospholipides et des stérols membranaires.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2.2 Acquisition des lipides.....</i>	<i>9</i>
1.2 Effet des forces évolutives sur la structure génétique des populations	11
1.2.1 Causes de différenciation génétique.....	12
<i>1.2.1.1 Sélection en milieu naturel.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1.2 Déficit en hétérozygotie chez les mollusques</i>	<i>15</i>
1.2.2 Méthodes d'analyse de différenciation génétique	17
1.3 Modèle biologique à l'étude : <i>Mercenaria mercenaria</i>	18
1.3.1 Physiologie de l'espèce	18
1.3.2 Génétique des populations de <i>Mercenaria mercenaria</i>	20
1.4 Objectifs spécifiques et hypothèses.....	25

CHAPITRE 2.....	26
REMODELLING OF MEMBRANE LIPIDS IN GILLS OF ADULT HARD CLAM, <i>MERCENARIA MERCENARIA</i>, DURING DECLINING TEMPERATURE: EFFECT OF LOCATION AND VARIETY IN RELATION TO FOOD AVAILABILITY	26
2.1 Abstract.....	26
2.2 Introduction.....	27
2.3 Material and methods.....	29
2.3.1 Animals.....	29
2.3.2 Experimental design.....	32
2.3.3 Environmental parameters.....	33
2.3.4 Laboratory analysis.....	33
2.3.4.1 <i>Genetics</i>	33
2.3.4.2 <i>Lipid classes</i>	34
2.3.4.3 <i>Fatty acids</i>	35
2.3.5 Statistical analysis.....	35
2.4 Results.....	37
2.4.1 Temperature measurements.....	37
2.4.2 Genetic characterization.....	37
2.4.3 Lipids classes.....	41
2.4.4 Fatty acids.....	44
2.5 Discussion.....	45
2.6 Acknowledgements.....	52

CHAPITRE 3.....	54
CONCLUSION GÉNÉRALE	54
3.1 Bilan et avancement des connaissances.....	54
3.2 Limites de l'étude et perspectives	55
BIBLIOGRAPHIE	59

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier mes directeurs pour un projet de recherche qui m'a vraiment passionné et un excellent soutien financier. Je tiens à remercier plus particulièrement Réjean Tremblay pour son excellent soutien tout au long du projet.

Il est aussi essentiel que je remercie une foule de personnes sans qui ce projet de maîtrise n'aurait pas eu lieu.

Tous les acadiens qui m'ont aidée à pêcher et à identifier les gisements de mollusques. L'équipe du Ministère des Pêches et des Océans à Moncton : entre autres Marc Ouellette, Angéline LeBlanc et Jean-François Mallet pour leur excellente aide sur le terrain. Un merci plus particulier à Marc Ouellette pour ses précieux conseils de terrain. Jean-Marie Sévigny pour son aide lors de l'élaboration de ce projet et pour les commentaires très constructifs apportés à ce mémoire. Ève-Julie Arsenault pour sa compagnie, sa bonne humeur et surtout son aide lors de la préparation du plan d'expérience ainsi que durant l'expérimentation. Aurélie Licois et Catherine Gaudreau qui sont venues me donner un coup de main plusieurs fois jusqu'aux petites heures du matin... Jean-Charles de l'auberge pour l'accueil et la surveillance de nos animaux. Sonia et Mari-Lou pour leur aide à l'identification des bestioles et leur bonne humeur au MAPAQ de Grande-Rivière. L'équipe du Centre Marin de Shippagan pour le soutien et l'aide lors de mes manipulations sur le terrain et à l'aquarium : Chantal, Steven, Gilles, France et Roger. L'équipe technique à l'Institut de recherche sur les zones côtières : Claude, Nadia et Manon pour avoir répondu à mes tonnes de questions. Un

merci plus particulier à Josée pour nos pauses qui me manquent tellement avec les p'tits chats et un Tim à la baie! Éric Parent et Sonia Belvin pour leurs précieux conseils concernant l'analyse d'allozymes. Alain Caron sans qui les statistiques seraient encore très abstraites dans ma tête! L'ISMER, pour une excellente formation grâce à Jean-Claude, Jean-François, Réjean, Céline et tout particulièrement François pour sa passion de la recherche transmise lors de ses cours (même ceux fictifs sur le pont du Coriolis...).

À la présidente du jury, Céline Audet, je la remercie sincèrement pour le temps qu'elle a accordé à la révision méticuleuse de ce mémoire.

Finalement, à ma petite sœur Josée (et en partie ma future filleule!!), ma petite sœur Française Flora et à Catherine (surtout pour tout ce qui fini en O : bateau, Boucto, Baro, Senso, St-Josepho) qui ont toujours été là lorsqu'un projet de maîtrise donne le mal de mer...

Aux avatars!

RÉSUMÉ

Chez les poïkilothermes, l'adaptation homéovisqueuse est le paradigme le plus utilisé pour expliquer le remodelage des lipides membranaires en fonction de la température. La présente étude vise à déterminer la capacité adaptative de la palourde américaine (*Mercenaria mercenaria*) à l'aide des différents mécanismes de remodelage des lipides membranaires en comparant, en jardin commun, des animaux de différentes origines de la côte est canadienne. Les résultats obtenus montrent que lors d'une diminution de température les différentes modifications apportées au sein des membranes cellulaires sont semblables et ne varient pas en fonction de l'origine des animaux. Ces résultats concordent avec la faible différenciation génétique observée entre les sites. Toutefois, une séquence de mécanismes de remodelage des lipides membranaires, qui semble liée à la physiologie de l'espèce, est observée chez tous les animaux. De plus, il semble que les branchies de *M. mercenaria* soient soumises à une régulation stricte de leur contenu lipidique puisqu'il diffère des sources environnementales de lipides. Finalement, cette étude montre un lien important entre l'environnement, la physiologie de l'espèce et l'adaptation homéovisqueuse chez les poïkilothermes.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Effet de la température sur la phase et l'ordre membranaire.....	4
Figure 1.2 Structures de classes de lipide	6
Figure 1.3. Structure, nom commun, nomenclature abrégée et UIPAC des acides gras.....	8
Figure 1.4 Répartition de l'espèce <i>Mercenaria mercenaria</i> sur la côte est du continent nord-américain.	22
Figure 1.5 Phénotype de l'extérieur de la coquille du bivalve a) <i>Mercenaria mercenaria</i> , b) et c) <i>M. mercenaria</i> variété <i>notata</i>	24
Figure 2.1 Map of Eastern Canada showing the study sites.	31
Figure 2.2 Temperature monitoring in the common garden site (Bouctouche) from August 11th to December 8th 2006.	38
Figure 2.3 Variation of the phospholipid to sterol ratio in gills of <i>Mercenaria mercenaria</i> as a function of time and sites (mean \pm s.e.m., n = 3).	43
Figure 2.4 Unsaturation index (A) and mol % of polyunsaturated fatty acids (PUFA; B), arachidonic acid (20:4n-6; C), eicosapentaenoic acid (20:5n-3; D) and docosahexaenoic acid (22:6n-3; E) in gill tissues of hard clams as a function of time and origin of clams (left and center panels) and in the environment (seston and sediment; right panels).....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Résumé des étapes importantes du développement de <i>Mercenaria mercenaria</i>	20
Tableau 2.1 Size (mean \pm s.e.m.), allele frequencies, heterozygosity (observed and expected) and F_{is} value at four loci of four locations of <i>Mercenaria mercenaria</i> and the selectively bred <i>M. mercenaria</i> var. <i>notata</i>	39
Tableau 2.2 Index of genetic differentiation between <i>Mercenaria mercenaria</i> from different locations and the <i>notata</i> variety at four allozyme loci	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : **a**cide **d**ésoxyribonucléique

AFLP : polymorphisme de taille de fragments amplifiés d'ADN (**a**mplified **f**ragment **l**ength polymorphism)

AG : **a**cide **g**ras

CA : **C**anada

DPH : **d**iphényl**h**exatriène

DIPETPD : **b**is-**p**hosphatidyléthanolamine **t**rifluorométhyl **p**hényl**d**iazirine

DNA : acide désoxyribonucléique (**d**eoxyribonucleic **a**cid)

É.-U. : **É**tats-**U**nis d'Amérique

*F*_{is} : coefficient de consanguinité

*F*_{st} : coefficient de différenciation spatiale

*GPT** : **g**lutamate-**p**yruvate **t**ransaminase

*H*_o : **h**étérozygotie **o**bservée

*H*_e : **h**étérozygotie attendue (**e**xpected heterozygosity)

HVA : adaptation homéovisqueuse (**h**omeoviscous **a**daptation)

*LAP** : **l**eucyl **a**mino**p**eptidase

*LDH** : lactate **d**éshydrogénase

*MPI** : **m**annose **p**hosphate **i**somérase

MUFA : AG monoinsaturé (**m**onou**u**nsaturated **f**atty **a**cid)

NMI : AG non interrompu de méthylène (**n**on-**m**ethylene-**i**nterrupted)

obs : **o**bservée

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (**p**olymerizing chain **r**eaction)

*PGI** : **p**hosphate **g**lucose **i**somérase

*PK** : **p**yruvate **k**inase

PL : **p**hospholipide

PUFA : AG polyinsaturé (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cid)

RAPD : amplification aléatoire de segments d'ADN polymorphiques (**r**andomly **a**mplified **p**olymorphism **D**N A)

RFLP : polymorphisme d'ADN segmenté par des enzymes de restriction (**r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism)

*SOD** : **s**uperoxide **d**ismutase

TAG : **t**riacylglycérol

TMA-DPH : 1-(4-**t**riméthylammonium)-6-**p**hényl-1,3,5-**h**exatriène

USA : États-Unis d'Amérique (**U**nited **S**tates of **A**merica)

VNTR : séquences répétitives polymorphiques (**v**ariable **n**umber of **t**andem **r**epeats)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La température est un des facteurs déterminants de la survie des organismes et ceci se reflète dans le lien étroit qui existe entre les gradients de température et l'aire biogéographique des espèces aquatiques ou terrestres (Hochachka et Somero, 2002). Des conditions environnementales différentes peuvent exister au sein de l'aire de distribution biogéographique d'une espèce. Afin d'évaluer l'influence de variables environnementales sur les caractères physiologiques d'une espèce, des individus provenant de plusieurs sites peuvent être prélevés et analysés directement ou transférés dans un jardin commun. Le jardin commun permet de comparer la variabilité de caractères phénotypiques d'individus lorsque les paramètres environnementaux varient de façon identique dans le temps. Un exemple d'étude en jardin commun est celui de Pernet et coll. (2006) qui comparait des juvéniles de deux variétés de l'espèce de bivalve *Mercenaria mercenaria* (L.) : la variété *notata* provenant du Massachusetts (É.-U.) et une variété sauvage provenant de l'Île-du-Prince-Édouard (Canada). Les deux variétés présentaient des profils de remodelage des lipides membranaires différents en relation avec à une diminution de température de 24 à 0°C lors des conditions automnale et hivernale (Pernet *et al.*, 2006). Puisque la variété *notata* était génétiquement différente de la variété sauvage canadienne, les auteurs ont proposé que la différence observée entre les profils de remodelage des lipides membranaires pourrait être liée aux processus de sélection employés en éclosion pour accroître le taux de croissance (Pernet *et al.*, 2006).

En lien avec les travaux de Pernet et coll. (2006), le but de la présente étude est de tester à une échelle géographique plus fine si des différences de remodelage des lipides membranaires existent entre les individus *M. mercenaria* provenant de plusieurs sites situés le long de la côte est canadienne. En complément, nous examinerons si les différents lots de palourdes proviennent de populations différenciées par le biais d'analyses génétiques (allozymes). L'introduction de ce mémoire se divise en trois sections. Tout d'abord, nous verrons comment la température influence la composition lipidique des membranes biologiques. Puis, nous examinerons brièvement l'effet des forces évolutives sur la composition génétique des populations de bivalves. Enfin, nous présenterons le modèle d'étude *Mercenaria mercenaria*.

1.1 Effet de la température sur la structure lipidique des membranes biologiques

La température influence la structure physique des membranes : une augmentation de température accroît l'entropie du système ce qui cause un désordre moléculaire plus grand. Dans la cellule, les variations d'énergie cinétique affectent les échanges transmembranaires, les interactions moléculaires et la stabilité des macromolécules. Afin de maintenir les fonctions cellulaires constantes lors de variations de température, les organismes poïkilothermes, dont la température interne varie en fonction de l'environnement, doivent adapter leurs constituants et/ou leurs activités cellulaires. Des exemples de modifications cellulaires en fonction de la température sont l'utilisation de protéines chaperonnes et les variations intra- et extracellulaires du pH (Hochachka et

Somero, 2002). Au niveau des membranes cellulaires, les organismes poïkilothermes peuvent aussi modifier leur composition moléculaire en fonction des variations de température.

1.1.1 Théorie de l'adaptation homéovisqueuse

Les lipides constituent 50% de la structure membranaire cellulaire et leurs propriétés physiques varient en fonction de la température. Dans un modèle synthétique de membrane lipidique, trois phases membranaires existent selon les conditions thermiques: une phase de gel à très faible température, une phase liquide-cristalline à la température physiologique de l'animal et la phase hexagonale inverse, dite H_{II} , lorsque la température s'élève à des valeurs extrêmes (Fig. 1.1) (Hazel, 1995). Puisque les membranes lipidiques accomplissent leurs fonctions métaboliques généralement à la phase liquide-cristalline, les changements de température posent un grand défi au maintien de l'homéostasie chez les organismes poïkilothermes. Certains de ces derniers modifient leurs composantes lipidiques membranaires afin d'adapter le désordre membranaire en fonction des variations d'entropie. Cet ajustement des membranes en fonction de la température se nomme adaptation homéovisqueuse (Sinensky, 1974; Hazel, 1995) et peut se réaliser par différentes modifications moléculaires des lipides membranaires, soit a) par la taille et le nombre d'insaturations des acides gras (AGs), 2) par la composition en AGs des phospholipides

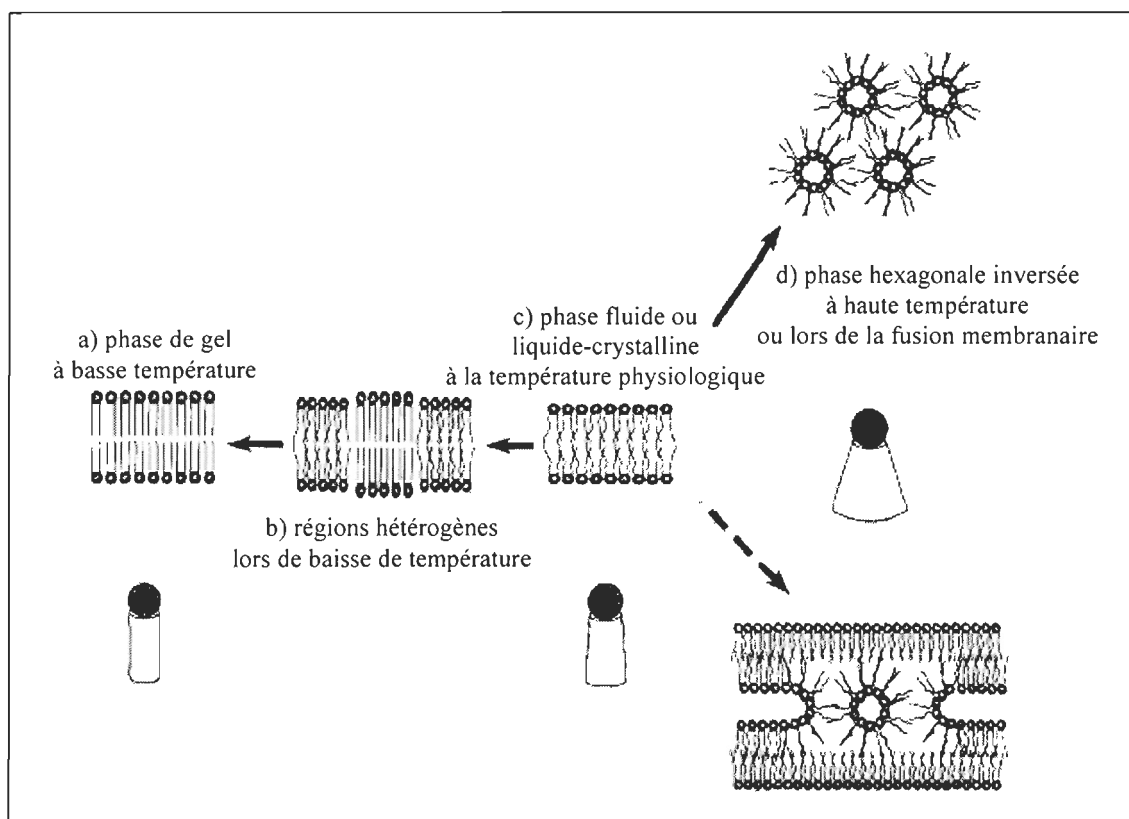


Figure 1.1 Effet de la température sur la phase et l'ordre membranaire (d'après Hazel, 1995)

(PLs), 3) par le type de tête polaire des PLs, 4) par la proportion relative de diacyles et de plasmalogènes (forme de phospholipides possédant une liaison vinyle éther à la place du lien ester) et 5) du ratio de cholestérol par rapport aux PLs (Hazel et Williams, 1990). En résumé, plusieurs des composantes lipidiques membranaires peuvent être modifiées ou remplacées lors d'un changement de température.

1.1.2 Composantes lipidiques membranaires

Les membranes sont considérées comme des mosaïques fluides où la plupart des molécules peuvent se déplacer dans le plan de la membrane. Toutes les membranes ont une structure semblable : deux couches d'un mélange de lipides assemblés à des protéines par des liaisons non covalentes (Alberts *et al.*, 2002). Ce sont les lipides qui servent de matrice aux protéines associées directement ou indirectement à la membrane. Les principaux constituants lipidiques membranaires sont les PLs et les stérols (Fig. 1.2) et sont des molécules amphiphiles (Alberts *et al.*, 2002).

1.1.2.1 Descriptions et rôles des phospholipides et des stérols membranaires

Les PLs sont constitués d'une tête hydrophile formée d'une molécule de glycérol associée par un lien ester phosphore à un groupement variable (choline, sérine, éthanolamine, inositol, etc.), et d'une queue hydrophobe formée de deux AGs qui sont attachés par un lien ester aux positions C1 et C2 à la molécule de glycérol (Alberts *et al.*, 2002) (Fig. 1.2). La diversité observée des têtes polaires permet que les interactions entre les différentes protéines et les PLs soient optimales au sein de la membrane. De plus, certains de ces groupements peuvent agir comme messenger secondaire (McPhail,

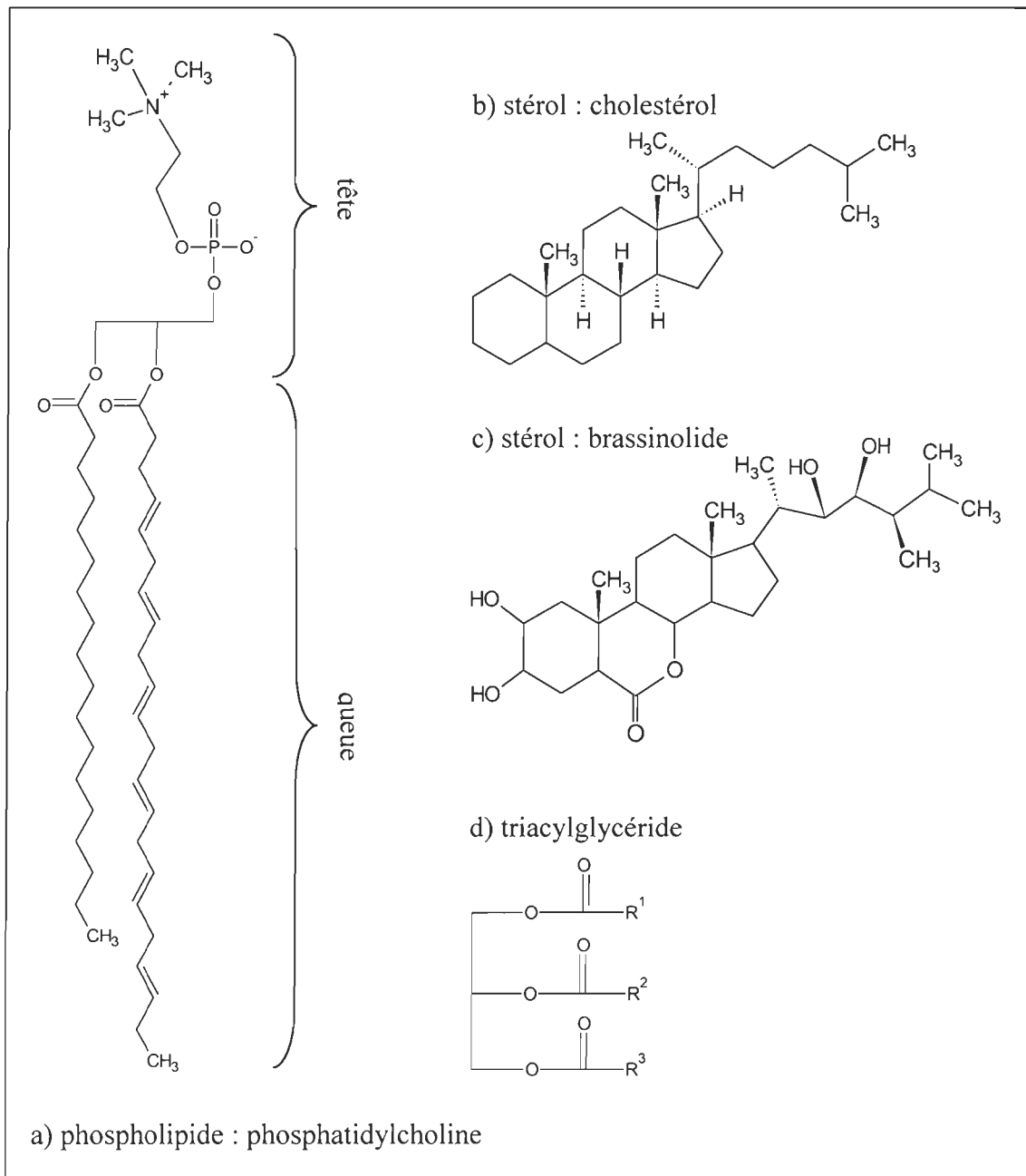


Figure 1.2 Structures de classes de lipide (Brosa, 1997; Voet et Voet, 2004)

2002). Une autre fonction des têtes polaires est d'augmenter ou de réduire l'angle entre les deux AGs de la queue hydrophobe et ainsi attribuer au PL plus ou moins d'espace dans la membrane cellulaire (Hazel, 1995). La queue hydrophobe est composée de deux AGs. Ces derniers sont des chaînes hydrocarbonées ayant un nombre variable d'atomes de carbone et de liaisons doubles ainsi qu'un groupement acide à une extrémité (Fig. 1.3). La notation employée pour désigner les acides gras est L:Bn-X, où L est la longueur de la chaîne carbonée, B est le nombre de doubles liaisons et n-X est la position de la double liaison la plus proche du groupe méthyle terminal. Les AGs ayant aucune, une ou plusieurs doubles liaisons sont respectivement nommés des AGs saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. La longueur de la chaîne carbonée, le nombre de double liaison et leur position sont des facteurs déterminants de la fluidité membranaire.

L'acide docosahexanoïque (DHA, 22:6n-3, Fig. 1.3), un acide gras essentiel chez les bivalves (Whyte *et al.*, 1990; Helm *et al.*, 1991; Marty *et al.*, 1992), influence directement la fluidité membranaire chez les poissons (Dey *et al.*, 1993; Buda *et al.*, 1994; Logue *et al.*, 2000) contrairement à certains autres AGs qui agissent aussi à titre de messagers cellulaires lorsqu'ils sont détachés de la membrane. Par exemple, l'acide arachidonique (ARA, 20:4n-6, Fig. 1.3) et l'acide eicosanoïque (EPA, 20:5n-3) sont des précurseurs des écosanoïdes, molécules impliquées dans la réponse immunitaire ou inflammatoire (Stanley-Samuelson, 1994). Chez les bivalves, la présence de ARA et EPA dans l'alimentation est reliée à une réponse immunitaire accrue, caractérisée par une augmentation du nombre d'hémocytes (Delaporte *et al.*, 2003; Delaporte *et al.*, 2006; Delaporte *et al.*, 2007).

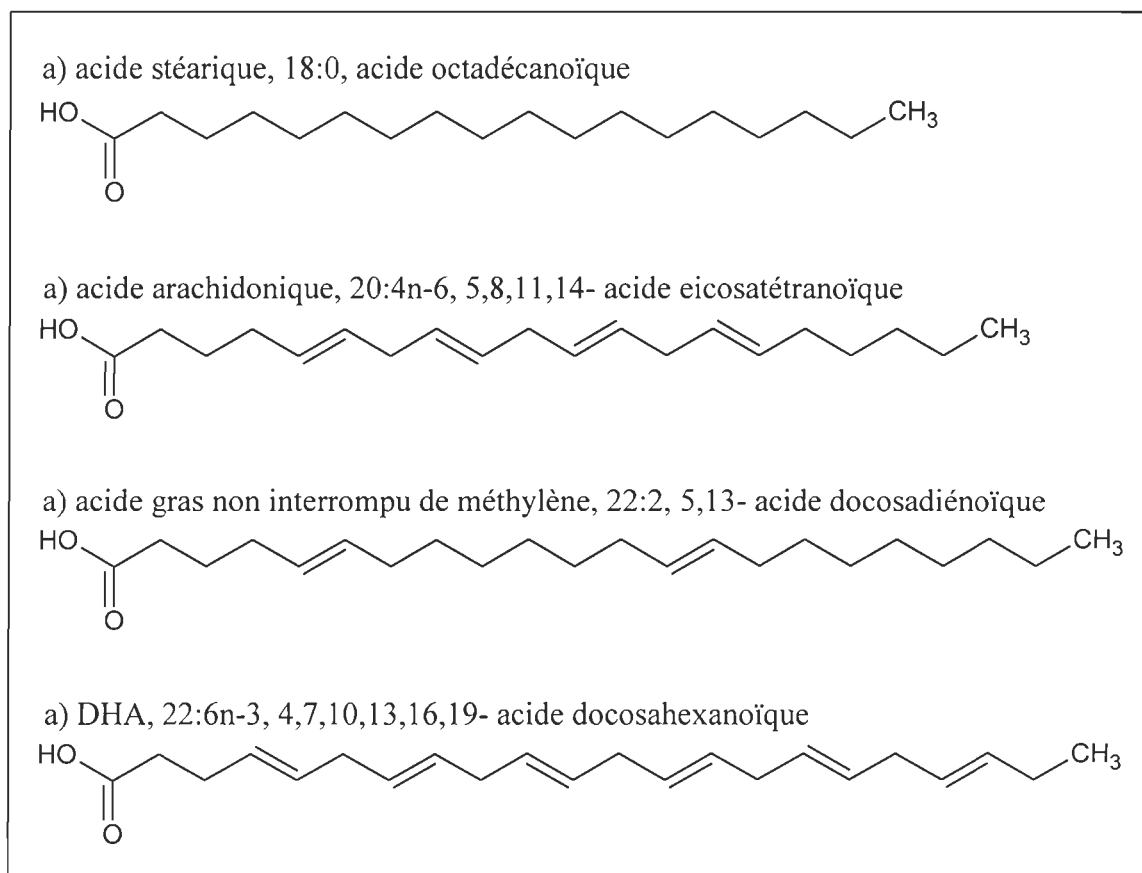


Figure 1.1. Structure, nom commun, nomenclature abrégée et UIPAC des acides gras (Voet and Voet, 2004)

Toutefois, chez le pétoncle géant, *Placopecten magellanicus*, l'acide eicopensanoïque (EPA, 20 :5n-3) semble également jouer un rôle important dans la régulation du désordre membranaire (Hall *et al.*, 2002).

Contrairement à plusieurs invertébrés, il existe une grande diversité de stérols chez les bivalves selon l'espèce (Kanazawa, 2001) et le régime alimentaire (Soudant *et al.*, 1998; Soudant *et al.*, 2000) (Fig. 1.2). En général, l'une des principales formes retrouvées chez les animaux est le cholestérol. Ce dernier est formé d'une structure moléculaire planaire munie d'un système d'anneaux coiffé d'un groupe hydroxyle et d'une chaîne d'atomes de carbone (Fig. 1.2). Cette structure rigide lui permet d'agir comme agent stabilisateur et d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires puisqu'il est intercalé entre les PLs (Alberts *et al.*, 2002). Comparativement aux autres stérols dont la chaîne carbonée est plus ou moins longue, le cholestérol est la forme de stérols la plus « rigidifiante » au sein de la membrane (Suckling *et al.*, 1979; Smondyrev et Berkowitz, 2001). Finalement, outre leurs fonctions membranaires, d'autres fonctions physiologiques sont conférées aux stérols comme le transport des lipides et la communication hormonale (Alberts *et al.*, 2002).

1.1.2.2 Acquisition des lipides

Les bivalves sont incapables de synthétiser les AGs ayant des doubles liaisons après le neuvième atome de carbone de la chaîne. Des exemples de ces acides gras sont l'ARA, l'EPA et le DHA. Les bivalves doivent donc puiser ces AGs dits « essentiels » dans leur alimentation. L'EPA est l'AG prédominant chez toutes les espèces de diatomées marines.

Le DHA est normalement un constituant mineur des diatomées, mais se retrouvent dans une grande proportion chez les dinoflagellés marins (Napolitano, 1999).

Les mollusques ont cependant la capacité de produire des AGs polyinsaturés nommés des AGs non interrompus de méthylène (NMI) (Ackman, 1989). Ces derniers sont présents en proportions importantes chez certaines espèces de bivalves, mais la longueur des chaînes et le nombre de liaisons doubles sont variables selon l'espèce (Zhukova, 1986). Le rôle des NMI n'est pas bien défini, mais ceux-ci pourraient jouer un rôle dans la régulation du désordre membranaire (Klingensmith, 1982; Kraffe *et al.*, 2004).

Lorsque la nourriture est limitée ou absente, les mollusques peuvent aussi puiser dans leurs réserves en triacylglycérols (TAG). Les TAGs (Fig. 1.2) sont la forme majeure de lipides de réserve utilisés à des fins énergétiques chez les animaux (Lehninger *et al.*, 2005). Ils sont constitués d'une molécule de glycérol sur laquelle sont greffés trois AGs par des liens esters. Puisque les TAGs sont des lipides neutres (non polaires), ils se condensent dans un espace anhydre, sous forme de gouttelettes lipidiques, ce qui permet d'emmagasinier l'énergie potentielle de façon optimale (Horton *et al.*, 1994). Chez plusieurs larves de poissons et d'invertébrés marins, les TAGs sont la seule source d'énergie jusqu'à ce qu'une source exogène de nourriture soit accessible (pour revue voir Fraser, 1989). C'est un groupe d'enzyme nommé lipase qui permet le catabolisme des TAGs et la libération des AGs (Horton *et al.*, 1994), pouvant servir à la fois de source d'énergie, mais aussi à la production de PLs.

Contrairement à plusieurs autres invertébrés, les bivalves sont généralement incapables de synthétiser les stérols nécessaires à leur croissance et survie (Kanazawa, 2001). En général, l'assemblage de stérols est particulier à chaque espèce d'invertébrés et est maintenue par l'assimilation de stérols présents dans leur alimentation, la présence d'espèces symbiotiques, la bioconversion de stérols provenant de l'alimentation et, pour certains, la synthèse *de novo* (Goad, 1978).

1.2 Effet des forces évolutives sur la structure génétique des populations

La variabilité génétique au sein des populations est causée par quatre forces évolutives : la mutation, la dérive génétique, la migration et la sélection. Les mutations jouent le rôle de moteur de l'évolution et sont à l'origine de la diversité génétique pour tous les organismes. L'arrivée de nouveaux allèles est cependant rare entre deux générations puisque le taux de mutation pour un gène est d'environ 10^{-4} à 10^{-6} par génération (Hartl et Clark, 2007). Les trois autres forces évolutives (dérive génétique, migration, sélection) augmentent, maintiennent ou réduisent la diversité génétique dans les populations. La dérive génétique conduit aléatoirement à la perte ou à la fixation des allèles dans une population avec un effectif fini (Freeman et Herron, 1998). Celle-ci se produit plus rapidement lorsque la taille effective de la population, étant le nombre d'individus se reproduisant, est petite. Un effet antagoniste à la dérive génétique est la migration puisque par le maintien d'un flux génique, elle homogénéise les fréquences alléliques entre les populations. Finalement, la sélection favorise les génotypes possédant de meilleures caractéristiques de survie et de reproduction dans un habitat particulier, augmentant ainsi

leur fréquence dans cette population (Freeman et Herron, 1998). L'effet de toutes ces forces évolutives se traduit par une modification des fréquences alléliques et/ou génotypiques (Harry, 2001).

1.2.1 Causes de différenciation génétique

Le modèle de Hardy-Weinberg sert à prédire les fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques lorsque aucune force évolutive n'agit sur la population (Hartl et Clark, 2007). Dans une population réelle, ce sont les forces évolutives qui font varier les fréquences alléliques ainsi que les proportions en homozygotes ou en hétérozygotes. Les termes homozygotes et hétérozygotes sont définis respectivement comme des individus possédant des allèles identiques ou non pour un même gène ou une même séquence. Par exemple, une augmentation du taux de migration peut soit causer un gain d'homozygotie ou d'hétérozygotie sur l'ensemble des loci. Une fréquence élevée d'homozygotes peut être causée par l'arrivée imminente d'immigrants provenant d'une population différenciée. Cependant, lorsque les immigrants provenant de la population différenciée se reproduisent avec les résidants initiaux, une augmentation du nombre d'hétérozygotes sera observée. Par ailleurs, une diminution du nombre d'hétérozygotes à un locus particulier peut être expliquée par la sélection. Lorsqu'une diminution du nombre d'hétérozygotes est observée sur l'ensemble des loci, il peut y avoir présence de consanguinité au sein de la population étudiée. Bien que la consanguinité ne soit pas une force évolution (aucun changement des fréquences alléliques d'a lieu), elle cause un écart entre les valeurs attendue et observée des génotypes puisqu'il y a présence d'appariement non-aléatoire des gamètes. En résumé,

d'après les différences entre les proportions en hétérozygotes et homozygotes de la population et celles prédites par le modèle d'Hardy-Weinberg, l'impact des forces évolutives peut être déduit (Freeman et Herron, 1998).

Afin de caractériser l'impact de ces forces, deux indices sont généralement utilisés. L'indice F_{is} est une mesure à l'intérieur d'une population la déviation des fréquences de génotypes par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Ainsi, le F_{is} est considéré comme un indice de consanguinité indiquant la probabilité qu'un individu homozygote ait des allèles communs à un locus ou à l'ensemble des loci parce qu'ils proviennent d'un seul ancêtre. L'indice de différenciation ou de fixation (F_{st}) permet de mesurer le niveau de différenciation génétique entre les groupes étudiés (Hartl et Clark, 2007).

En général, les espèces marines sont caractérisées par une faible différenciation génétique sur une grande échelle géographique causée par un flux génique important (Waples, 1987; Palumbi, 1994, 2003; Ward *et al.*, 1994). L'homogénéité génétique chez les espèces marines est expliquée par la taille des populations, le haut taux de fertilité des individus et la longue durée de la phase larvaire favorisant la dispersion. Malgré ces facteurs, de la différenciation génétique est observée chez plusieurs espèces marines (pour revue voir Burton, 1983). La différenciation génétique s'explique par la présence de barrières biotiques (ex. prédateur) ou abiotiques (ex. courant marin), par la sélection naturelle (Burton, 1983) ou par la variance du succès reproducteur (Hedgecock *et al.*, 2007).

1.2.1.1 Sélection en milieu naturel

La sélection naturelle est cependant difficile à prouver puisque les analyses doivent mettre en évidence des différences entre les aptitudes associées aux variantes du caractère phénotypique étudié en milieu naturel. Quelques espèces sont considérées comme des modèles de sélection puisque plusieurs études en milieu naturel suggèrent un lien entre la performance des individus et les variations des fréquences alléliques à des loci particuliers. Trois exemples seront présentés ici, soit le choquemort, *Fundulus heteroclitus*, le copépode, *Tigriopus californicus*, et la moule, *Mytilus edulis* (Hilbish, 1996).

Pour l'espèce de choquemort, il existe une forte corrélation entre les différentes fréquences alléliques de la lactate déshydrogénase-B (*LDH**) et la latitude sur la côte est du continent nord-américain (Powers et Place, 1978; Ropson *et al.*, 1990). Ceci s'explique en partie par l'efficacité catalytique maximale des allozymes à la latitude où leurs fréquences alléliques sont les plus grandes (Place et Powers, 1979; 1984a, b). Chez le copépode, lors d'un choc hyperosmotique, l'allèle migrant le plus rapidement de la glutamate pyruvate transaminase (*GPT**) confère aux larves un taux de mortalité plus bas que celles étant homozygote pour l'allèle le plus lent (Burton et Feldman, 1983). La *GPT** catalyse la réaction finale de la synthèse de l'alanine qui est impliquée dans la régulation du volume cellulaire durant un stress osmotique (Burton et Feldman, 1982). Cette espèce de copépode vit dans des marelles intertidales où les fluctuations de salinité sont très rapides et une grande différenciation existe entre les populations au locus *GPT** (Burton et Feldman, 1981; Burton, 1986). Ces résultats suggèrent donc que de la sélection se produit au locus

*GPT** par l'aptitude variable des géotypes aux changements de salinité. Quant à la moule, la fréquence d'un allèle particulier *LAP*⁹⁴ de la leucyl amino peptidase est associée à un gradient de salinité dans le canal de Long Island (É.-U.) (Koehn *et al.*, 1976; 1980b). Lors du recrutement annuel, une autre étude a montré que les caractéristiques géotypiques des larves de moules étaient au départ celles du milieu océanique et que par la suite une mortalité de plus en plus importante était associée aux larves de moule ayant l'allèle *LAP*⁹⁴ alors que la salinité diminuait (Koehn *et al.*, 1980b; Hilbish, 1985). De plus, les moules possédant l'allèle *LAP*⁹⁴ catalysaient plus rapidement l'hydrolyse d'un acide aminé, produit catalytique de l'enzyme, que celles qui ne la possédait pas (Koehn et Siebenaller, 1981). Comme mentionné précédemment, les acides aminés libres sont impliqués dans la régulation osmotique et donc du volume cellulaire. Tous ces faits suggèrent donc que la salinité puisse être un agent de sélection au locus *LAP**.

Outre les trois modèles biologiques précédents, plusieurs autres espèces marines semblent être sous l'effet de la sélection (Schmidt et Rand, 2001; Dufresne *et al.*, 2002; Veliz *et al.*, 2004). L'avantage des trois modèles de sélection présentés est que plusieurs études montrent les mécanismes biochimiques et physiologiques dissimulées sous les différences de performance associées aux caractéristiques génétiques des individus en milieu naturel.

1.2.1.2 Déficit en hétérozygotie chez les mollusques

En général, il existe une relation positive entre des caractères de performance et le degré d'hétérozygotie chez les mollusques (voir pour revue Zouros, 1987; Mitton, 1993).

Par exemple, Koehn et Shumway (1982) ont reporté une corrélation négative entre le taux de consommation d'oxygène et la proportion d'hétérozygotes chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Parallèlement, des travaux aux Îles-de-la-Madeleine ont montré une relation positive entre le degré d'hétérozygotie et la condition physiologique des moules, *Mytilus edulis*, caractérisée par leur résistance aux stress, le potentiel de croissance, le ratio oxygène sur azote, les niveaux métaboliques basal et maximal, la thermosensibilité du métabolisme à haute température et la déstabilisation de la membrane lysosomiale (Tremblay *et al.* 1998a, b, c, d). Ces caractéristiques suggèrent que les moules le plus hétérozygotes résisteraient mieux aux phénomènes de mortalités massives observés en milieu naturel (Myrand *et al.*, 2002). Malgré ces observations où l'hétérozygotie semble conférer des avantages métaboliques couplés à la longue phase planctonique des bivalves, des observations répétées de déficit en hétérozygotes sont notées (revue dans Zouros *et al.*, 1984 ; Gaffney *et al.*, 1990). Trois hypothèses ont été élaborées pour expliquer ce phénomène. La première hypothèse est que le polymorphisme ou le nombre d'hétérozygotes n'est pas dénombré correctement par la présence d'aneuploïdie, d'allèles nuls ou d'erreurs analytiques qui causeraient sa détection difficile. La seconde hypothèse est que les individus ne proviennent pas d'un ensemble de gamètes fécondés aléatoirement (effet Wahlund), ce qui favoriserait l'augmentation de l'homozygotie par la consanguinité. La dernière hypothèse est qu'il y aurait de la sélection contre les hétérozygotes durant la phase larvaire ou les jeunes stades poste-larvaires.

1.2.2 Méthodes d'analyse de différenciation génétique

Il existe plusieurs techniques d'analyses moléculaires pour déterminer la diversité génétique. L'évaluation du polymorphisme génétique n'a lieu que lorsque les variations génétiques sont héréditaires, caractères transmis à leurs descendants, et différenciables par une méthode moléculaire. Dans l'ADN, les types de polymorphismes existant sont les mutations ponctuelles (à un seul nucléotide), les insertions ou délétions et les réarrangements de segment d'ADN dans un locus d'intérêt. Ces différentes mutations sont détectées au niveau des protéines ou de l'ADN.

La migration différentielle d'allozymes, diverses formes d'une enzyme à un locus, fut la première technique utilisée afin d'évaluer le polymorphisme génétique chez différentes espèces. Ces marqueurs génétiques sont peu coûteux et peuvent parfois indiquer la présence de sélection (Eanes, 1999). Cependant, puisque le code génétique est redondant et que plusieurs mutations de l'ADN sont silencieuses, pour plusieurs espèces, le polymorphisme de ce marqueur est très faible. Des techniques moléculaires au niveau de l'ADN sont donc utilisées afin d'augmenter le potentiel de polymorphisme des marqueurs génétiques.

La migration différentielle d'ADN segmenté par des enzymes restrictives (RFLP), de segments amplifiés d'ADN polymorphique (RAPD-AFLP), de séquences amplifiées d'ADN hautement polymorphiques (VNTR) ainsi que le séquençage de sections du chromosome circulaire de la mitochondrie ou du chloroplaste sont quelques exemples de

détection de polymorphisme génétique au niveau de l'ADN (Hartl, 2000). Chacune de ces techniques possèdent des avantages et des inconvénients qui leurs sont propres (revus dans Liu et Cordes, 2004). Actuellement, deux techniques moléculaires très utilisées pour étudier la structure génétique des populations sont les marqueurs AFLP et VNTR. Les marqueurs AFLP sont intéressants puisqu'ils peuvent se faire sur plusieurs espèces sans grande mise au point, couvrent une grande partie du génome, sont très nombreux (une centaine) et sont obtenus simultanément (Liu et Cordes, 2004 ; Meudt et Clarke, 2006). Les inconvénients de ces marqueurs sont qu'ils sont dominants (tous les loci sont donc assumés en équilibre Hardy-Weinberg) et qu'un séquenceur est essentiel à cette technique. Les marqueurs VNTR, plus particulièrement les microsatellites qui sont des répétitions de 2 à 10 nucléotides, sont quant à eux très souvent grandement polymorphiques (grand nombre d'allèles pour chacun des loci) et codominants (pouvant donc indiquer l'effet des forces évolutives). Ces marqueurs nécessitent cependant l'identification de séquences d'ADN précédant les microsatellites ce qui peut parfois augmenter considérablement les coûts d'analyse (Liu et Cordes, 2004).

1.3 Modèle biologique à l'étude : *Mercenaria mercenaria*






1.3.1 Physiologie de l'espèce

La palourde américaine *Mercenaria mercenaria* (Linnæus, 1758) est un mollusque bivalve de la famille des vénéridés. Cet organisme benthique vivant surtout en milieu intertidal et subtidal haut se nourrit principalement de matière en suspension (phytoplancton, microorganismes hétérotrophes et détritus) comme la plupart des bivalves

filtreurs (Bayne et Hawkins, 1992). L'entrée principale de seston se fait par un siphon court divisé en deux chambres inhalante et exhalante (Jones, 1979). Alors que l'eau entre par le siphon inhalant, un système composé de branchies et palpes labiaux filtre et apporte à la bouche les particules de nourriture (Ansell, 1961). Le pied du bivalve, lui permet principalement de s'enfoncer dans le sédiment (Eble, 2001), mais peut également favoriser la remise en suspension du sédiment lorsque peu de seston est disponible dans la colonne d'eau (Bricelj et Malouf, 1984). À partir de la bouche, la nourriture se déplace ensuite dans le système digestif pour se rendre à l'estomac où une glande digestive entourant celui-ci génère les enzymes nécessaires à la digestion. Chez les bivalves, différents types de tissus emmagasinent les molécules servant de combustible énergétique (pour revue voir Mathieu et Lubet, 1993). Pour les vénérédés, ce sont les muscles, principalement adducteur et du pied, la gonade et la glande digestive qui accumulent les réserves énergétiques. Les muscles contiennent du glycogène alors que la gonade et la glande digestive emmagasinent du glycogène et des lipides.

Au Canada Atlantique, la ponte chez cette espèce se déroule entre avril et juillet (Landry *et al.*, 1999). Une fois les œufs fécondés et le zygote formé, le cycle de vie de ce mollusque bivalve débute par une phase planctonique véligère d'une durée de 6 à 20 jours (Tableau 1.1) pour se terminer par une phase benthique débutant lorsque la larve devient pédivéligère (revue dans Carriker, 2001).

Tableau 1.1 Résumé des étapes importantes du développement de *Mercenaria mercenaria*
(d'après Carriker, 2001)

Phase	Stade	Durée	Définition	Physionomie
Planctonique	<i>Véligère sans coquille</i>	16h	Développement du zygote	
	<i>Véligère avec coquille</i>	20 jours	Développement des valves	
Benthique	<i>Pedivéligère</i>		Développement d'un pied permettant la nage et de ramper sur le substrat	
	<i>Plantigrade byssal</i>	Semaines	Attachement au substrat à l'aide d'un byssus	
	<i>Plantigrade juvénile</i>		À partir de 9 mm le byssus devient non fonctionnel et les jeunes individus doivent s'enfoncer à l'aide de leur pied et de leurs valves	

1.3.2 Génétique des populations de *Mercenaria mercenaria*

Les gisements naturels de palourdes américaines se trouvent de la baie des Chaleurs (Canada) au sud de la Floride (É.-U.) (Palmer, 1927, tiré de Harte, 2001) (Fig. 1.4). Les densités des populations de *M. mercenaria* sont variables selon la latitude. Au nord de Cape Cod au Massachusetts (É.-U.), cette espèce est seulement retrouvée dans les baies et les estuaires réchauffés par l'apport d'eau douce et le soleil.

Une étude antérieure sur la caractérisation de la structure génétique des populations de *M. mercenaria* montre que les individus du sud du Massachusetts (É.-U.) et du Maine (É.-U.) diffèrent des individus provenant de l'étang Sam Orr au Nouveau-Brunswick (CA) et de l'Île-du-Prince-Édouard (CA) par leurs fréquences alléliques (Dillon et Manzi, 1992). Les auteurs rapportent la perte de 6 à 12 d'allèles rares et une baisse d'hétérozygotie marquée pour les 7 allozymes testés pour des individus provenant des deux sites canadiens comparés à ceux du Maine ou du Massachusetts (É.-U.). Pour ces raisons, les auteurs considèrent donc les sites canadiens distincts de ceux des États-Unis, et ce, malgré un indice de fixation plutôt faible ($F_{st} = 0,05$) entre ces sites. Finalement, les auteurs suggèrent aussi que les sites à la limite nordique de l'aire biogéographique vivent fréquemment des périodes de sélection, d'extinction et de recolonisation (Dillon et Manzi, 1992; Hilbish, 2001), ce qui empêche la différenciation par la dérive génétique.

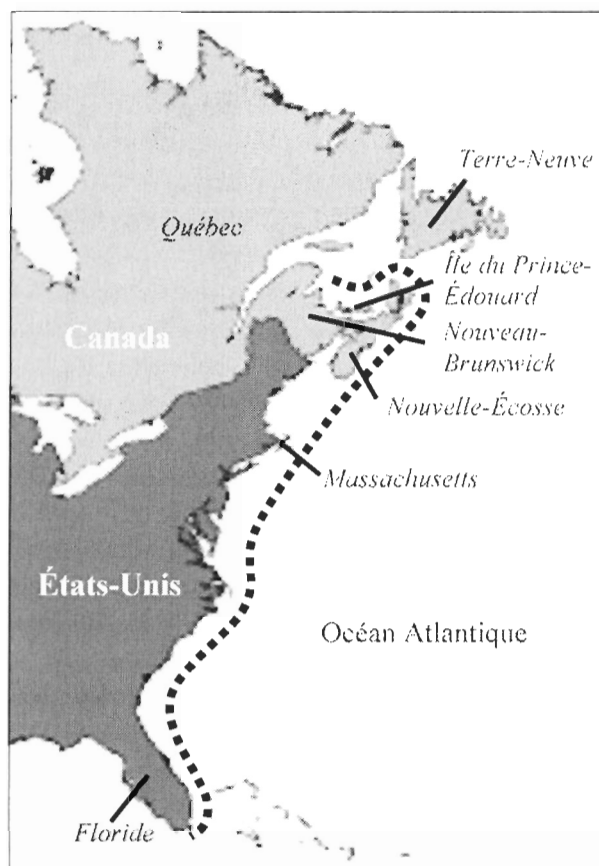


Figure 1.4 Répartition de l'espèce *Mercenaria mercenaria* sur la côte est du continent nord-américain. La ligne pointillée délimite l'aire biogéographique de l'espèce (d'après Harte, 2001).

Quant à la variété *notata*, elle est caractérisée par une coquille pourvue de zigzags violacés (Fig. 1.5b) et de bandes violacées lorsqu'elle est homozygote (Fig. 1.5c) pour un gène en particulier (Humphrey et Crenshaw Jr., 1989). Cette caractéristique phénotypique distinctive a permis la sélection d'individus à haut taux de croissance qui ont d'ailleurs été utilisés en aquaculture au Canada (MacKenzie *et al.*, 2002).

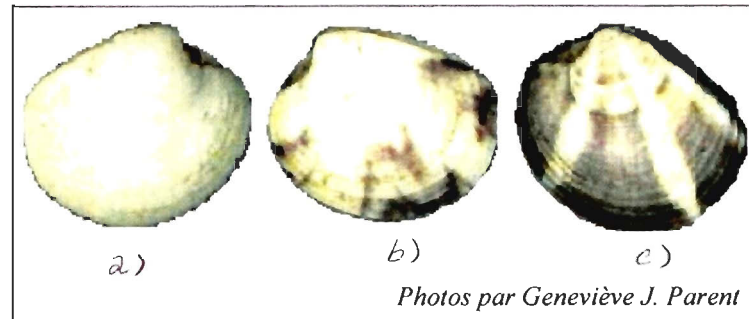


Figure 1.5 Phénotype de l'extérieur de la coquille du bivalve a) *Mercenaria mercenaria*, b) et c) *M. mercenaria* variété *notata*

1.4 Objectifs spécifiques et hypothèses

Une sélection pour un ou de plusieurs phénotypes adaptés aux conditions hivernales rencontrées à la limite nordique de l'aire biogéographique de l'espèce *M. mercenaria* pourrait avoir lieu. Nous avons donc mené une étude sur la capacité adaptative au froid de palourdes provenant de différents sites à la limite nordique l'aire biogéographique par une approche expérimentale en jardin commun. La capacité adaptative des palourdes aux variations de température a été évaluée par l'étude des mécanismes de régulation lipidique membranaire et ces aptitudes ont été liées à leurs caractéristiques génétiques.

Dans ce contexte, nos hypothèses nulles sont :

1. il n'y a pas de différence entre les profils de remodelage des lipides membranaires des palourdes *M. mercenaria* provenant de différents sites lors de la baisse de température automnale;
2. il n'y a pas de différenciation génétique entre les différents lots de *M. mercenaria*.

CHAPITRE 2

REMODELLING OF MEMBRANE LIPIDS IN GILLS OF ADULT HARD CLAM, *MERCENARIA MERCENARIA*, DURING DECLINING TEMPERATURE: EFFECT OF LOCATION AND VARIETY IN RELATION TO FOOD AVAILABILITY

2.1 Abstract

In a previous work, a major remodelling of lipids consistent with the theory of homeoviscous adaptation occurs in juvenile hard clam, *Mercenaria mercenaria*, during a temperature reduction from 24°C to -1°C. Also the lipid remodelling varies between genetically distinct lines of hard clam. This study examines whether adult hard clams originating from different locations and a selectively bred variety showed differences related to their genetic characteristics in the remodelling of lipids that normally occurs during decreasing temperatures. Wild hard clams from four locations in Atlantic Canada and the selectively bred *M. mercenaria* var. *notata* were held at an aquaculture growout site located at the northern distribution limit of the species in the Gulf of St. Lawrence from August to December 2006. Gills were sampled monthly for lipid analyses. Hard clams from the five groups showed an increase in unsaturation index mainly attributable to 22:6n-3 and 20:5n-3 as temperature decreased during the fall followed by an increase in the phospholipid to sterol ratio in December. Although hard clams from the wild showed a lower unsaturation index than the selectively bred animals, there was no effect of location on the lipid remodelling. This result coincided with low genetic differentiation among hard

clams from the five groups. Interestingly, levels of 20:5n-3, 20:4n-6 and 22:6n-3, three fatty acids that need to be obtained from the diet, were generally lower in the environment compared to that in hard clams, thus suggesting some mechanisms for the selective incorporation of these fatty acids in hard clams.

2.2 Introduction

In poikilothermic animals, temperature changes usually induce a remodelling of the membrane lipid composition to counteract the effect of temperature on membrane order. This phenomena is often referred as “homeoviscous adaptation” (HVA, Sinensky 1974, Hazel 1995, Hayward *et al.* 2007). Remodelling of membrane lipids usually involves changes in phospholipid head groups, acyl-chain composition and cholesterol content (Hazel & Williams 1990). Previous studies on rainbow trout showed that exposure to low temperatures led to rapid and transient changes in phospholipid head groups and monounsaturated fatty acids (MUFA) of kidney plasma membranes, whereas polyunsaturated fatty acids (PUFA) increased gradually during cold acclimation (Hazel & Landrey 1988a, 1988b). In juvenile hard clams, *Mercenaria mercenaria*, an early transient increase in the phospholipid to sterol ratio is thought to be a short-term adjustment to a lowering of environmental temperatures whereas the later increase in PUFA is viewed as a long-term adjustment to winter temperature (Pernet *et al.* 2006).

Intraspecific variations in membrane lipid remodelling have been reported in hard clams, *Mercenaria mercenaria*, and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Pernet *et al.*

2006, Pernet *et al.* 2008). For example, the phospholipid to sterol ratio in wild hard clams increased transiently with the lowering of temperature whereas it remained constant in the selectively bred *M. mercenaria* var. *notata* (Pernet *et al.* 2006). Therefore, the capacity for adjusting the phospholipid to sterol ratio in response to environmental temperature may have been lost during the selection for fast-growing hard clams. Alternatively, the lipid remodelling that normally occurs during a decrease in temperature may vary as a function of latitude in ectothermic animals, reflecting local adaptation to environmental temperature.

The hard clam *M. mercenaria* is widely distributed from the Gulf of St. Lawrence (Baie des Chaleurs, NB, Canada) to the Florida Keys (USA). At the northern distribution limit, *M. mercenaria* is erratically distributed in warm shallow bays or estuaries. Adult hard clams from Canada are genetically distinct from those collected in southernmost locations in the US (Dillon & Manzi 1992). The distribution pattern in northern locations and the genetic population structure of hard clams along the Atlantic coast of North America together suggest that local adaptation may occur in *M. mercenaria*.

Our present investigation examines lipid remodelling in gill of adult hard clams from different locations and varieties exposed to declining temperature. Briefly, wild hard clams from four locations in Atlantic Canada and the selectively bred *M. mercenaria* var. *notata* were held at an aquaculture growout site located at the northern limit of the species' distribution in the Gulf of St. Lawrence from August to December 2006. Over the course of this study, hard clams were exposed to a gradual lowering in temperature from ~23°C to –

1°C over 4 months during which gills were sampled for lipid class and fatty acid analyses. The underlining premise of this study is that hard clams from northern locations show a much more pronounced lipid remodelling compared to that occurring in clams from southern locations, where temperatures are more stable (Fig. 2.1, see Bricelj *et al.* 2007 for temperature profiles in the Gulf of St. Lawrence). Hard clams from the five groups were characterized genetically to investigate whether different patterns in lipid remodelling are related to their genetic characteristics.

Unlike studies that only focus on the thermal effects on membrane lipids, we also examined the dynamics of dietary lipids available in the environment. In marine bivalves, PUFA such as 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 are essential for sustaining optimal growth (Langdon & Waldock 1981, Webb & Chu 1983 for review). The biosynthetic production of these PUFA is insufficient to satisfy the nutritional requirements of bivalves, so they need to be obtained pre-formed from the diet. The comparison of PUFA between clam tissues and the environment allows one to determine if the increase in the proportion of long-chain PUFA that normally occurs during a temperature decrease is an active regulatory mechanism or a reflection of changes in the clams' food.

2.3 Material and methods

2.3.1 Animals

Wild hard clams *M. mercenaria* used in this study were collected at three locations in the northern limit of the species' distribution in the Gulf of St. Lawrence (Canada), namely

Tabusintac (Tb, 47°27'N; 65°00'W) Bouctouche (Bo, 46°49'N; 64°67'W), and Tatamagouche (Tm, 45°76'N; 63°35'W) (New Brunswick, Canada), and at one location in southern Canada at St. Mary's Bay (St, 44°56'N; 65°85'W) in the Bay of Fundy (Nova Scotia) (Fig. 2.1). *Mercenaria mercenaria* var. *notata* (No) resulted from a selective breeding program to distinguish it from wild stock and to develop a more rapidly growing animal (Chanley, 1961). In 1997, a sample of 60 adult hard clams from the Aquaculture Research Corporation in Dennis, Massachusetts, USA was imported to the Eilerslie Shellfish Hatchery in Prince Edward Island (PEI, Canada). The F₁ generation was placed at grow-out sites to assess the performance of the variety *notata* in the field for 5-years and was then recovered to produce the F₂ in 2003. These clams were then maintained at an aquaculture growout site located at Vernon (PEI, Canada, 46°12'N; 62°91'W) for ~4 years. The *notata* adult clams in the present study belong to the same generation as the juveniles used in Pernet *et al.* (2006). In the Gulf of St. Lawrence, seawater reaches temperature as high as 23-26°C during the summer and stabilizes at -1°C for 3 months during the winter. In St Mary's Bay, seawater temperature is only 15°C during the summer and varies between -1°C and 2°C during the winter (Bricelj *et al.* 2007).

Hard clams were transported to the Coastal Zone Research Institute (CZRI, Shippagan, New Brunswick, Canada) where they were held for a maximum of 2 weeks in a 630 L tank continuously supplied with sand-filtered (12 mm) seawater. Clams from each location were screened for pathology and parasites by histology (n = 30 clams per location and variety). Only a high prevalence (64%) of rickettsia-like organisms, a pathogen

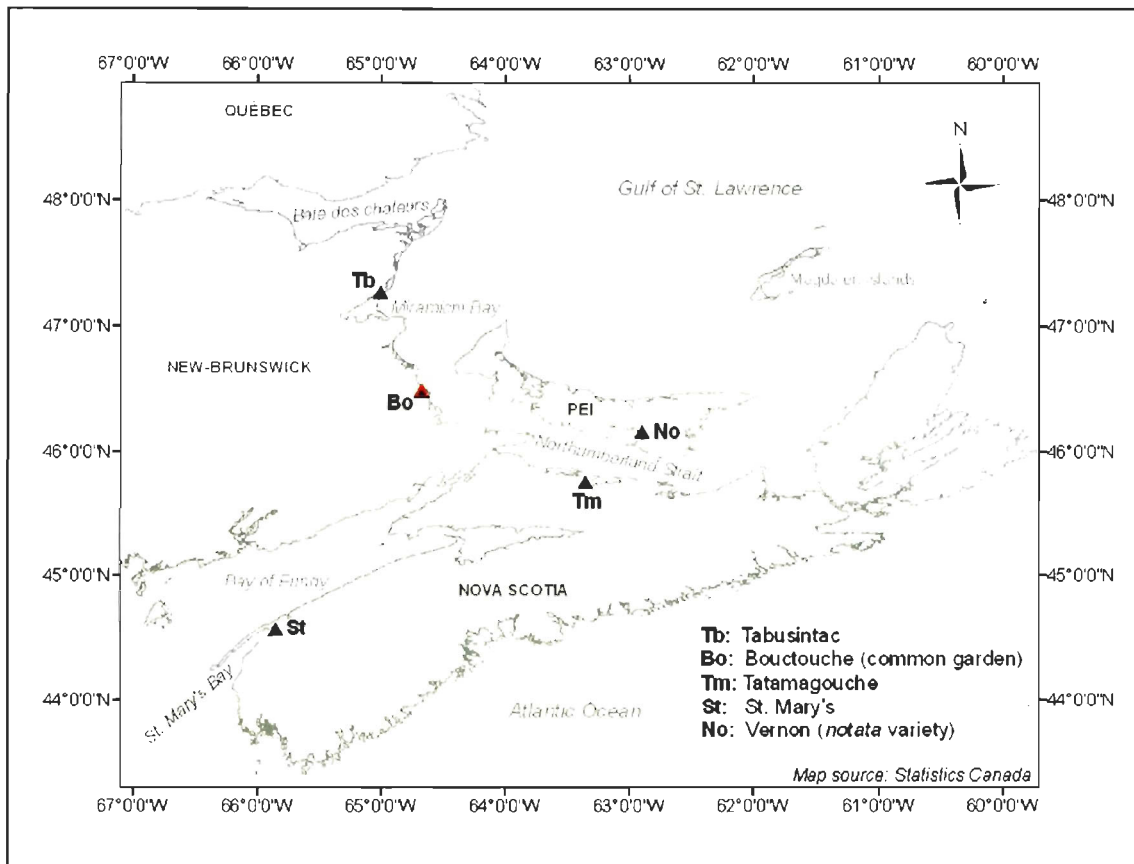


Figure 2.1 Map of Eastern Canada showing the study sites. The red triangle (Bo) represents the site of the common garden (Bouctouche).

from Atlantic Canada and not considered as a disease threat (McGladdery et al. 1993), was detected in clams irrespective of their origin or variety. In parallel, some specimens were measured to the nearest 0.1 mm, dissected and sampled for genetic analysis ($n = 60$ clams per location and variety). The average shell length was 49.9 mm and the difference in shell length between the biggest (T_m) and the smallest (T_b) clam was $\sim 29\%$. The remaining clams were marked with bee tags before being placed in the field.

2.3.2 Experimental design

Hard clams were transferred on 10 August 2006 to Bouctouche, NB, the northern distribution limit of this species (Fig. 2.1). Twenty-five hard clams from each location and variety were placed in 15 quadrats (125 clams per quadrat, dimensions: $0.8\text{ m} \times 0.8\text{ m} \times 0.2\text{ m}$ deep) at a density of 195 clams m^{-2} . Each quadrat was buried in the upper subtidal zone and covered with predator-proof mesh (23.8 mm mesh size) that was held afloat with buoys. The replicated quadrats were at least 30 cm deep at low tides. Three clams per location and variety were sampled in three randomly chosen quadrats on each sampling date: 22 August, 18 September, 13 October, 11 November and 8 December 2006. Each clam was measured and carefully dissected to collect $\sim 100\text{ mg}$ wet mass of gill, which were stored at -80°C in lipid-free amber glass vials with Teflon-lined caps under nitrogen in 1-ml dichloromethane for later determination of lipid composition. In addition, seston and sediments collected in each quadrat were also sampled for lipid analyses.

2.3.3 Environmental parameters

Seston was sampled by means of a 2 L horizontal water sampler from Wildco (Buffalo, NY, USA). The water intake was located ~2 cm from the bottom. Each sample was filtered on a 150 µm mesh size brass sieve and then collected on Whatman GF/F filters pre-combusted at 480°C. Filters were stored at -80°C in lipid-free amber glass vials with Teflon-lined caps under nitrogen in 1-ml dichloromethane for later determination of lipid composition. Sediments were sampled with a steel cylinder (dimensions: 3.6 cm diameter × 10.8 cm height) and the whole sample was stored at -20°C in lipid-free amber glass vials until lipid extraction. Temperature was recorded every half hour with a 8-bit Minilog-TR data logger from Vemco (Shad Bay, Nova Scotia, Canada) at Bouctouche from August to December 2006. The data logger was anchored at a depth of 2 cm into the sediment.

2.3.4 Laboratory analysis

2.3.4.1 Genetics

A small piece of muscle tissue was sampled from 60 clams from each location and variety. The samples were stored at -80°C at CZRI for later electrophoretic analyses of enzymes as previously described (Tremblay *et al.* 1998). Briefly, ~0.2 g of muscle was homogenized in an approximately equal volume of homogenization buffer (0.2 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, with 30% sucrose, 1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% NAD, 5 mmol L⁻¹ dithiothreitol and 1 mmol L⁻¹ phenylmethylsulfonyl fluoride), centrifuged at 15 000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant applied to a horizontal cellulose acetate gel (Hebert & Beaton, 1989). Seven allozyme loci were analyzed: phosphate glucose isomerase (*PGI**,

EC 5.3.1.9), phosphoglucomutase (*PGM**, EC 5.4.2.2), mannose phosphate isomerase (*MPI**, EC 5.3.1.8), pyruvate kinase (*PK**, EC 2.7.1.40), fumarate hydratase (*FUM**, EC 4.2.1.2), isocitrate dehydrogenase (*IDH**, EC 1.1.1.42) and leucyl aminopeptidase (*LAP**, EC 3.4.11.1). Alleles were named A, B, etc., in order of electrophoretic mobility, such that the slowest allele was called A. As a standard, a mixture of individuals containing all alleles present at each locus was used to identify genetic characteristics. Only one allele was observed at the loci *MPI**, *FUM** and *IDH** (monomorphic), these loci are not considered further.

2.3.4.2 Lipid classes

Lipids were extracted following the method of Folch *et al.* (1957). Sediment was sonicated in dichloromethane-methanol-water (8:4:3 v/v/v), centrifuged, and the organic layer was removed. This procedure was repeated five times and the organic layers pooled (Copeman & Parrish 2003). Once extracted, lipids were spotted onto S-III Chromarods (Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan) and separated into aliphatic hydrocarbons, sterol and wax esters, ketones, triacylglycerols, free fatty acids, free fatty alcohol, free sterols, diacylglycerols, acetone mobile polar lipids and phospholipids (Parrish 1999). Chromarods were scanned by a flame ionization detection system (FID; Iatroscan Mark-VI, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) and chromatograms were analyzed using integration software (Peak Simple version 3.2, SRI, Torrance, CA, USA). Fatty acid methyl esters (FAME) from total lipids (mainly phospholipids) were prepared using 2% H₂SO₄ in methanol (Lepage & Roy 1984). Gas chromatograph parameters and the procedure for FAME identification and analysis were previously described (Pernet *et al.* 2007b).

2.3.4.3 Fatty acids

Fatty acids methyl esters (FAME) were prepared using 2% H₂SO₄ in methanol (Lepage and Roy, 1984). FAME were run on an Varian CP3900 gas chromatograph equipped with a ZB-Wax fused-silica capillary column (20 m × 0.18 mm ID × 0.18 μm film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Helium was used as the carrier gas (flow velocity 2 ml min⁻¹). FAME were injected at 250°C at a 1 to 10 split ratio. The temperature ramp was 140°C for 0.2 min, followed by an increase of 40°C min⁻¹ to 170°C, followed by an increase of 4°C min⁻¹ to 185°C, and finally by an increase of 2°C min⁻¹ to 230°C. The detector was maintained at 260°C. FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37 component FAME Mix, PUFA-3 and menhaden oil; Supelco Bellefonte, PA, USA) and quantified with nonadecanoic acid (19:0) as an internal standard. Chromatograms were analyzed using the Galaxie chromatography data System (version 1.9.3.2, Varian, Mississauga, ON, Canada).

2.3.5 Statistical analysis

Genetic data were used to estimate the allelic frequencies and the observed and expected heterozygosities using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1998). Adequacy of genotypic proportions to HWE expectations and pairwise allelic frequencies comparisons were tested by an exact probability-test using the software GENEPOP 4.0 (Rousset, 2007). The fixation index F_{is} and the index of genetic differentiation F_{st} were calculated using methods of Weir and Cockerham (1984) implemented in GENEPOP 4.0 (Rousset, 2007). The F_{is} value was not reported when a dominant allele had a frequency > 0.9 because of

the predominant influence of rare alleles. The P -values associated with H_0 ($F_{is} = 0$, $F_{st} = 0$) for F_{is} at each or all loci and for F_{st} among all locations or pairwise locations comparisons were determined by 1000 permutations alleles (F_{is}) or genotypes (F_{st}) using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1998). Significance levels for statistical tests were adjusted according to the sequential Bonferroni procedure (Rice, 1989).

Two-way split-plot analyses of variance (ANOVAs) were conducted to determine differences in lipid composition as a function of origin of clams (location and variety) and sampling time. The unit of replication was the quadrat in which the clams from different locations and varieties were placed ($n = 3$ for each time level). The main plots were time levels and sub-plots were origin of clams (location and variety). Dependant variables were the phospholipid to sterol ratio, the unsaturation index and the major polyunsaturated fatty acids (PUFA), namely 22:6n-3, 20:5n-3 and 20:4n-6. Here we used a general linear model repeated ANOVAs. The need for repeated measurements arose because clams from different locations and varieties were placed in the same experimental unit (quadrat). These terms were combined with the covariance structure of the matrix to take into account spatial dependence (SAS Institute, 2002).

Where significant differences were detected, Tukey's multiple comparison test was used. Residuals were tested for normality using Kolmogorv-Smirnov test. When necessary, data were $\log+1$ transformed to achieve normality or homogeneity of variance.

Homogeneity of variance was determined with Levene's test. Statistical analyses were carried using SAS (ver. 8.1, SAS Institute, Cary, NC).

2.4 Results

2.4.1 Temperature measurements

Seawater temperature decreased from 23°C to -1°C over the study period (Fig. 2.2). Overall, clams experienced a decrease in temperature of $\sim 0.2^{\circ}\text{C day}^{-1}$. However, a marked increase in daily temperature from 3 to 11°C occurred between 8 and 18 November.

2.4.2 Genetic characterization

Allele numbers ranged from three at *PGI** and *PGM** loci to four at *PK** and *LAP** loci (Table 2.1). Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (F_{is} values) were observed at the *PK** ($p = 0.01$) locus for Bo location due to an excess in heterozygotes. An inverse pattern was observed at the *LAP** with significant F_{is} irrespective of location and varieties ($p < 0.001$) due to a deficit in heterozygote (Table 2.1). Multilocus significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were obtained for each location or variety (heterozygote deficiency, $p < 0.001$) which is mainly attributable to the *LAP** locus.

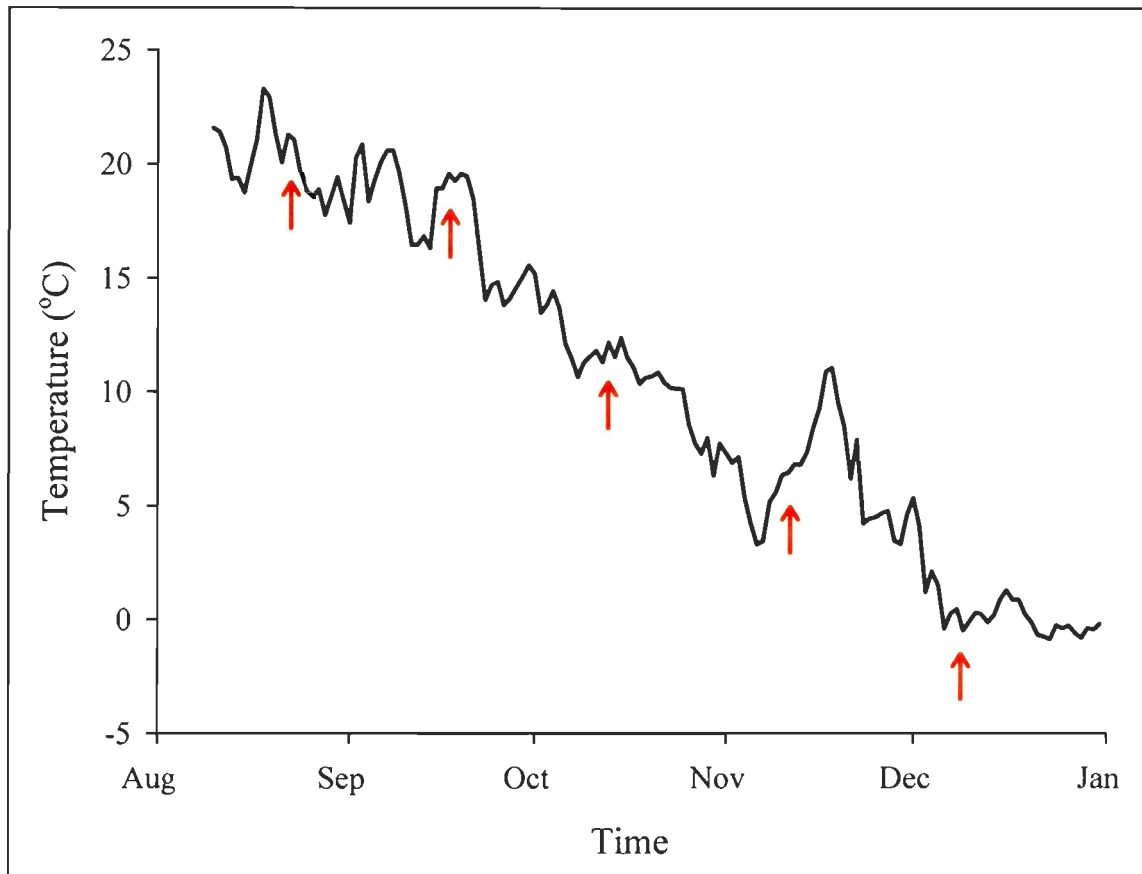


Figure 2.2 Temperature monitoring in the common garden site (Bouctouche) from August 11th to December 8th 2006. The red arrows indicate sampling times for animals, seston and sediment.

Tableau 2.1 Size (mean \pm s.e.m.), allele frequencies, heterozygosity (observed and expected) and F_{is} value at four loci of four locations of *Mercenaria mercenaria* and the selectively bred *M. mercenaria* var. *notata*.

	Tabusintac	Bouctouche	Tatamagouche	St. Mary's	Variety <i>notata</i>
Locus/Allele					
N	59	58	60	59	57
<i>PGI</i>					
A	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
B	0.94	0.89	0.93	0.92	0.89
C	0.05	0.08	0.07	0.08	0.11
Ho	0.08	0.16	0.12	0.14	0.19
He	0.11	0.20	0.14	0.16	0.20
F_{is}	0.25	0.25	0.17	0.14	0.06
<i>PGM</i>					
A	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01
B	0.97	0.97	0.96	0.89	0.91
C	0.03	0.01	0.01	0.09	0.08
Ho	0.68	0.52	0.83	0.22	0.18
He	0.66	0.51	0.80	0.20	0.16
F_{is}	-0.02	-0.01	-0.03	-0.10	-0.08
<i>PK</i>					
A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
B	0.73	0.61	0.76	0.71	0.80
C	0.27	0.37	0.23	0.29	0.18
D	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00
Ho	0.47	0.71	0.45	0.37	0.33
He	0.40	0.49	0.37	0.41	0.33
F_{is}	-0.19	-0.44	-0.21	0.10	-0.01
<i>LAP</i>					
A	0.13	0.07	0.10	0.11	0.12
B	0.46	0.33	0.51	0.55	0.51
C	0.35	0.50	0.33	0.32	0.31
D	0.07	0.10	0.07	0.02	0.06
Ho	0.20	0.26	0.23	0.20	0.09
He	0.65	0.63	0.62	0.58	0.63
F_{is}	0.69	0.59	0.63	0.65	0.86

All Loci

Ho	0.21	0.29	0.22	0.23	0.20
He	0.31	0.34	0.30	0.34	0.33
<i>F</i> _{is}	0.33	0.15	0.28	0.32	0.41

The n represent sample size; H_o , the observed proportion of heterozygotes per locus; H_e , Hardy–Weinberg proportions of heterozygotes and F_{is} , deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Loci that show significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium and F_{is} after sequential Bonferroni correction are in bold.

Significant differences in allelic frequencies were observed at the *PK** locus for Bo compared to No ($p < 0.001$), and at the *LAP** locus for Bo compared to No ($p < 0.001$) and St ($p = 0.004$). *Fst* estimates were computed among locations and varieties and significant genetic differentiation was observed at $p < 0.001$ with value of 0.011. Pairwise differences in *Fst* values were significant only when comparing Bo to No (0.044, $p = 0.002$) and St (0.033, $p = 0.002$) (Table 2.2).

2.4.3 Lipids classes

Lipid classes detected in gills of hard clams in this study were sterols, acetone-mobile polar lipids and phospholipids. Minor amounts of triglycerides (2.8%) were occasionally detected and are not discussed further. Acetone-mobile polar lipids, a lipid class that includes photosynthetic pigments, glycolipids and monoacylglycerols, showed no consistent pattern over time in clams from each location or variety (data not shown). Time and variety showed interactions in their effect on the phospholipid to sterol ratio, a variable generally considered as an indicator of membrane fluidity (Fig. 2.3). In August, the phospholipid to sterol ratios of hard clams originating from the northern locations, Tb and

Tableau 2.2 Index of genetic differentiation between *Mercenaria mercenaria* from different locations and the *notata* variety at four allozyme loci

Variety and locations	1	2	3	4	5
1. <i>Vernon (notata variety)</i>	0	NS	NS	0.002	NS
2. <i>St. Mary's</i>	0.000	0	NS	0.002	NS
3. <i>Tatamagouche</i>	0.000	0.000	0	0.007	NS
4. <i>Bouctouche</i>	0.044	0.033	0.031	0	0.037
5. <i>Tabusintac</i>	0.000	0.000	0.000	0.017	0

*F*_{st} values are below the diagonal with the level of significance above the diagonal.

NS indicates *P* values > 0.05 and *P* values significant after sequential Bonferroni correction procedure ($k_i = 10$) are in bold.

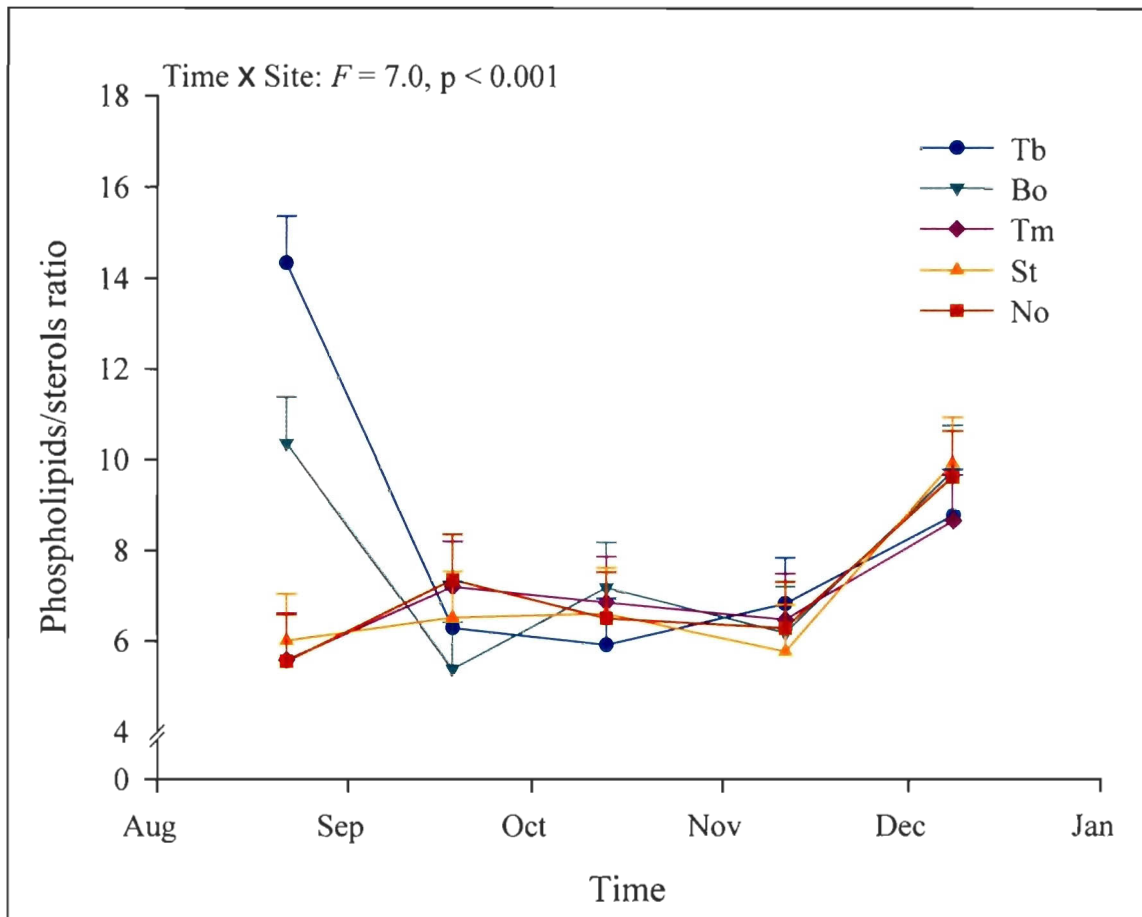


Figure 2.3 Variation of the phospholipid to sterol ratio in gills of *Mercenaria mercenaria* as a function of time and sites (mean \pm s.e.m., $n = 3$).

Bo, were respectively 2.5 and 1.8 times higher than those from southern locations (Tm and St) and the variety *notata* (all pairwise comparison, $p < 0.001$). In December, the phospholipid to sterol ratio of clams increased significantly for Bo ($p = 0.001$), Tm ($p = 0.040$), St ($p = 0.002$), and No ($p = 0.002$) compared to levels recorded in November (Fig. 2.3).

2.4.4 Fatty acids

Major fatty acids separated from the total lipid extracts of gills were 16:0 (17.6%), 22:6n-3 (16.5%), 22:2 non-methylene interrupted fatty acids (8.5%), 20:5n-3 (7.1%), 20:4n-6 (5.7%) and 18:0 (4.9%), which together accounted for 60% of the total fatty acids. The unsaturation index, which is the number of double bonds per 100 acyl chains, increased significantly, by 8.8%, in hard clams from September to November when the temperature decreased from $\sim 16^{\circ}\text{C}$ to 3°C , and remained constant thereafter. The unsaturation index was generally lower in wild hard clams compared to that of the selectively bred hard clams irrespective of sampling time (Fig. 2.4A). Variations in the unsaturation index were mainly attributable to changes in PUFA, which also varied as a function of time and variety of clam (Fig. 2.4B). Individual PUFA varied as a function of locations and variety: there was no consistent pattern during the entire study period for 20:4n-6, which remained constant at $\sim 5.5\%$ (Fig. 2.4C), whereas 20:5n-3 and 22:6n-3 increased from August to October and November, when these two fatty acids attained their respective plateaux (Fig. 2.4D and 2.4E). The selectively bred hard clams showed higher levels of 20:4n-6 and 20:5n-3 than

wild animals (Fig. 2.4C and 2.4D), whereas 22:6n-3 showed a trend for increasing values in hard clams from northern to southern locations (Fig 4E).

The major fatty acids detected in the seston differed from those of hard clams, with the following percentages: 16:0 (18.3%), 16:1n-7 (10.9%), 20:5n-3 (8.6%) and 18:4n-3 (5.6%); the sediments were characterized by 16:1n-7 (25.4%), 16:0 (20.1%), 14:0 (5.8%) and 18:1n-7 (5.1%). The unsaturation index and the level of PUFA in hard clams were higher than those of the seston and the sediment (Fig 4A and 4B), and these differences were mainly attributable to 20:4n-6 and 22:6n-3 (Fig 4C and 4E). In contrast, levels of 20:5n-3 in hard clams were rather similar to that of the seston (Fig 4D). The unsaturation index and the level of PUFA in the seston and the sediment showed only minor changes during the entire study period. It is noteworthy that the sediment showed a very low level of 22:6n-3 (<2%) compared to that occurring in the seston, where 22:6n-3 varied between 3.5 to 5.5% as a function of time.

2.5 Discussion

The phospholipid to sterol ratio in hard clams from northern locations (Tb and Bo) was initially higher than that of animals from southern locations (Tm and St) and the variety *notata*. Cholesterol is an essential component in animal membranes, with multiple effects on their physical properties including membrane fluidity, phase behaviour, thickness and permeability (Crockett 1998). Some positive correlations between membrane cholesterol content, as determined by the cholesterol to phospholipid ratio, and acclimation

Figure 2.4 Unsaturation index (A) and mol % of polyunsaturated fatty acids (PUFA; B), arachidonic acid (20:4n-6; C), eicosapentaenoic acid (20:5n-3; D) and docosahexaenoic acid (22:6n-3; E) in gill tissues of hard clams as a function of time and origin of clams (left and center panels) and in the environment (seston and sediment; right panels). The unsaturation index is calculated as the sum of the mol percentage of each unsaturated fatty acid multiplied by the number of double bounds within that fatty acid. Data from different locations and variety or sampling time were pooled together when the effect was not significant (mean \pm s.e.m., n = 3).

temperature have been reported in several tissues of rainbow trout (Robertson & Hazel 1995). A widely accepted notion is that cholesterol stabilizes membranes, i.e., it increases the order of the surrounding acyl chains in membranes in the fluid phase (Crockett 1998). Although membrane fluidity was not measured, the higher phospholipid to sterol ratio in *M. mercenaria* from northern locations compared to that of animals from southern locations at the onset of the experiment suggests a specific role for sterols in the membrane's homeoviscous response as a function of location and variety. However, these differences remain unclear.

In contrast to our previous work on juvenile hard clams, where we observed a transient increase in the phospholipid to sterol ratio concomitantly with a lowering of temperature between August and October, likely as a short-term adjustment to a lowering of environmental temperatures (Pernet *et al.* 2006), the phospholipid to sterol ratio remained constant in adults exposed to a similar decrease in temperature. Here we hypothesize that the transient increase in the phospholipid to sterol ratio in response to environmental temperature was typical of juveniles. It has been suggested that the use of cholesterol as a modulator may not require any expenditure of ATP or reduced cofactors (Crockett 1998). Therefore, modulation of the phospholipid to sterol ratio probably provides a metabolically less expensive mechanism of membrane remodelling than *de novo* synthesis of PUFA-rich phospholipids. Although speculative, regulation of the phospholipid to sterol ratio may represent an alternative to the selective incorporation of

essential PUFA in small-sized juveniles for which aerobic energy expenditures on a weight-specific basis are generally higher than those of bigger-sized adults (Koehn *et al.* 1989).

In contrast, the phospholipid to sterol ratio increased between November and December while the temperature decrease from 6 to 0°C, which is consistent with a role for cholesterol in the membrane's homeoviscous response. Given that modulation of the phospholipid to sterol ratio requires less energy than does the modification of fatty acid composition, this mechanism may be viewed as a way of saving energy. It is noteworthy that hard clams were characterized by low levels of storage TAG in their digestive gland (<5% of total lipids; unpublished data), thus suggesting that the energy reserves in these animals were low.

The unsaturation index in hard clam gills increased from September to November as the seawater temperature decreased from 21°C to 6°C irrespective of location or variety, as previously reported for the soft tissues of juveniles (Pernet *et al.* 2006). The increase in the unsaturation index is attributable to changes in PUFA and more particularly to changes in 22:6n-3 and 20:5n-3. Although we did not measure membrane fluidity, these alterations in membrane lipid composition during cold acclimatization were consistent with membrane HVA. In several bivalve species, 22:6n-3 and 20:5n-3 are negatively correlated with environmental temperature (Hall *et al.* 2002, Pernet *et al.* 2006, Pernet *et al.* 2007a, Pernet *et al.* 2007b, Pernet *et al.* 2008).

The unsaturation index and main PUFA were lower in wild hard clams from Canada compared to those of the selectively bred *M. mercenaria* var. *notata*, which originates from Massachusetts (USA), as previously observed in juveniles (Pernet *et al.* 2006). In this previous work, the lower unsaturation index in wild animals coincided with lower metabolic requirements, as predicted by Hulbert's theory of membranes as pacemakers of metabolism (Hulbert & Else 1999). It is therefore likely that differences in metabolic requirements between strains of hard clam persist in adults. Differences in the unsaturation index and fatty acid composition between wild and selectively bred hard clams may reflect a biogeographical pattern, the selection for fast-growing animals, or both, as these two variables were confounded. It is noteworthy that there was no alteration in the lipid fatty acid composition in hard clams from the different locations tested in this study.

Interestingly, the unsaturation index and levels of long-chain PUFA in hard clam gills were markedly higher than those observed in both the seston and the sediment. Furthermore, the unsaturation index in gills increased markedly with a lowering in temperature whereas it remained constant in the sediment and changed only slightly in the seston. Although certain long-chain PUFA such as 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 are essential in bivalves and need to be obtained from the diet, these results suggest that the fatty acid composition of membrane lipids in bivalves is strongly regulated. Selective incorporation or elimination of certain fatty acids likely occurs in membrane lipids in bivalves as has been previously suggested in other studies (e.g., Delaunay *et al.* 1993, Soudant *et al.* 1998, Pernet *et al.* 2005, Pernet *et al.* 2008). This suggests that the increase

in long-chain PUFA in clams that occurs during a temperature decrease is an active regulatory mechanism that remains somewhat independent of the food.

The hard clams used in our study showed a low level of genetic diversity, as was previously reported for *PGI**, *LAP** and *PGM** for the same species by Dillon and Manzi (1992). Hard clams from Bo showed differences in their allelic frequencies for *LAP** when compared to animals from No and St, the southernmost locations. Spatial variations in the *LAP** allele frequency typically correlate with environmental salinity (e.g., Koehn *et al.* 1980a), which suggests that animals from Bo may be differentially adapted to different salinities compared to those from St and No. Hard clams from Bo showed a heterozygote excess for *PK** whereas it is generally accepted that bivalves display heterozygote deficiencies (Zouros 1987). This unusual excess in heterozygotes for *PK** may reflect either a selection mechanism that occurs at Bo or a Wahlund effect.

Overall, there was a low level of genetic differentiation among the five groups of clams tested in this study. Significant genetic differentiation was detected between hard clams from Bo and No and Bo and St. Although many marine species with high dispersal often reveal little or no genetic differentiation (Palumbi 1994, Bohonak 1999), many cases of genetic divergence have been observed in invertebrates (Burton 1983). Where divergence among populations is observed, reduced dispersal capabilities due to abiotic or biotic barriers or natural selection have usually been invoked to explain the pattern of

genetic variation (Burton 1983). Factors that could possibly explain the differentiation of the Bo location compared to No and St remain unidentified.

In conclusion, this study confirms previous findings: hard clams, like other bivalve species, change their lipid composition in a direction consistent with HVA when environmental temperatures decrease. In addition, the unsaturation index in wild hard clams was lower than that of the selectively bred variety, as previously observed in juvenile hard clams (Pernet *et al.* 2006). Therefore, differences in the unsaturation index between strains of hard clam persisted in adults. For the first time, this study shows that the increase in long-chain PUFA in clams that occurs during a temperature decrease is an active regulatory mechanism that remains somewhat independent of available food. Finally, hard clams collected in Atlantic Canada showed no consistent differences in the remodelling of lipids that normally occurs during a decrease in temperature; this coincides with the low genetic differentiation index among animals from the four selected locations. The latitudinal gradient used in this study was likely not large enough to detect major genotypic and phenotypic differences.

2.6 Acknowledgements

The authors are grateful to Catherine Gaudreau (ISMER/UQAR), Aurélie Licois (IRZC), Angelica LeBlanc and Jean-François Mallet (DFO) for their excellent technical assistance on the field. Thanks are also addressed to Eve-Julie Arsenault (IRZC) for her constant help throughout the experiment, Josée Duguay and Claude Pelletier (IRZC) for

their assistance with lipid analysis and Sonia Belvin (ISMER/MAPAQ) for histopathological analysis. Finally, the authors are also grateful to Alain Caron (UQAR/ISMER) for the help provided in the statistical analyses. This study was supported by grants from an NSERC discovery and AIF to F.P.

CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE

3.1 Bilan et avancement des connaissances

Le but de cette étude était d'examiner la relation entre la variabilité des profils de remodelage des lipides membranaires et l'origine de *M. mercenaria* durant une diminution de température. Durant la baisse de température automnale, les profils de remodelage des lipides membranaires étaient similaires pour les individus sauvages et la variété *notata*. L'indice d'insaturation augmentait chez tous les animaux jusqu'à ce qu'ils cessent de s'alimenter. À des températures inférieures à 6°C, le ratio PLs / stérols augmentait pour la plupart des animaux. Ainsi, cette étude semble mettre en évidence une séquence du mécanisme de remodelage des lipides membranaires dans les branchies qui semble liée à la physiologie de l'espèce. De plus, cette étude rapporte que le contenu en AGs des membranes de branchies est strictement régulé puisqu'il ne reflète pas les proportions en AGs du seston ou du sédiment. Finalement, cette étude nous permet de conclure qu'il y a peu de différenciation génétique entre les palourdes provenant de différents sites à la limite nordique de l'aire biogéographique et que les différences observées (Bo comparé à No et St) à l'aide des indicateurs de différenciation génétique utilisés (allozymes) ne sont pas corrélées avec les profils de remodelage des lipides membranaires.

3.2 Limites de l'étude et perspectives

Au mois d'août, les animaux des deux sites les plus près de la limite de distribution nordique avaient des ratios PLs / stérols plus élevés que les animaux des autres sites ou de la variété *notata*. Puisque la température est relativement stable durant cette période, les différences entre les ratios PLs / stérols ne semblent pas être associées à la théorie de l'adaptation homéovisqueuse des membranes. Avant le début de l'expérience, les animaux ont été maintenus plus d'une semaine dans un bassin alimenté en eau partiellement filtrée, il donc est peu probable que les différences de ratio PLs / stérols observées soient causées par une alimentation différente dans leur baie respective. Dans le cadre d'une étude future, il serait intéressant d'étudier les variations en contenu lipidique de différents organes en fonction de la physiologie de l'espèce durant l'été afin d'expliquer les différences entre les ratios PLs / stérols observés dans notre étude.

Tous les animaux avaient une faible proportion de TAGs dans la glande digestive tout au long de l'expérience. Pour la plupart des animaux, les TAGs sont une source majeure d'énergie (Lehninger *et al.*, 2005). Une faible quantité de réserves énergétiques pourrait être un problème lors de l'hivernage lorsque la palourde cesse de se nourrir et ceci pourrait soutenir l'hypothèse des périodes d'extinction et recolonisation fréquentes ayant lieu à la limite nordique de cette espèce (pour revue voir Hilbish, 2001). Cependant, d'autres sources de combustibles énergétiques sont disponibles dans d'autres tissus (voir section 1.3.1). Une étude a rapporté qu'en période d'anaérobie *M. mercenaria* utilise du glycogène et peut survivre jusqu'à 18 jours lors d'épisodes à basse température (-1° à 6°C)

(Loosanoff, 1937, tiré de Eversole, 2001). De plus, Ansell et Lander (1967) ont montré lors de la période hivernale que la réduction de la masse sèche des tissus de l'animal coïncidait exactement avec une diminution identique en réserves glucidiques. L'entreposage d'une molécule pouvant être utilisée lors de période anaérobie pourrait être un avantage durant l'hiver. Ainsi, lorsque les animaux sont soumis à des températures sous celles de leur optimum thermique, une augmentation du taux métabolique standard et une diminution de la quantité d'oxygène disponible dans les tissus sont généralement observés (Pörtner, 2002). En résumé, il serait intéressant d'évaluer la teneur en glycogène des muscles de cette espèce en préparation à l'hivernage afin d'avoir un portrait plus juste de leur potentiel énergétique. Ceci permettrait d'évaluer les réserves énergétiques globales et peut-être d'expliquer les mortalités hivernales importantes des stades juvéniles associées à cette espèce.

Bien que de septembre à décembre nos résultats soient en accord avec la théorie de l'adaptation homéovisqueuse, les profils de remodelage des lipides membranaires sont des indicateurs indirects des variations de désordre membranaire. Un exemple de mesure directe est la mesure de l'anisotropie d'une sonde fluorescente (DPH, diphénylhexatriène) au sein de la membrane qui est utilisée afin de quantifier le désordre (Shinitzky et Barenholz, 1978). Chez les bivalves, l'étude de Hall et coll. (2002) est la seule qui utilise cette technique et évalue l'impact d'un changement de température sur la fluidité membranaire. Plusieurs études chez les poissons ont observé l'effet d'un changement de température sur la fluidité membranaire à l'aide d'une sonde membranaire (Hazel *et al.*,

1998; Logue *et al.*, 2000) ce qui permet d'inférer plus aisément les variations de désordre membranaire lorsque des variations des profils d'AGs sont observés. L'utilisation de la sonde DPH est cependant déconseillée puisque celle-ci se déplace aléatoirement dans toutes les sections lipidiques de la cellule, sans spécificité pour la membrane, donnant un mince aperçu du désordre membranaire (Berlin et Fera, 1977; Johnson et Nicolau, 1977; Grunberger *et al.*, 1982). Par la suite la sonde TMA-DHP (1-(4-triméthylammonium)-6-phényl-1,3,5-hexatriène) a été produite, mais puisque ses chaînes carbonées ne sont que de 10 carbones, cette dernière pourrait être moins sensible aux modifications au centre de la bicouche de PLs (Kuhry *et al.*, 1985). Actuellement, afin d'évaluer la fluidité membranaire, les sondes utilisées sont soit fluorescente, telle que le bis-phosphatidyléthanamine trifluorométhyl phényldiazirine (DIPETPD) (Delfino *et al.*, 1993), soit radioactive, telle que le L- α -l-palmitoyl-2-oleoyl, [oleoyl- 14 C]-phosphatidylcholine (16:0/18:1-PC) (New England Nuclear, Massachussets, É.-U.). Ces méthodes directes de mesure du désordre membranaire permettraient d'inférer, par la suite, que les variations des profils en AGs sont représentatives des variations de désordre membranaire pour des études chez les bivalves.

Puisque notre étude visait à lier des caractéristiques phénotypiques à des génotypes spécifiques, il aurait été intéressant d'utiliser des indicateurs de diversité génétique qui étaient liés au métabolisme des lipides. L'utilisation des enzymes estérases (protocole disponible Hebert et Beaton, 1993) ou acyltransférases (protocole non disponible) reliées au métabolisme des lipides aurait été intéressante. Les estérases (carboxylestérase 3.1.1.1) catalysent, entre autres, l'hydrolyse du lien ester entre l'AG et le cholestérol dans la

molécule de cholesteryl ester (pour revue voir Satoh et Hosokawa, 2006) qui peut servir de molécule d'entreposage d'énergie chez certains organismes aquatiques (Ackman, 1989). Quant aux acyltransférases, ces dernières catalysent le transfert d'AGs (22 :6n-3 ou 20 :4n-3) dans les PLs (Vance, 2002). Afin de lier les différents profils d'AGs provenant des PLs, il serait donc intéressant de développer un protocole d'identification de diversité génétique pour ces enzymes.

En général, les allozymes sont caractérisés par une faible diversité génétique ce qui pourrait camoufler la structure génétique des populations canadiennes. Plusieurs indicateurs de diversité génétique ont été présentés dans la section d'introduction (1.2.2). Parmi ceux-ci, les marqueurs RFLP ont été utilisés sur de l'ADN mitochondrial de *M. mercenaria* provenant du New Jersey (É.-U.) à la Caroline du Nord (É.-U.) et ont montré une faible différenciation génétique (Brown et Wolfenbarger, 1989 tiré de Hilbish, 2001). L'utilisation des marqueurs AFLP et microsatellites pourraient contribuer à accroître résolution de la structure des populations (voir section 1.2.2). Ainsi, la caractérisation de la structure génétique des populations canadiennes permettrait d'identifier la relation entre les différents sites où *M. mercenaria* est retrouvée et ainsi évaluer l'importance des différentes baies au maintien des populations à la limite nordique de l'aire de répartition de cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackman, R. G.** (1989), Marine biogenic lipids, fats and oils. I: Florida, CRC Press, 462 p.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P.** (2002).
Molecular biology of the cell. New York, Garland, 1616 p.
- Ansell, A. D.** (1961). The functional morphology of the British species of Veneracea (Eulamellibranchia). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **41**(1): 489-515.
- Ansell, A. D. et Lander, K. F.** (1967). Studies on hard-shell clam *Venus Mercenaria* in British waters .3. Further observations on seasonal biochemical cycle and on spawning. Journal of Applied Ecology **4**(2): 425-435.
- Bayne, B. L. et Hawkins, A. J. S.** (1992). Ecological and physiological aspects of herbivory in benthic suspension-feeding molluscs. Dans: Plant-animals interactions in the marine benthos. John, S. J., Hawkins, S. J. et Price, J. H. (Éd.), Oxford, Systematics Assoc. Spec., Clarendon Press, **46**: 265-288.
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. et Bonhomme, F.** (1998). Genetix, logiciel sous WindowTM pour la génétique des populations. Montpellier, France: Laboratoire génome et populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II.
- Berlin, R. D. et Fera, J. P.** (1977). Changes in membrane microviscosity associated with phagocytosis - effects of colchicine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**(3):1072-1076.

- Bohonak, A. J.** (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology* **74**(1): 21-45.
- Bricelj, M. V. et Malouf, R. E.** (1984). Influence of algal and suspended sediment concentrations on the feeding physiology of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology* **84**(2): 155-165.
- Bricelj, M. V., Ouellette, C., Anderson, M., Brun, N.T., Pernet, F., Ross, N. W., et Landry, T.** (2007). Physiological and biochemical responses of juvenile quahogs, *Mercenaria mercenaria*, to low temperatures: potential for mitigation of overwintering mortalities. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2739**: vii + 42 p.
- Brosa, C.** (1997). Biological Effects of Brassinosteroids. *Biochemistry and Function of Sterols*. Parish, E. J. et Nes, W. D. Boca Raton, CRC Press, 278 p.
- Buda, C., Dey, I., Balogh, N., Horvath, L. I., Maderspach, K., Juhasz, M., Yeo, Y. K. et Farkas, T.** (1994). Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(17): 8234-8238.
- Burton, R. S.** (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. *Marine Biology Letters* **4**(4): 193-206.
- Burton, R. S.** (1986). Evolutionary consequences of restricted gene flow among natural-populations of the copepod, *Tigriopus californicus*. *Bulletin of Marine Science* **39**(2): 526-535.

- Burton, R. S. et Feldman, M. W.** (1981). Population genetics of *Tigriopus californicus* .2. Differentiation among neighboring populations. *Evolution* **35**(6): 1192-1205.
- Burton, R. S. et Feldman, M. W.** (1982). Changes in free amino-acid concentrations during osmotic response in the inter-tidal copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* **73**(3): 441-445.
- Burton, R. S. et Feldman, M. W.** (1983). Physiological effects of an allozyme polymorphism - glutamate pyruvate transaminase and response to hyperosmotic stress in the copepod *Tigriopus californicus*. *Biochemical Genetics* **21**(3-4): 239-251.
- Carriker, M. R.** (2001). Embryogenesis and Organogenesis of Veligers and Early Juveniles. Dans: *Biology of the Hard Clam*. Kraeuter, J. N. et Castagna, M. (Éd.), Amsterdam, Elsevier science, 751 p.
- Chanley, P. E.** (1961). Inheritance of shell markings and growth in the hard clams, *Venus mercenaria*. *Proceedings of National Shellfisheries Association*. **50**: 161-169.
- Copeman, L. A. et Parrish, C. C.** (2003). Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Marine Biology* **143**(6): 1213-1227.
- Crockett, E. L.** (1998). Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist* **38**(2): 291-304.
- Delaporte, M., Chu, F. L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J. F. et Soudant, P.** (2007). Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich

in eicosapentaenoic acid. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343**(2): 261-275.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Segueineau, C. et

Samain, J. F. (2006). Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* **41**(6): 567-576.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G.,

Paillard, C. et Samain, J. F. (2003). Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* **206**(17): 3053-3064.

Delaunay, F. (1993). The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **173**(2): 163-179.

Delfino, J. M., Schreiber, S. L. et Richards, F. M. (1993). Design, synthesis, and properties of a photoactivatable membrane-spanning phospholipidic probe. *Journal of the American Chemical Society* **115**(9): 3458-3474.

Dey, I., Buda, C., Wiik, T., Halver, J. E. et Farkas, T. (1993). Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(16): 7498-7502.

- Dillon, R. T. J. et Manzi, J. J.** (1992). Population genetics of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, at the northern limit of its range. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **49**(12): 2574-2578.
- Dufresne, F., Bourget, E. et Bernatchez, L.** (2002). Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*? Molecular Ecology **11**(1): 113-123.
- Eanes, W. F.** (1999). Analysis of selection on enzyme polymorphisms. Annual Review of Ecology and Systematics **30**: 301-326.
- Eble, A. F.** (2001). Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. Dans: Biology of the Hard Clam. Kraeuter, J. N. et Castagna, M. (Éd), Amsterdam, Elsevier science, 751 p.
- Eversole, A. G.** (2001). Reproduction in *Mercenaria mercenaria*. Dans: Biology of the Hard Clam. Kraeuter, J. N. et Castagna, M. (Éd.), Amsterdam, Elsevier Science, 751 p.
- Folch, J., Lees, M. et Stanley, G. H. S.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry **226** (1): 497-509.
- Fraser, A. J.** (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **46**(11): 1868-1873.

- Freeman, S. et Herron, J. C.** (1998). Evolutionary analysis. Upper Saddle River, Prentice Hall, 786 p.
- Gaffney, P. M., Scott, T. M., Koehn, R. K. et Diehl, W. J.** (1990). Interrelationships of heterozygosity, growth-rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **124**(3): 687-699.
- Goad, L. J.** (1978). The sterols in marine invertebrates: composition, biosynthesis, and metabolites. Dans: *Marine natural products*. Scheuer, P. J. (Éd.), New York, Academic Press, **II**: 75-112.
- Grunberger, D., Haimovitz, R. et Shinitzky, M.** (1982). Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labeled with diphenylhexatriene. *Biochimica et Biophysica Acta* **688**(3): 764-774.
- Hall, J. M., Parrish, C. C. et Thompson, R. J.** (2002). Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Plascopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biological Bulletin* **202** (3): 201-203.
- Harry, M.** (2001). Génétique moléculaire et évolutive. Paris, Maloine, 326 p.
- Harte, M. E.** (2001). Systematics and Taxonomy. Dans: *Biology of the Hard Clam*. Kraeuter, J. N. et Castagna, M. (Éd.), Amsterdam, Elsevier Science, 751 p.
- Hartl, D. L.** (2000). A primer of population genetics. Sunderland, Sinauer Associates, 221 p.
- Hartl, D. L. et Clark, A. G.** (2007). Principles of population genetics. Sunderland, Sinauer Associates. 652 p.

- Hayward, S. A. L., Murray, P. A., Gracey, A. Y. et Cossins, A. R.** (2007). Beyond the lipid hypothesis: Mechanisms underlying phenotypic plasticity in inducible cold tolerance. Section du livre: Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks. Vol. **594**, 132-142 p.
- Hazel, J. R.** (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology* **57**: 19-42.
- Hazel, J. R. et Landrey, S. R.** (1988a). Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney I. Headgroup composition. *American Journal of Physiology* **255**(6): R262-R267.
- Hazel, J. R. et Landrey, S. R.** (1988b). Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney II. Molecular species composition. *American Journal of Physiology* **255**(6): R628-R634.
- Hazel, J. R., McKinley, S. J. et Gerrits, M. F.** (1998). Thermal acclimation of phase behavior in plasma membrane lipids of rainbow trout hepatocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **44**(3): R861-R869.
- Hazel, J. R. et Williams, E. E.** (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research* **29**(3): 167-227.
- Hebert, P. D. N. et Beaton, M. J.** (1993). Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Beaumont, Helena Laboratories, 32 p.

- Hedgecock, D., Launey, S., Pudovkin, A. I., Naciri, Y., Lapegue, S. et Bonhomme, F.** (2007). Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology* **150**(6): 1173-1182.
- Helm, M. M., Holland, D. L., Utting, S. D. et East, J.** (1991). Fatty-acid composition of early nonfeeding larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **71**(3): 691-705.
- Hilbish, T.** (2001). Genetics of hard clams, *Mercenaria mercenaria*. Dans: *Biology of the Hard Clam*. Kraeuter, J. N. et Castagna, M. (Éd.), Amsterdam, Elsevier Science, 751 p.
- Hilbish, T. J.** (1985). Demographic and temporal structure of an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **86**(2): 163-171.
- Hilbish, T. J.** (1996). Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **200**(1-2): 67-83.
- Hochachka, P. W. et Somero, G. N.** (2002). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. New York, Oxford University Press, 466 p.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. et Scrimgeour, K. G.** (1994). *Principes de biochimie*. Bruxelles, De Boeck Wesmael, 720 p.
- Hulbert, A. J. et Else, P. L.** (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of Theoretical Biology* **199**: 257-274.

- Humphrey, C. M. et Crenshaw Jr., J. W.** (1989). Clam Genetics. Dans: Clam Mariculture in North America. Manzi, J. J. et Castagna, M. (Éd.), Amsterdam, Elsevier Science, 461 p.
- Johnson, S. M. et Nicolau, C.** (1977). Distribution of 1,6-diphenyl hexatriene fluorescence in normal human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **76**(3): 869-874.
- Jones, C. C.** (1979). Anatomy of *Chione cancellata* and some other chiones (Bivalvia: Veneridae). *Malacologia* **19**(1): 157-199.
- Kanazawa, A.** (2001). Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Science* **67**(6): 997-1007.
- Klingensmith, J. S.** (1982). Distribution of methylene and non-methylene interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* **17**(12): 976-981.
- Koehn, R. K. et Bayne, B. L.** (1989). Towards a physiological and genetic understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* **37**(1-2): 157-171.
- Koehn, R. K., Hall, J. G. et Zera, A. J.** (1980a). Parallel variation of genotype-dependent aminopeptidase-I activity between *Mytilus edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology Letters* **1**(5): 245-253.
- Koehn, R. K., Milkman, R. et Mitton, J. B.** (1976). Population genetics of marine pelecypods .4. Selection, migration and genetic differentiation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* **30**(1): 2-32.

- Koehn, R. K., Newell, R. I. E. et Immermann, F.** (1980b). Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**(9): 5385-5389.
- Koehn, R. K. et Shumway, S. E.** (1982). A genetic physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine Biology Letters* **3**(1): 35-42.
- Koehn, R. K. et Siebenaller, J. F.** (1981). Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis* .2. Dependence of reaction rate on physical factors and enzyme concentration. *Biochemical Genetics* **19**(11-1): 1143-1162.
- Kraffe, É., Soudant, P. et Marty, Y.** (2004). Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* **39**(1): 59-66.
- Kuhry, J. G., Duportail, G., Bronner, C. et Laustriat, G.** (1985). Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of "trimethylammoniumdiphenylhexatriene". *Biochimica et Biophysica Acta* **845**(1): 60-67.
- Landry, T., Hardy, M., Ouellette, M., MacNair, N. G. and Boghen, A.** (1999). Reproductive Biology of the Northern Quahaug, *Mercenaria mercenaria*, in Prince Edward Island. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **2287**: 18 p.
- Langdon, C. J. et Waldock, M. J.** (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty-acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **61**(2): 431-448.

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. et Cox, M. M.** (2005). Principles of biochemistry. New York, Freeman, 1119 p.
- Lepage, G. et Roy, C. C.** (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* **25**(12): 1391-1396.
- Logue, J. A., De Vries, A. L., Fodor, E. et Cossins, A. R.** (2000). Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *Journal of Experimental Biology* **203**(14): 2105-2115.
- Liu, Z. J. et Cordes, J. F.** (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**(1-4): 1-37.
- MacKenzie, C. L., Jr., Morrison, A., Taylor, D. L., Burrell, V. G., Jr., Arnold, W. S. et Wakida-Kusunoki, A. T.** (2002). Quahogs in eastern North America: part II, history by province and state. *Marine Fisheries Review* **64**(3): 1-64.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. et Samain, J. F.** (1992). Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) during larval development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **163**(2): 221-234.
- Mathieu, M. et Lubet, P.** (1993). Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves: a brief review. *Invertebrate Reproduction & Development* **23**(2-3): 123-129.
- McGladdery, S. E. F.** (1993). *A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences **1931**: 121 p.

- McPhail, L. C.** (2002). Glycerolipids in signal transduction. Dans: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Vance, D. E. et Vance, J. E. (Éd.), Amsterdam, Elsevier, 607 p.
- Meudt, H. M. et Clarke, A. C.** (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**(3): 106-117.
- Mitton, J. B.** (1993). Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. *Genetica* **89**(1-3): 47-65.
- Myrand, B., Tremblay, R. et Sévigny, J.-M.** (2002). Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. *The American Genetic Association* **93**: 238-248.
- Napolitano, G. E.** (1999). Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. Dans: Lipids in freshwater ecosystems. Arts, M. T. et Wainman, B. C. (Éd.), New York, Springer-Verlag, 319 p.
- Palmer, K. V. M.** (1927). The Veneridae of eastern America; cenozoic and recent. *Paleontographica Americana* **1**(5): 209-522.
- Palumbi, S. R.** (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**: 547-572.
- Palumbi, S. R.** (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* **13**(1): S146-S158.
- Parrish, C. C.** (1999). Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. Dans: Lipids in Freshwater Ecosystems. Arts, M. T. et Wainman, B. C., New York, Springer-Verlag, pp. 4-20.

- Pernet, F., Bricelj, V. M. et Parrish, C. C.** (2005). Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**(2): 115-133.
- Pernet, F., Gauthier-Clerc, S. et Mayrand, E.** (2007a). Change in lipid composition in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) exposed to constant or fluctuating temperature regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **147**(3): 557-565.
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L. et Guderley, H.** (2007b). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* **210**(17): 2999-3014.
- Pernet, F., Tremblay, R., Gionet, C. et Landry, T.** (2006). Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *Journal of Experimental Biology* **209**(23): 4663-75.
- Pernet, F. Tremblay, R., Redjah, I., Sévigny, J.-M. et Gionet, C.** (2008). Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology* **211**: 969-977.
- Place, A. R. et Powers, D. A.** (1979). Genetic variation and relative catalytic - efficiencies lactate dehydrogenase-B allozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(5): 2354-2358.

- Place, A. R. et Powers, D. A.** (1984a). Kinetic characterization of the lactate dehydrogenase (Ldh-B4) allozymes of *Fundulus heteroclitus*. Journal of Biological Chemistry **259**(2): 1309-1318.
- Place, A. R. et Powers, D. A.** (1984b). Purification and characterization of the lactate dehydrogenase (Ldh-B4) allozymes of *Fundulus heteroclitus*. Journal of Biological Chemistry **259**(2): 1299-1308.
- Pörtner, H. O.** (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology **132**(4): 739-761.
- Powers, D. A. et Place, A. R.** (1978). Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L) .1. Temporal and spatial variation in gene frequencies of Ldh-B, Mdh-A, Gpi-B, and Pgm-A. Biochemical Genetics **16**(5-6): 593-607.
- Rice, W. R.** (1989). Analysing tables of statistical tests. Evolution **43**: 223-225.
- Robertson, J. C. et Hazel, J. R.** (1995). Cholesterol content of trout plasma membranes varies with acclimation temperature. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **38**(5): R1113-R1119.
- Ropson, I. J., Brown, D. C. et Powers, D. A.** (1990). Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L) .6. Geographical variation in the gene frequencies of 15 loci. Evolution **44**(1): 16-26.
- Rousset, F.** (2007). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources **8**(1): 103-106.

- SAS Institute** (2002). SAS 9.1.3 Help and documentation.
- Satoh, T. et Hosokawa, M.** (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions* **162**(3): 195-211.
- Schmidt, P. S. et Rand, D. M.** (2001). Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: Habitat- and life-stage-specific survivorship of *Mpi* genotypes. *Evolution* **55**(7): 1336-1344.
- Shinitzky, M. et Barenholz, Y.** (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et Biophysica Acta* **515**(4): 367-394.
- Sinensky, M.** (1974). Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**(2): 522-525.
- Smondirev, A. M. et Berkowitz, M. L.** (2001). Molecular dynamics simulation of the structure of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers with cholesterol, ergosterol, and lanosterol. *Biophysical Journal* **80**(4): 1649-1658.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. et Samain, J. F.** (1998). Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **121**(3): 279-288.
- Soudant, P., Sanles, M. V., Quere, C., Le Coz, J. R., Marty, Y., Moal, J., Samain, J. F. et Sorgeloos, P.** (2000). The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **184**(3-4): 315-326.

- Stanley-Samuelson, D. W.** (1994). The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. *American Zoologist* **34**(6): 589-598.
- Suckling, K. E., Blair, H. A. F., Boyd, G. S., Craig, I. F. et Malcom, B. R.** (1979). The importance of the phospholipid bilayer and the length of the cholesterol molecule in membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **551**(1): 10-21.
- Tremblay, R., Myrand, B. et Guderley, H.** (1998a). Temporal variation of lysosomal capacities in relation to susceptibility of mussels, *Mytilus edulis*, to summer mortality. *Marine Biology* **132**: 641-649.
- Tremblay, R., Myrand, B. et Guderley, H.** (1998b). Thermal sensitivity of organismal and mitochondrial oxygen consumption in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.), to summer mortality. *Journal of Shellfish Research* **17**(1): 141-152.
- Tremblay, R., Myrand, B. et Sévigny, J.-M.** (1998c). Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) in the Magdalen islands (Southern Gulf of St. Lawrence, Canada). *Journal of Shellfish Research* **17**(4): 1191-1202.
- Tremblay, R., Myrand, B., Sévigny, J.-M., Blier, P. et Guderley, H.** (1998d). Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **221**: 27-58.

- Vance, D. E.** (2002). Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. Dans: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Vance, D. E. and Vance, J. E. (Éd.), Amsterdam, Elsevier, 607 p.
- Veliz, D., Bourget, E. and Bernatchez, L.** (2004). Regional variation in the spatial scale of selection at MPI* and GPI* in the acorn barnacle *Semibalanus balanoides* (Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology* **17**(5): 953-966.
- Voet, D. et Voet, J. G.** (2004). Biochemistry. Hoboken, Wiley International, 1591 p.
- Waples, R. S.** (1987). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution* **41**(2): 385-400.
- Ward, R. D., Woodwark, M. et Skibinski, D. O. F.** (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, fresh-water, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* **44**(2): 213-232.
- Webb, K. L. et Chu, F.-L. E.** (1983). Phytoplankton as food source for bivalve larvae. Dans: Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Pruder, G. D., Langdon, C. J. et Conklin, D. E. (Éd.), Baton Rouge, LA, Louisiana State University, pp. 272-291.
- Weir, B. S. et Cockerham, C. C.** (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**(6): 1358-1370.
- Whyte, J. N. C., Bourne, N. et Ginther, N. G.** (1990). Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Biology* **106**(2): 239-244.

- Zhukova, N. V.** (1986). Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from [¹⁴C] acetate in molluscs. *Biochimica et Biophysica Acta* **878**(1): 131-133.
- Zouros, E. et Foltz, D. W.** (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* **25**(2): 583-591.
- Zouros, E.** (1987). On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks. *Isozymes* **15**: 255-270.

