

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**EFFET DE LA PONTE SUR LA COMPOSITION  
MOLÉCULAIRE ET LES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES  
FILAMENTS DE BYSSUS DE LA MOULE BLEUE (*MYTILUS  
EDULIS*) EN CULTURE EN SUSPENSION**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© Rémy HENNEBICQ

Février 2012

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.



**Composition du jury :**

**Bruno Myrand, président du jury, Merinov**

**Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Isabelle Marcotte, codirectrice de recherche, Université du Québec à Montréal**

**Christian Pellerin, examinateur externe, Université de Montréal**

Dépôt initial le 29/02/2012

Dépôt final le 29/05/2012



« Nous réalisons que ce que nous accomplissons n'est qu'une goutte dans l'océan. Mais si cette goutte n'existait pas dans l'océan, elle manquerait ».

Mère Teresa



## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur *Réjean Tremblay*, professeur et chercheur en aquaculture à l'ISMER. Merci Réjean pour ton soutien et ta confiance durant mon projet de maîtrise. Je te remercie également pour ta patience, ta disponibilité et tes conseils. J'ai très apprécié les deux années passées au sein de ton laboratoire. Un grand merci pour tout !

Je voudrais également remercier ma codirectrice *Isabelle Marcotte*, professeure et chercheuse au département de chimie de l'UQAM. Merci Isabelle pour ta confiance, ta rigueur et tes conseils judicieux qui ont fait avancer le projet. Je te remercie également pour ton accueil, ta bonne humeur et ta générosité.

**Je tiens également à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ma maîtrise :**

*Christian Pellerin* et *Giovanni Fabra* du département de chimie de l'Université de Montréal, pour avoir mis au point la technique de mesure de force des byssus et pour votre accueil amical.

*Edouard Kraffe*, de l'Université de Bretagne Occidentale, pour sa sympathie et son expertise en matière de lipides. Le temps passé à tes côtés a été très instructif et des plus plaisants.

*Richard St-Louis* pour les analyses de métaux.

*Bertrand Génard* pour m'avoir aidé pendant l'analyse statistique de mes résultats. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé et pour ton regard critique.



*Alexandre Arnold et Bruno Myrand* pour toutes les discussions stimulantes sur le projet byssus et Merinov pour le soutien technique.

*Iften Redjah*, coordinateur de recherche à l'ISMER, pour son soutien technique, sa bonne humeur et surtout son amitié. Je n'oublierai jamais notre première rencontre à mon arrivée à l'ISMER lors d'une belle journée de tempête.

Un grand merci au Réseau Aquacole du Québec (RAQ), à Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (CRSNG) et à mon directeur, *Réjean Tremblay*, pour leur soutien financier.

**Pour finir, un immense merci à ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'a soutenu tout au long de mon projet :**

Mes parents, Thierry et Sylvie,

Simon, Lucie

et ma conjointe, Carole.

## RÉSUMÉ

La mytiliculture canadienne favorise la culture sur boudins en suspension dans la colonne d'eau. Cette technique d'élevage utilise la capacité des moules à s'attacher à un substrat solide par l'intermédiaire de leur byssus. Actuellement, aux Îles-de-la-Madeleine (Golfe du St-Laurent), la production de moules souffre de pertes importantes par décrochage liées à un affaiblissement de la force des byssus, surtout en saison de ponte (en été). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la ponte en conditions contrôlées, sur la force d'attachement des filaments de byssus ainsi que sur leur composition moléculaire associée aux lipides, métaux et acides aminés. Quarante moules ont donc été échantillonnées à partir d'un site de culture des Îles-de-la-Madeleine et conditionnées pour la ponte en laboratoire, à la station aquacole de Pointe-au-Père. La ponte a été induite sur la moitié du lot, par chocs thermiques répétés. L'indice gonadosomatique a été mesuré comme indicateur de la ponte. La production de byssus de chaque moule a été comptée et les parties distales ont été recueillies tous les deux jours pendant six jours afin d'étudier les propriétés mécaniques et la composition moléculaire des filaments avant et après la ponte. Le comportement élastique des filaments a été examiné après en avoir au préalable mesuré leur diamètre. Les résultats obtenus ont indiqué une diminution significative du diamètre des filaments après la ponte des moules provoquant un affaiblissement de la force d'attachement. L'analyse de la composition en grandes classes de lipides a révélé une très faible quantité de lipides dans les deux groupes expérimentaux (<0,05%), principalement des phospholipides (>60%). Quant à la teneur en métaux, elle n'a pas été modifiée par la ponte. Enfin, la composition en acides aminés montre des résultats très similaires.

**Mots clés :** byssus, ponte, propriétés mécaniques, lipides, métaux, acides aminés.



## ABSTRACT

The Canadian mussel industry exploits suspended long line culture in the water column. This culture technique uses the mussels capacity to attach themselves to a solid substrate with their byssus. Currently, in the Magdalen Islands (Gulf of St. Lawrence), mussel production suffers from significant losses due to mussels falloff related to the weakness of byssus strength, especially during the spawning season (summer). The objective of this study is to evaluate the effect of spawning in controlled laboratory conditions, on the strength of byssal attachment in relation to metals, lipids content and amino acids composition. Forty mussels were sampled from a mussel culture site from the Magdalen Islands and conditioned for spawning in laboratory conditions at the Pointe-aux-Père aquaculture station. Spawning was induced on half of the mussels by repeated thermal shocks. Gonad index was measured as an indicator of spawning. Byssal threads production of each mussel was counted and distal parts were collected every day for six days to study the mechanical properties, metals, lipids and amino acid composition of filaments before and after spawning. The elastic behavior of the filaments was examined after the measurement of their diameter. The results show a significant reduction in filaments diameter after mussels spawning causing a weakening of the strength of attachment of individual threads. Analysis of the lipids composition showed a very low amount of concentration in both experimental groups ( $<0.05\%$ ), and they were mainly phospholipids ( $> 60\%$ ). The metal content, was not been modified by spawning. Finally, the amino acids composition shows very similar results.

**Keywords :** byssus, spawning, mechanical properties, lipids, metals, amino acids.



## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	XXI
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. LA MYTILICULTURE.....	1
2. PERTES DE MOULES PAR DÉCROCHAGE.....	3
3. LE BYSSUS.....	5
4. L'ATTACHEMENT.....	7
5. OBJECTIFS.....	10
6. LES HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	11
CHAPITRE 1 THE EFFECT OF SPAWNING STRESS ON THE MECHANICAL PROPERTIES AND MOLECULAR COMPOSITION OF THE CULTURED BLUE MUSSELS (MYTILUS EDULIS) BYSSAL THREADS.....	13
A. ABSTRACT.....	13
B. INTRODUCTION.....	15
C. MATERIALS AND METHODS.....	17
1.1 <i>Experimental design</i> .....	17

1.2 <i>Gonad index</i> .....	19
1.3 <i>Mechanical properties</i> .....	29
1.4 <i>Metal composition</i> .....	21
1.5 <i>Amino acid composition</i> .....	22
1.6 <i>Lipid analysis</i> .....	22
1.7 <i>Statistical analysis</i> .....	23
<b>D. RESULTS</b> .....	23
2.1 <i>Mussels condition</i> .....	23
2.2 <i>Byssal thread production and diameter</i> .....	24
2.3 <i>Mechanical properties</i> .....	26
2.4 <i>Molecular composition</i> .....	27
<b>E. DISCUSSION</b> .....	31
<b>F. ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	35
<b>CHAPITRE 2 CONCLUSION</b> .....	37
<b>REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	41

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Table 1</b> : Mean values ( $\pm$ SE) of shell length (mm), gonadosomatic index and statistical comparisons between experimental groups.....	24
<b>Table 2</b> : Comparison of the mechanical properties of the byssal threads (distal region) secreted by experimental unspawned and spawned mussels.....	27





## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Schéma du dispositif de culture de moule sur filière en suspension dans la colonne d'eau. Image modifiée de : <http://www.irish-mussels.com/about/different-production-techniques/>.....2
- Figure 2** : Schéma représentant les différentes parties du byssus de moule. Schéma modifié à partir de celui de Waite et *al.* (1998).....5
- Figure 3** : (A) Distribution des PreCOLs dans le filament de byssus. (B) Schéma de la structure du filament. HIS représente les régions riches en histidine, Y représente la DOPA et M correspond au métal complexé. Schéma modifié à partir de celui de Vaccaro et *al.* (2001).....6
- Figure 4** : Représentation d'une courbe de traction typique de la partie distale de *Mytilus edulis*.....8
- Figure 5** : Photography of (A) twenty individuals' plates with its glued mussel, inserted into the five grooves of one of the two larger main plastic plate and (B) an individual plate with its mussel held by a long pieces of stainless steel to keep the plate systems on the bottom.....18
- Figure 6** : Photography of a byssal thread between the jaws of DMTA before measurement.....20
- Figure 7** : Comparison of the number of byssal threads secreted (mean values  $\pm$  SE) by experimental unspawned and spawned mussel.....25
- Figure 8** : Comparison of the diameter of byssal threads secreted (mean values  $\pm$  SE) by experimental unspawned and spawned mussel considering distal sections.....26

**Figure 9** : Lipids content of byssal threads according to spawning, considering distal sections (mean values  $\pm$  SE).....28

**Figure 10** : Metals composition of byssal threads according to spawning, considering distal sections (mean values  $\pm$  SE).....29

**Figure 11** : Amino acids composition of byssal threads according to spawning, considering distal sections (mean values  $\pm$  SE).....29

**LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES**

<b>Ag</b>	Argent
<b>Al</b>	Aluminium
<b>Ala</b>	Alanine
<b>Arg</b>	Arginine
<b>As</b>	Arsenic
<b>Asp</b>	Acide aspartique
<b>Au</b>	Or
<b>Ba</b>	Baryum
<b>Be</b>	Béryllium
<b>Ca</b>	Calcium
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>Ce</b>	Cérium
<b>Co</b>	Cobalt
<b>Cr</b>	Chrome
<b>Cs</b>	Césium
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>Cys</b>	Cystéine
<b>DOPA</b>	3,4-dihydroxyphénylalanine

<b>Eu</b>	Europium
<b>Fe</b>	Fer
<b>Glu</b>	Acide glutamique
<b>Gly</b>	Glycine
<b>GSI</b>	Gonadosomatic index
<b>Hg</b>	Mercure
<b>His</b>	Histidine
<b>Hyp</b>	Hydroxyproline
<b>I</b>	Iode
<b>Ile</b>	Isoleucine
<b>K</b>	Potassium
<b>Leu</b>	Leucine
<b>Lys</b>	Lysine
<b>Met</b>	Methionine
<b>Mg</b>	Magnésium
<b>mg</b>	Milligramme
<b>mm</b>	Millimètre
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>Mo</b>	Molybdène
<b>μ</b>	Micro
<b>N</b>	Newton
<b>Na</b>	Sodium

<b>Nd</b>	Néodyme
<b>Ni</b>	Nickel
<b>Pa</b>	Pascal
<b>Pb</b>	Plomb
<b>Phe</b>	Phénylalanine
<b>Pro</b>	Proline
<b>Pt</b>	Platine
<b>Sb</b>	Antimoine
<b>Sc</b>	Scandium
<b>Se</b>	Sélénium
<b>SE</b>	Standard error
<b>Ser</b>	Sérine
<b>Sn</b>	Étain
<b>Sr</b>	Strontium
<b>Thr</b>	Thréonine
<b>T</b>	Tonne
<b>Ti</b>	Titane
<b>Tl</b>	Thallium
<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>U</b>	Uranium
<b>V</b>	Vanadium
<b>Val</b>	Valine

**Y** Yttrium

**Zn** Zinc

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

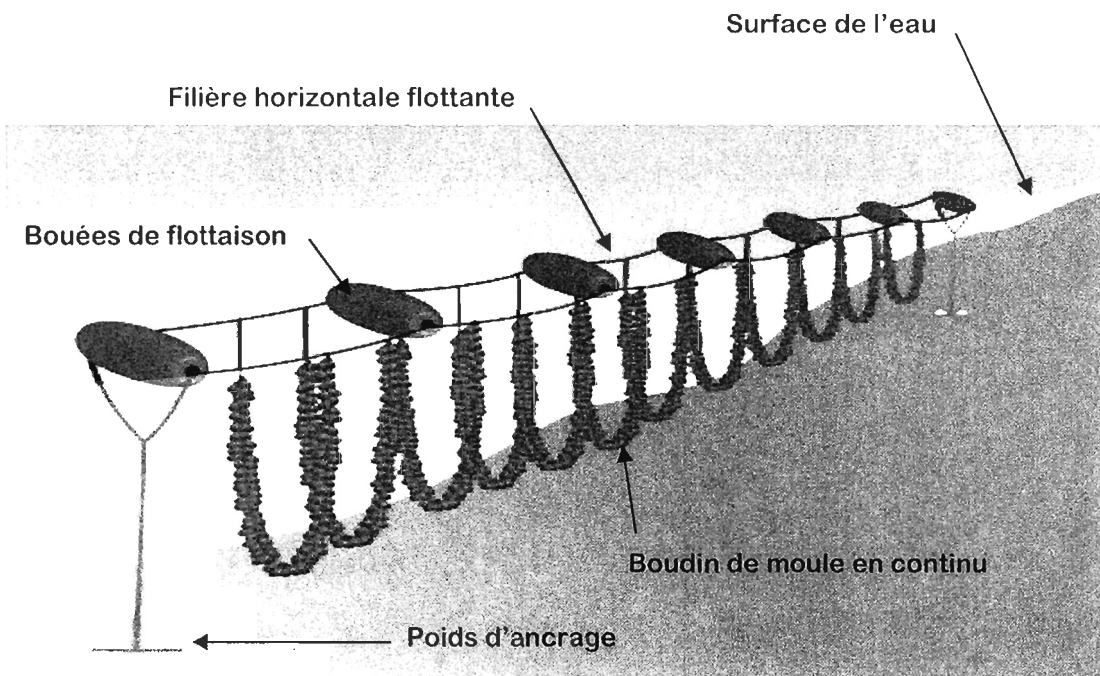
### 1. LA MYTILICULTURE

La culture de la moule bleue est largement répandue en Europe et en Amérique du Nord. La mytiliculture dans ces régions est pratiquée sur plusieurs espèces, soit *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus trossulus* (Beaumont et al. 2008, Penney et al. 2007). Au Québec nous retrouvons *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus*, mais leur abondance réciproque est variable selon les sites (Moreau et al. 2005). Par exemple aux Iles-de-la-Madeleine, *M. trossulus* a été observée à de très faibles proportions (moins de 4%; Tremblay et al. 1998) mais depuis les années 2000, aucune étude ne rapporte sa présence à cet endroit (Myrand et al. 2002, 2009a, b). Quant à *Mytilus edulis*, c'est une espèce euryhaline et eurytherme avec une aire de distribution circumpolaire. On la retrouve donc dans les océans Pacifique Nord, Atlantique Nord et Arctique. Bien que très variable dans les eaux des principaux pays producteurs, la production globale de moules bleues a augmenté de 48% entre 1991 et 2002, passant de 262 000 tonnes à 386 000 tonnes (FAO Fishery Statistic). Au Canada, la mytiliculture est présente depuis la fin des années 1970 (Mallet et Myrand, 1995). La production de *Mytilus sp* se concentre surtout sur l'Île-du-Prince-Édouard, mais également dans les provinces de Terre-Neuve et du Labrador, du Nouveau-Brunswick, de la Nouvelle-Écosse, du Québec et de la Colombie-Britannique. En 2008, la production québécoise (610 T) représentait seulement 3% de la production annuelle canadienne (Statistique-Canada 2008). Néanmoins, la moule bleue reste le mollusque le plus cultivé dans la région du golfe du St-Laurent avec environ 77% de la production maricole totale du Québec (M.A.P.A.Q 2002).

Différentes techniques sont utilisées pour l'élevage des moules jusqu'à la taille commerciale. Certaines utilisent la marée dans les régions de grand marnage avec la culture



sur bouchots (ou piquets en bois) enfoncés dans le substrat intertidal sur lesquels les moules s'accrochent. Cette technique est essentiellement préconisée en France (Mallet et Myrand 1995). D'autres favorisent la culture en suspension où les moules sont accrochées à des cordes en suspension dans la colonne d'eau, qui sont soit suspendues à des radeaux (Espagne) ou à des lignes flottantes immergées (Canada, Nouvelle-Zélande et Irlande; Hickman 1992). Cette dernière est la pratique la plus récemment développée et permet, grâce au boudinage en continu (**Figure 1**), une culture hautement mécanisée ainsi que la protection de la récolte en dessous de la surface de glace durant les mois d'hiver (Canada). La culture à plat est une autre technique d'élevage qui peut être employée aussi bien en zone tidale que subtidale. Elle consiste à cultiver les moules sur le fond marin, dans des zones où la capacité de charge «*carrying capacity*» est optimale (Pays-Bas). Au Québec, la présence de glace l'hiver a entraîné le développement de la mytiliculture en boudins (cordes) sur filières flottantes.



**Figure 1** : Schéma du dispositif de culture de moules sur filière en suspension dans la colonne d'eau. Image modifiée de : <http://www.irish-mussels.com/about/different-production-techniques/>.

Ce système est composé d'une ligne (filière) horizontale en suspension dans la colonne d'eau, positionnée sous la surface à l'aide d'ancrages sur le fond et de bouées en surface, sur laquelle sont attachés les boudins de moules. Le cycle de production de *Mytilus spp* commence par un approvisionnement en juvéniles qui peut se faire en éclosérie ou par captage larvaire directement dans le milieu d'élevage. Dans l'est du Canada, la facilité du captage naturel et le prix peu important de la moule sur les marchés limitent le développement des écloséries pour cette espèce. Ainsi, l'ensemble de l'approvisionnement en juvéniles s'effectue par captage. Les collecteurs artificiels (cordes) sont suspendus dans la colonne d'eau afin que les larves puissent s'y fixer lorsqu'elles atteignent la compétence à la métamorphose. Les jeunes moules sont ensuite prélevées sur les collecteurs, triées mécaniquement par rapport à leur taille puis boudinées (placées) le long d'une corde de polypropylène. L'ensemble est maintenu en place grâce à un filet tubulaire en coton biodégradable entouré d'une ficelle de lin. Ceci constitue un long boudin qui sera par la suite suspendu à la filière flottante immergée, à intervalles réguliers (MAPAQ 2012). Les moules vont finalement s'attacher à la corde par l'intermédiaire de leur byssus jusqu'à ce que le filet et la ficelle se dégradent. Le contrôle de la densité des moules sur les boudins est un paramètre important qui permet d'éviter, d'une part, des pertes notables liées au poids excessif de ces moules sur les boudins et, d'autre part, une compétition intraspécifique pouvant réduire la croissance des moules (Mallet et Carver 1991, Fréchette et al. 1996). Les moules vont grossir sur les boudins jusqu'à une taille commerciale de 50 mm sur une période de un à trois ans en fonction des conditions environnementales influençant la croissance, puis elles seront récoltées et commercialisées (Mallet et Myrand 1995).

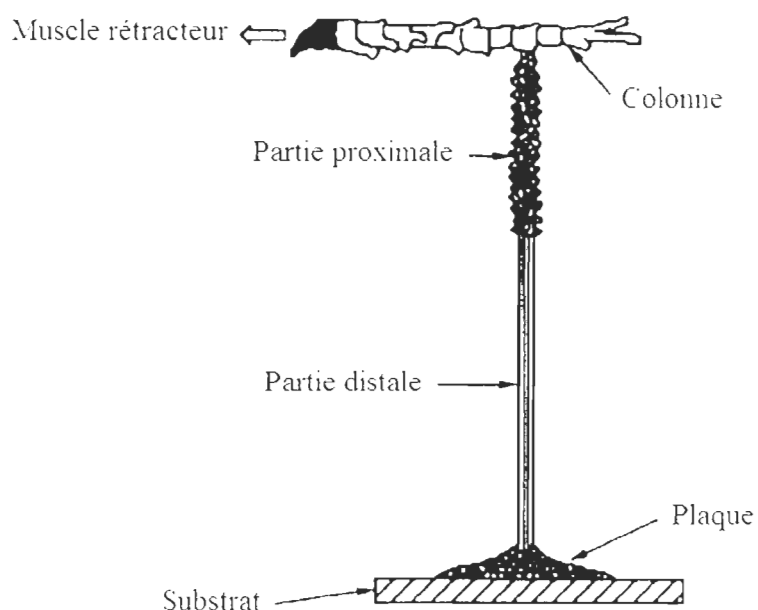
## **2. PERTES DE MOULES PAR DÉCROCHAGE**

Les deux grandes étapes de l'élevage, soient l'approvisionnement en naissains et la croissance sur boudins, tirent profit d'une caractéristique particulière de la moule bleue, soit sa capacité à s'attacher sur un substrat solide par la sécrétion de filaments de byssus

(Mahéo 1970, Price 1983). Cette production de byssus n'est pas constante et peut varier en nombre et en qualité (Lachance et al. 2008). Ceci peut entraîner un affaiblissement de la force d'attachement lié aux conditions environnementales et à la reproduction (Lachance et al. 2008), ce qui peut provoquer des pertes par décrochage et influencer significativement les rendements commerciaux des mytiliculteurs (Mallet et Carver 1991, Mallet et Myrand 1995, Inglis et Gust 2003). S'ajoutent à cela des pertes dites « normales » dues à l'ajustement permanent de la densité des moules sur les boudins et à la prédation, dont les principaux coupables sont le crabe commun (*Cancer irroratus*) et l'étoile de mer *Asterias sp.* (Mallet et Myrand 1995, Bourque et Myrand 2006). Une partie de ces pertes peuvent être diminuées par de bonnes pratiques mytilicoles, en évitant les densités excessives de moules au moment du boudinage (Fréchette et al. 1996) ou en empêchant que les boudins ne touchent le fond par une gestion appropriée de la flottabilité des lignes d'élevage. Aux Îles-de-la-Madeleine, le dégrappage passif des moules de culture dû à l'affaiblissement de la force d'attachement du byssus est observé de façon régulière durant l'été dans les lagunes et s'avère plus important sur les boudins de moules de deux ans par rapport à ceux d'un an (Léonard 2004). Par conséquent, l'impact sur les bénéfiques et donc sur la rentabilité de cette industrie peut être considérable puisque ces moules sont en fin de croissance et donc potentiellement commercialisables. À titre d'exemple, les pertes par décrochage aux Îles-de-la-Madeleine et en Gaspésie, uniquement au moment de la récolte, sont évaluées entre 5 et 28% des moules produites, soit 0.1 à 2.7 kg de moules par mètre de boudins (Bourque et Myrand 2006). Néanmoins, on a déjà constaté des pertes beaucoup plus importantes entre juin et septembre pouvant atteindre jusqu'à 7,2 kg de moules par mètre de boudin de deux ans (B. Myrand, données non publiées). À la différence d'autres cultures de bivalves comme celle du pétoncle, la mytiliculture exploite la capacité des moules à s'attacher à un substrat solide grâce à la production de byssus, rendant le problème exclusif à la culture de la moule.

### 3. LE BYSSUS

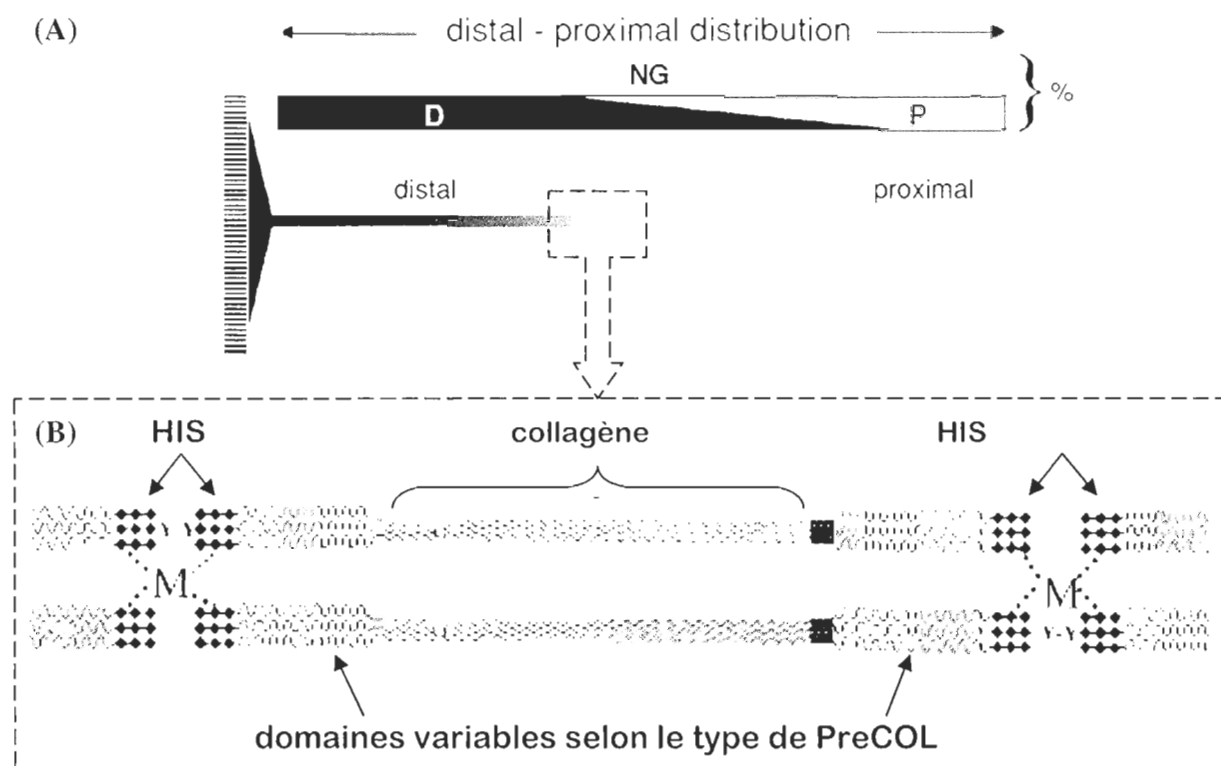
Le byssus est un ensemble de filaments produit par la moule permettant son ancrage à un substrat solide (Mahéo 1970, Waite 1983, Carrington 2002a). Chaque filament est constitué d'une partie distale plutôt rigide et attachée au substrat par l'intermédiaire d'une plaque, et d'une partie proximale plus extensible, reliée à la base du pied et du muscle rétracteur par l'intermédiaire de la colonne (**Figure 2** ; Benedict et Waite 1986).



**Figure 2** : Schéma représentant les différentes parties du byssus de moule. Schéma modifié à partir de celui de Waite et *al.* (1998).

Le filament de byssus est constitué de protéines de collagène complexes appelées PreCOLs qui lui confèrent une grande résistance et une grande élasticité (Price 1983, Waite 1983, Coyne et *al.* 1997 ; Gosline et *al.* 2002). Plus précisément, on distingue trois types de PreCOLs en fonction de la structure des séquences ou domaines liés au collagène. Les segments distal et proximal sont respectivement composés de PreCOL-D et de PreCOL-P tandis que le PreCOL-NG, quant à lui, est uniformément présent le long de la fibre byssale (**Figure 3A**). Le PreCOL-P possède une structure proche de l'élastine, le PreCOL-D a une

structure proche de la fibroïne de soie et le PreCOL-NG possède une structure semblable à la glycine. Ces différences structurales confèrent une élasticité propre à chaque type de PreCOLs et par conséquent, à chaque partie de la fibre (distale/proximale). Des domaines riches en histidine viennent compléter les extrémités de ces PreCOLs où la présence de 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) et d'ions métalliques complexés permet d'établir des liens croisés qui maximisent la cohésion des protéines dans la structure (**Figure 3B**). Le tout est enveloppé d'une gaine solide de protéine mefp-1 (*Mytilus edulis foot protein*), similaire à la sérécine qui recouvre la soie du ver à soie (Coyne et al. 1997). Les connaissances actuelles sur la structure du byssus font surtout appel à des homologies avec d'autres fibres naturelles basées sur la séquence en acides aminés.



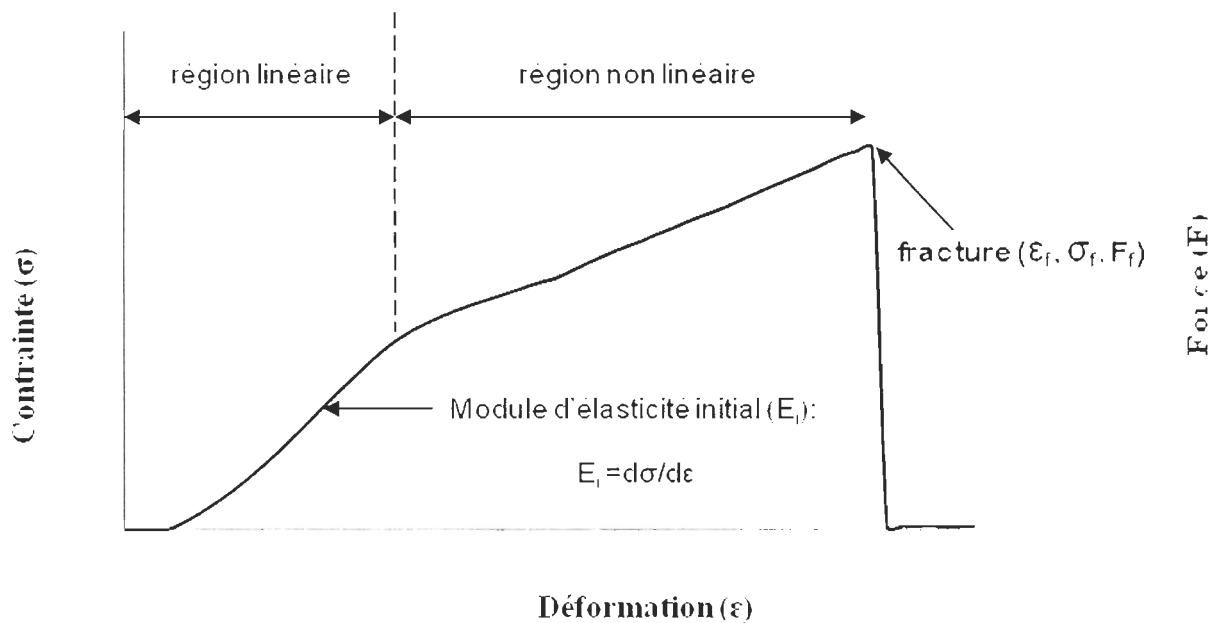
**Figure 3 :** (A) Distribution des PreCOLs dans le filament de byssus. (B) Schéma de la structure du filament. HIS représente les régions riches en histidine, Y représente la DOPA et M correspond au métal complexé. Schéma modifié à partir de celui de Vaccaro et al. (2001).

Chaque filament est sécrété par une glande située à la base du pied du mollusque. Pour ce faire, le pied se déploie hors de la coquille, explore le milieu et immobilise son extrémité au contact d'un substrat propice à l'ancrage de la moule. La glande byssale diffuse alors une substance blanche dans le canal ventral du pied, formant une plaque adhésive à l'interface pied/substrat. Puis, cette substance durcit à l'intérieur du canal, modelant les parties distale et proximale du filament (Coyne et *al.* 1997). Finalement, le pied se relâche et libère le byssus nouvellement formé. Le pied est alors prêt à sécréter un nouveau byssus. Le nombre de byssus nécessaires pour assurer l'attachement dépend essentiellement des conditions du milieu. Il se situe habituellement entre 20 et 60 (Bell et Gosline 1996). La moule produit en moins de 24 heures et de façon constante l'ensemble des filaments lui permettant de garantir son attachement (Mahéo 1970). Cette production hyperactive est suivie d'une activité plus lente permettant un accroissement de l'ancrage de la moule (Mahéo 1970). En effet, les byssus se dégradent et nécessitent d'être continuellement remplacés par des nouveaux filaments (Mahéo 1970, Lee et *al.* 1990). Cependant, peu d'études ont été consacrées à la vitesse de dégradation de ces fibres. Jusqu'à présent, on sait que la force et la rigidité des byssus décroît significativement après une période de 25 jours (Price 1981) et la durée de vie d'un byssus serait de 4 à 6 semaines (Carrington 2002b).

#### **4. L'ATTACHEMENT**

La force d'attachement d'une moule est la combinaison du nombre et de la force des filaments de byssus produits. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux propriétés mécaniques de la partie distale. Les filaments ont été étirés de façon individuelle, jusqu'à leur rupture, après avoir au préalable mesuré leur diamètre. On obtient alors une relation entre la déformation des filaments et la contrainte appliquée. Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe de traction qui décrit le comportement des fibres (**Figure 4**) par quatre propriétés importantes :

- Le module d'élasticité initial ( $E_i$ ), qui correspond au rapport entre la contrainte et la déformation dans la portion linéaire de la courbe, et qui donne une idée de la rigidité du filament.
- La contrainte à la rupture ( $\sigma$ ), exprimée en Pascale (Pa), correspond à la valeur de la contrainte juste au moment où l'échantillon se brise, ce qui donne une idée de la force du matériau.
- La déformation à la rupture ( $\epsilon$ ), exprimée en pourcentage (%), correspond à la déformation maximale de l'échantillon juste avant de casser, et reflète l'extensibilité du matériau.
- La force à la rupture ou « breaking force », exprimée en Newton (N), est définie comme la force nécessaire pour rompre le filament.



**Figure 4 :** Représentation d'une courbe de traction typique de la partie distale de *Mytilus edulis*.

Des travaux récents ont démontré que la force d'attachement des moules est variable selon les saisons (Moeser et al 2006, Lachance et al 2008, 2011). Ces variations

temporelles de la force d'attachement peuvent être influencées par des facteurs biotiques comme la reproduction (Clarke 1999, Carrington 2002, Hunt et Sheibling 2001, Alfaro 2005, Zardi et *al.* 2007, Lachance et *al.* 2008, Babarro et Reiriz 2010) ou abiotiques comme la température, les conditions hydrodynamiques (turbulence et vitesse des courants), et la disponibilité de nourriture (Lachance et *al.* 2008). Jusqu'à présent, les facteurs qui semblent expliquer le mieux ces variations de la force d'attachement des moules, en début d'été, sont la température de l'eau, la turbulence et l'état reproducteur des individus (Lachance et *al.* 2008). En effet, l'été est une période caractérisée par de hautes températures et de faibles turbulences. En conséquence, les moules ont moins d'effort à fournir pour résister au mouvement de l'eau qui pourrait les détacher, et la température élevée pourrait contribuer à accélérer la dégradation des byssus. De plus, la ponte des moules coïncide avec une diminution drastique de la force d'attachement vers la fin du mois de juin. Un filament produit à l'automne est 52% plus fort qu'un autre produit à l'été (Lachance et *al.* 2008). On peut donc se demander si le coût énergétique important (Seed et Suchanek 1992) et le niveau de stress engendrés par la ponte ont un impact sur le nombre et/ou la qualité des byssus produits durant cette période. En effet, la ponte pourrait induire des modifications au niveau de la structure des fibres sécrétés post-ponte, modifiant leurs propriétés mécaniques. Les travaux de Cook (1970) démontrent que la masse sèche de byssus de moule pourrait contenir jusqu'à 8% de lipides. Comme la gamétogénèse demande une grande quantité de lipides pour structurer les gamètes, la ponte pourrait être liée à des changements dans la composition en lipides, qui pourraient avoir un impact significatif sur la structure des byssus. De plus, l'absence de certains métaux complexés pourrait diminuer le nombre de liens croisés entre les protéines (PreCOLs) et perturber la cohésion de la structure. Enfin, la composition en acides aminés pourrait également être modifiée pendant la période de ponte et possiblement changer les propriétés élastiques des PreCOLs. Il serait donc intéressant d'établir une relation entre la composition moléculaire et les propriétés mécaniques des filaments. Toutefois, aux Iles de la Madeleine, aucun lien significatif n'a pu être observé entre les variations des réserves énergétiques accumulées chez la moule et la force d'attachement (Lachance et *al.* 2011). Moeser et *al.* (2006) ont observé une production



réduite du nombre de byssus chez les moules ayant un indice gonado-somatique faible, c'est-à-dire après la ponte. Babarro et *al.* (2010) ont fait le même constat chez *M. galloprovincialis* tout en liant la force d'attachement des moules à l'épaisseur des filaments de byssus et à leur composition en acides aminés. Evidemment, la force d'attachement, qui représente la force nécessaire requise pour décrocher la moule de son substrat, dépend du nombre de filaments produits par la moule (Price 1980, Bell et Gosline 1997, Pelc et Alexander 1999, Zardi et *al.* 2007, Babarro et *al.* 2008) mais également du diamètre de chaque filament (Bell et Gosline 1997, Brazee et Carrington 2006) ainsi que de leur composition biochimique (Babarro et Reiriz 2010). Ces deux derniers paramètres sont très importants car les propriétés mécaniques du byssus en dépendent. Il serait donc intéressant de savoir si la ponte massive des moules de culture *M. edulis*, en tant que facteur isolé, influence la production et les caractéristiques du byssus. C'est une hypothèse qui sera testée dans cette étude.

## **5. OBJECTIFS**

Les techniques de culture en boudins employées au Canada dépendent largement de la capacité d'attachement des moules à un substrat solide par l'intermédiaire de leur byssus. Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'influence de la ponte sur la diminution de la force d'attachement des moules de culture (*Mytilus edulis*) et sur les caractéristiques du byssus.

Ce projet permettra de mieux comprendre le ou les mécanismes qui aboutissent au décrochage des moules en culture, principalement en période de ponte. L'investigation portera sur la production, les propriétés mécaniques et la composition moléculaire du byssus. Le premier objectif du projet est d'étudier la production de byssus chez *Mytilus edulis* en fonction de la ponte, estimée par l'indice gonado-somatique. Le deuxième objectif consiste à mesurer le diamètre des filaments ainsi que la force requise pour les rompre. Parallèlement aux mesures de force, l'estimation de la déformation et de la contrainte subies par le byssus lors son étirement permettra de caractériser ses propriétés mécaniques.

Le troisième et dernier objectif vise à comparer la qualité des filaments de byssus en fonction de l'état reproducteur des individus. En termes de qualité, nous avons caractérisé la composition biochimique spécifique des filaments de byssus, plus précisément leur composition en acides aminés, en métaux et en classes de lipides.

## **6. LES HYPOTHESES DE RECHERCHE**

À ces objectifs viennent se lier différentes hypothèses :

H(1) : Le nombre de filaments de byssus produit diminue après la ponte.

H(2) : La force permettant de rompre les filaments diminue après la ponte des moules.

H(3) : La ponte influence significativement la composition biochimique des brins de byssus.



**CHAPITRE 1**  
**THE EFFECT OF SPAWNING STRESS ON THE MECHANICAL**  
**PROPERTIES AND MOLECULAR COMPOSITION OF CULTURED BLUE**  
**MUSSELS (*MYTILUS EDULIS*) BYSSAL THREADS**

***A. ABSTRACT***

La moule bleue *Mytilus edulis* est largement cultivée dans les régions côtières du Canada. Cependant, la technique de culture sur boudins suspendus à de longues lignes flottantes dans la colonne d'eau souffre d'un décrochage important de moules dû à l'affaiblissement de leur byssus, principalement en période de ponte. Nous avons donc étudiés l'effet de la ponte chez *Mytilus edulis* sur les propriétés mécaniques et la composition moléculaire des filaments de byssus. Nos résultats montrent que le diamètre et la force de rupture des filaments diminuent de façon significative après une ponte contrôlée en laboratoire, par rapport aux individus qui n'ont pas pondu. Toutefois, aucune différence n'a été observée au niveau de la déformation et de la contrainte à la rupture entre les deux groupes expérimentaux. Étonnamment, la dépense d'énergie au moment de la ponte n'a engendré aucun changement significatif sur le nombre de filament de byssus produit avant et après la ponte, sur une période de six jours. L'analyse de la composition en lipide de la partie distale des fibres montre une très faible concentration en lipides totaux, inférieure à 0.05% dans les deux groupes. La composition en métaux de la partie distale des filaments de byssus ne montre aucun changement substantiel induit par la ponte. De la même manière, la composition des filaments en acides aminés ne montre aucune différence significative en fonction de la ponte. Finalement, nos résultats montrent que l'affaiblissement de la force d'attachement des filaments de byssus, engendré par la ponte des moules *Mytilus edulis* dans des conditions de laboratoire, est principalement due à une réduction du diamètre des fibres et ne peut pas être lié à des changements concernant la composition en lipides, acides aminés ou métaux.

**Mots clefs :** byssus, ponte, propriétés mécaniques, lipides, métaux, acides aminés.

**The effect of spawning stress on the mechanical properties and molecular composition of cultured blue mussels (*Mytilus edulis*) byssal threads.**

The blue mussels *Mytilus edulis* are widely farmed in the coastal regions of Canada. However, their production on sleeves attached to long lines in the water column suffers from fall-offs due to byssus weakening, especially during the spawning period. We have thus studied the effect of the spawning event of *M. edulis* on the mechanical properties and molecular composition of their byssal threads. Our results show that the filaments' diameter and breaking force significantly decreased after a controlled spawning in the laboratory, as compared to unspawned individuals. However, no important differences in the stress at break and strain at break were observed between the two experimental groups. Surprisingly, the energy expenditure at the time of spawning does not cause significant changes in the amount of byssal threads produced pre- or post-spawning over a 6-day period. Analysis of the lipid composition of the fibers' distal region indicates a very low concentration of total lipids, i.e. < 0.05% in both groups. The metal composition of the distal section of the byssus did not show substantial changes induced by the spawning event. Similarly, the amino acids composition of the filaments showed no significant variation due to spawning. Altogether, our results show that the weakening of the byssal thread attachment force resulting from the spawning event of the mussels *Mytilus edulis* in laboratory conditions was mainly due to a reduction of the fiber diameter, and cannot be related to changes in lipids, amino acids or metals composition.

**Keywords :** byssus, spawning, mechanical properties, lipids, metals, amino acids.

## ***B. INTRODUCTION***

Largely cultivated (over 20,000 tons per year) on the east and west coasts of Canada, the blue mussel (*Mytilus edulis*) represents an annual market of around \$ 30 million (Statistics Canada 2010). Cultured mussels are attached by their byssus to sleeves suspended to long lines in the water column. The weakening of the byssal threads can therefore cause significant losses by fall-off and thus influence farming performances. The fall-off of suspended cultivated mussels in Îles-de-la-Madeleine represents 5 to 28% of the production, i.e. or 0.1 to 2.7 kg of mussels per meter of sleeves (Bourque and Myrand, 2006). In addition to production loss, the accumulation of mussels on the seabed can have a real impact on the environment due to organic enrichment of sediments (Crandford et al. 2003; McKindsey et al. 2011). Many factors that may naturally covariate influence the attachment strength of mussels which in turn depends on the byssal threads production and their mechanical properties (Moeser and Carrington 2006; Lachance et al. 2008). Previous studies have shown that the byssal thread production and/or attachment strength of blue mussels increase with water temperatures up to 26°C (Young 1985, Lee et al. 1990) as well as current velocity and turbulence (Lee et al. 1990, Bell and Gosline 1997, Moeser et al. 2006, Lachance et al. 2008), but decrease with limiting food availability (Price 1980, Young 1985, Carrington 2002a, Babarro et al. 2008) and mussel spawning (Price 1980, 1982, Carrington 2002a, Zardi et al. 2007, Lachance et al. 2008, Babarro and Reiriz, 2010).

Seasonal fluctuations of attachment strength in natural populations' of blue mussels were observed in the intertidal zone (Price 1980, 1982, Hunt and Scheibling 2001, Carrington 2002a). Such variations were also observed in suspension-cultured mussels whose attachment strength from sleeves was lower in the summer compared to the autumn on the east coast of Canada (Lachance et al. 2008). This variability seems not strictly related to the number of byssal threads secreted but also to their strength since threads produced in the fall were 52% stronger those produced in the summer (Lachance et al. 2008).

The relationships between the strength of byssal threads, their structure and their mechanical properties have not been clearly established yet. A study on *M.*

*galloprovincialis* from the coast of Spain, however, related the change in strength of byssal threads produced before and after spawning to their changes in morphology - mainly thickness - and probably their amino acid composition (Babarro et al., 2010). In experiments performed under a flow regime, higher flow rates were related to increased formation of quinone-derived cross-link in mussel byssal plaque which may be related to higher attachment (McDowell et al. 1999).

The byssus is composed of a series of protein fibers rich in collagen secreted and molded in the mussel foot (Bairati and Vitellaro-Zuccarello 1976; Benedict and Waite 1986). The byssal thread comprises a corrugated proximal section connected to the soft tissues of the mollusc, and a smooth distal part that is anchored to the substrate. The collagen complex composing the proximal and distal segments of the byssus is different and named PreCOL-P and PreCOL-D respectively (Qin and Waite 1995). Another protein, PreCOL-NG, is uniformly distributed along the fiber. Each PreCOL has different flanking domains with distinct structures bound to central collagen. PreCol P has elastin-like flanking domains, preCol D has silk fibroin-like domains, and preCol NG has domains that are similar to glycine-rich proteins. Areas rich in histidine and 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) common to all three complement PreCOLs ends. The byssal thread envelope consists of a solid sheath of proteins called Mefp-1 (*Mytilus edulis* foot protein). Amino acids are, thus, the main molecular building blocks of the byssus. However, these byssal collagens are cross-linked by complexation with metals such as  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Fe^{2+}$  which provide the integrity and structural strength of the byssus (Lucas et al. 2002, Harrington and Waite 2007). Lipids contents and their characteristics (classes and fatty acids profiles) of the byssus have not been studied very much, and only Cook (1970) reports a lipid content of 8% per dry weight of byssal threads. The potential structural role of these lipids is unknown.

In this study, we tested the hypotheses that the spawning event in *Mytilus edulis* induces a decrease in the production of byssal threads and changes in the composition and mechanical properties of individual filaments. More specifically, we examined the impact of a controlled spawning event in laboratory conditions on the number of byssal threads

produced, their diameter, as well as on the tensile properties and biochemical (amino acids profiles, metal composition and lipid content) characteristics of the distal section of the threads.

## **C. MATERIALS AND METHODS**

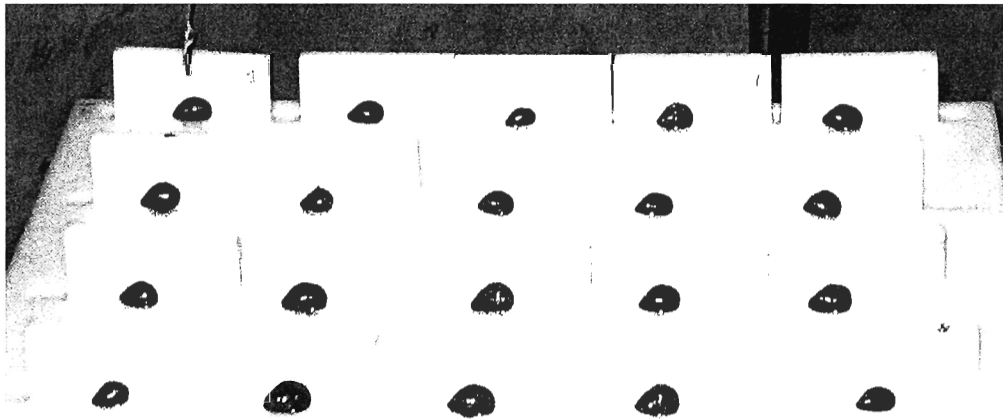
### **1.1 Experimental design**

Two-year old cultured mussels *Mytilus edulis* were obtained in early June 2010 from a mussel farm located in the House Harbour lagoon, (Iles-de-la-Madeleine, southern Gulf of St-Lawrence, Canada, 47°25'N, 61°50'W) where *M. edulis* accounts for over 97% of the mussel population (Tremblay et al. 1998). Mussels were separated from the clumps by carefully cutting the byssal threads, and then transferred in a 200-L tank at the aquaculture station of Pointe-aux-Pères (48°31'N, 68°28'W) in 1- $\mu$ m filtered seawater flowing at 0.5 L min<sup>-1</sup> and maintained at the temperature recorded at the sampling site (18°C) to avoid thermal stress. Mussels were continuously fed a 1:1:1 mixture (v/v/v) of *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii*, and *Nannochloropsis oculata* at a total concentration of ~50 cells. $\mu$ L<sup>-1</sup> (Cocktail-TMN, Nutrocean). After 3 weeks of laboratory acclimation, spawning was induced on 20 individual mussels using a thermal shock from 12 to 25°C. Gametes began to be released after 15 min and mussels were transferred back to 18°C until the end of their spawning. The shell of 20 spawned and 20 unspawned mussels was cleaned and glued with Bostik® cyanoacrylate adhesive glue onto individual PVC plates numbered in order to facilitate the harvest and identification of byssal threads (**Figure 5**). Each individual plate with its glued mussel was then randomly and perpendicularly inserted into one of the five grooves of a larger main plastic plate. Each groove could hold five individual plates. This system allowed mussels to attach their newly secreted byssal threads to the main plate. Each plate with its mussel was subsequently pulled out to collect the byssal threads without interfering with the attachment of its neighbours. Each large plate measured 60 cm long  $\times$  60 cm wide  $\times$  1 cm thick and held 20 individual plates arranged



vertically. The individual plates were 10 cm long  $\times$  5 cm wide  $\times$  1 cm thick. The large plates were placed on the bottom of a 200-L tank and kept in conditions similar to the acclimation period. Long pieces of stainless steel were put on each row of individual plastic plates to keep the plate systems on the bottom. Water was distributed along each row of the main plate via a perforated pipe.

(A)



(B)



**Figure 5:** Photography of (A) twenty individuals' plates with its glued mussel, inserted into the five grooves of one of the two larger main plastic plate and (B) an individual plate with its mussel held by a long pieces of stainless steel to keep the plate systems on the bottom.

Every 2 days during 6 days, byssal thread produced by each mussel were counted and their distal parts collected individually by carefully cutting each filament. The byssus threads were then dehydrated by air exposure in an open plastic bag and stored at 4°C until mechanical and biochemical properties measurements were carried out (Brazee and Carrington 2006). After each sampling, mussels were reintroduced randomly in the tank. At the end of the sampling period, shell lengths were measured and the gonad index quantified for each mussel.

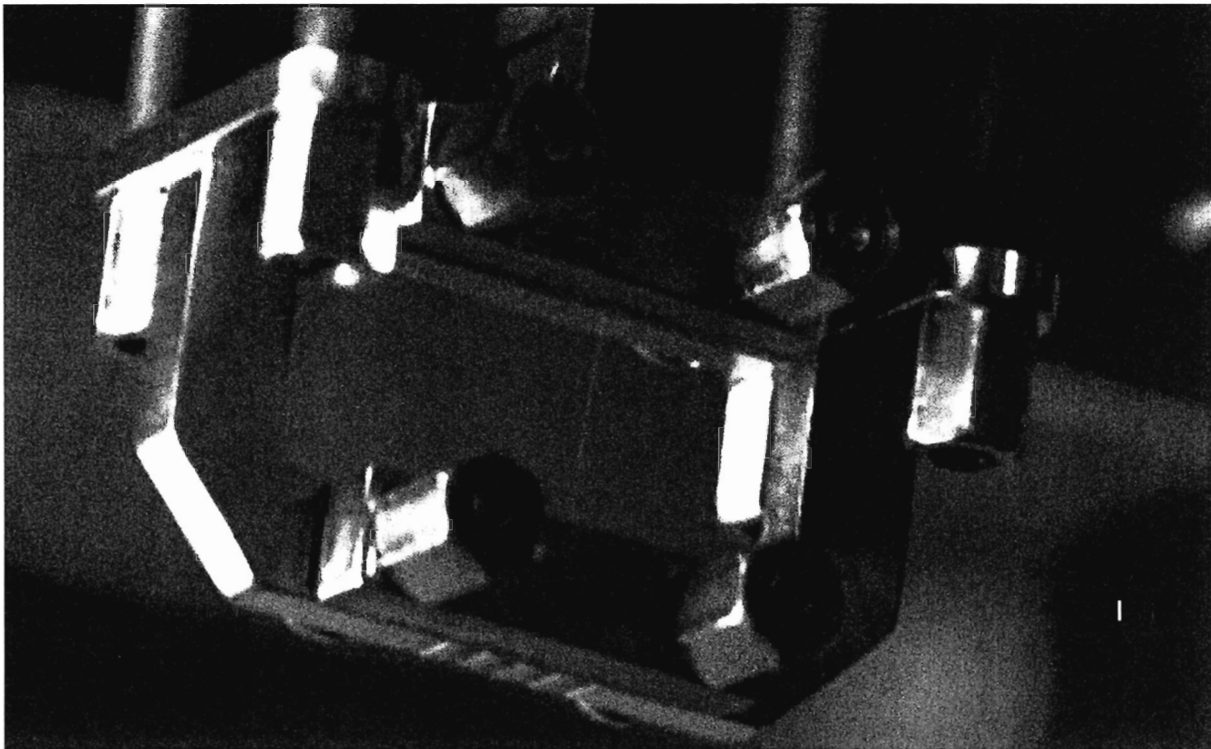
### **1.2 Gonad index**

Each mussel was dissected to separate the mantle from the other tissues in order to measure their gonad index, calculated as the dry mantle weight (70°C for 72 h) divided by the whole dry body weight (i.e. the sum of the dry weights of the mantle and remaining tissues). Indices related to tissue mass have been found to be good indicators of spawning events, particularly for suspended cultured mussels in Magdalen Island lagoons (Myrand et al. 2000, Lachance et al. 2008). Only 12 out of 20 mussels were identified as "spawned" and were selected for study comparatively to the unspawned mussel group (n-20).

### **1.3 Mechanical properties**

Only the distal section of byssal threads has been studied since sampling of the proximal section was not possible without mussels opening. The distal section was carefully isolated from the rest of the thread (plaque and possible proximal section) and the average diameter of each filament was measured using an optical microscope (Axioskop 40 Zeiss, with magnification of 25X). The diameter measurements were performed on four sections of the fiber, randomly selected, with four measurements per section. Measurements were performed on two filaments per mold per sampling day. Then, the

tensile characteristics were measured using a dynamic mechanical thermal analyser (**Figure 6**, DMTA V of Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, USA) to examine the breaking force, stress-at-break, strain-at-break and initial modulus. Samples were placed between the two jaws, one fixed and one stretching the fibre until it breaks (**Figure 6**). The strain rate was  $5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ . To secure samples in the jaws and to avoid change of position or damage during testing, the ends of the distal section were glued between two PET sheets (10 x 5 mm for the upper jaw and 10 x 10 mm for the lower jaw) before stretching. All measurements were performed in distilled water to keep the sample wet during testing and simulate natural conditions.



**Figure 6** : Photography of a byssal thread between the jaws of the DMTA during measurement.

The threads' breaking force was defined as the force needed to break the thread, expressed in Newton. The stress-at-break ( $\sigma$ ), expressed in Pascal, was estimated using the equation:

$$\sigma = F/(\pi(D_0/2)^2)$$

where "F" is the breaking force and "D<sub>0</sub>" is the byssal thread initial diameter. The strain-at-break ( $\epsilon$ ), expressed in percentage, was calculated with the following formula:

$$\epsilon = ((l - l_0) / l_0) * 100$$

where "l" is the maximum extension at break and "l<sub>0</sub>" is the initial thread length corresponding to the initial distance between the jaws of the stretching device, namely 10 mm. The initial modulus represents the stiffness of the fiber and is calculated as the slope of the initial linear portion of a stress-strain diagram. Attachment force of each mussel was estimated by multiplying the mean force of individual byssal threads by the number of byssal threads produced. Then, an average for each experimental group was calculated and represents the force by mussel.

#### **1.4 Metal composition**

The distal part was dissected from the rest of the thread and rinsed three times with distilled water. Byssal threads from each group of mussels (spawned and unspawned) and for the three sampling dates were pooled to get the 3 to 4 mg of byssus (distal section) needed for analysis. Duplicates were prepared for each mussel group. Metal content of the byssal threads before and after mussel spawning was determined using a Agilent 7500c (New Castle, DE, USA) inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), in normal mode and micro-nebulizer. Analyses were done after acid dissolution of distal byssal threads with 0.1 mL of concentrated nitric acid (70%) and 0.1 mL of hydrogen peroxide, placed in a water bath for 1 hour at 60°C. Elements detected are Be, Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Y, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, I, Cs, Ba, Ce, Nd, Eu, Pt, Au, Hg, Tl, Pb and U. To correct for mass bias and instrument drift, a 2% HNO<sub>3</sub> blank solution was run periodically.

### 1.5 Amino acid composition

The amino acids composition of the distal regions was determined at the Advanced Protein Technology Centre, Department of Molecular Structure and Function at The Hospital for Sick Children (Toronto, Canada). The amino acid analysis was performed on a Waters Acquity UPLC System (Milford, Massachusetts, USA) equipped with a TUV detector and a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 X 100 mm). Two replicates of four filaments were analyzed per experimental group and per sampling date (every second day for six days). In addition to the natural amino acids, hydroxyproline (Hyp) and DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) were studied. Briefly, the distal thread segments were hydrolysed in 100  $\mu$ L of 6 M HCl with 1% phenol and 50  $\mu$ L of 25  $\mu$ mol/mL of norleucine, *in vacuo* for 20-24 h at 110°C. An aliquot (10  $\mu$ L) of the sample was transferred into a glass culture tube and dried under vacuum using a centrifugal evaporator for 15 min. After drying, the sample was treated with a redrying solution consisting of methanol:water:triethylamine (2:2:1), vortex-mixed and dried under vacuum for 15 minutes. Then, the sample was derivatized for 20 min at room temperature with a methanol:water:triethylamine:phenylisothiocyanate (PITC) (7:1:1:1) solution. After 20 min, the derivation solution was removed under vacuum for 15 min, the sample washed with the redrying solution, vortex-mixed and dried *in vacuo* for 15 min. The derivatized sample was then dissolved in a given amount of sample diluent (pH 7.4) and an aliquot injected into the column, running on a modified PICO-TAG gradient. The column temperature was 48°C and the detection was performed at a 254 nm wavelength. Data were processed using the Waters Empower 2 Chromatography software.

### 1.6 Lipid analysis

About 30 mg of byssus distal section were grounded twice with a Mixer Mill (MM 400, Retsch) homogenizer at -180°C for 2 min at a frequency of 30 pulses s<sup>-1</sup>. Lipids were extracted in dichloromethane-methanol according to Folch procedure (Folch et al. 1957).

Extracts were spotted thrice on silica gel-coated chromarods (SIII, Iatron Laboratories Inc, Shell USA). Lipids classes were determined according to Parrish (1987) to separate lipids classes into triacylglycerols (TAG), free sterols (ST), phospholipids (PL), acetone-mobile polar lipids (AMPL), free fatty acids (FFA), wax esters (WE), ketones (KET) and free aliphatic alcohol (ALC) by thin-layer chromatography using flame ionization detection (TLC/FID) with an Iatroscan MK-6 (Shell. USA, Fredericksburg, VA, USA). A three-stage development system was used. Lipid classes were expressed as a percentage of total lipids.

### 1.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SAS software version 8.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) with significant value at  $p < 0.05$ . Two-way ANOVA was used to compare the effects of spawning and time on each variable measured. Replication unit was mussel. Residuals were graphically assessed for normality. Homogeneity was assessed using the O'Brien test. When differences were detected, *a posteriori* comparison tests were performed on LSMEANS. The mean of mussels' length and gonad index from spawned and unspawned groups were compared with Student *t*-test. Data are presented as means  $\pm$  standard error (SE).

## **D. RESULTS**

### 2.1 Mussels condition

We have first evaluated the general condition of the mussels (**Table 1**). Comparison of the mussel shells shows no significant difference in length for spawned and unspawned mussels ( $t=0.93$ ,  $p=0.36$ ), so the two experimental groups can be compared. Gonad index (GSI) values were used to select mussels that had massively spawned compared to partial

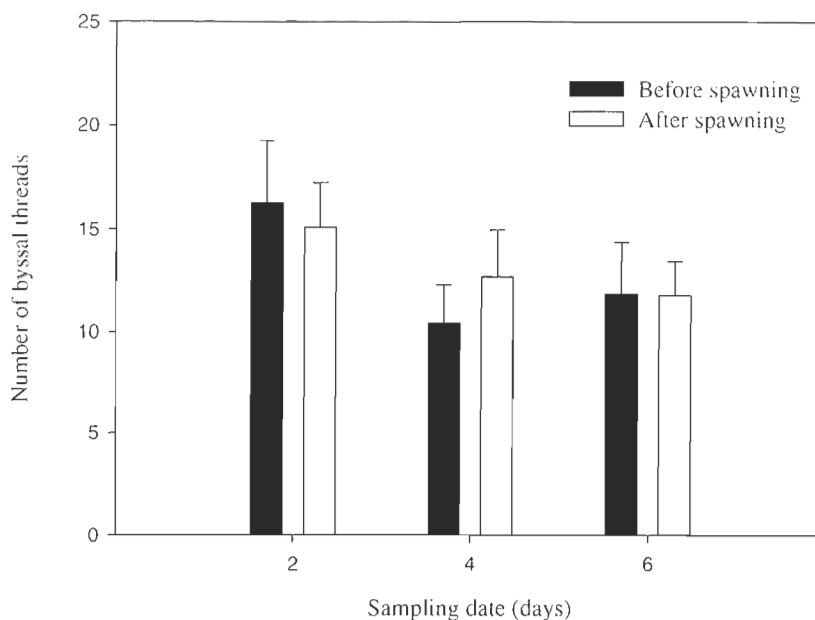
spawning ( $t=8.10$ ,  $p<0.001$ ). Our results discriminate 12 out of 20 mussels indicating massive spawning (Lachance et al. 2008) and 20 unspawned mussels.

**Table 1** : Mean values ( $\pm$ SE) of shell length (mm), gonadosomatic index (GSI) and statistical comparisons between experimental groups.

	Unspawned	Spawned	$t$	p
Shell length (mm)	$64 \pm 1$	$64 \pm 2$	0.93	0.36
GSI (mantle DW /whole tissue DW)	$0.35 \pm 0.03$	$0.21 \pm 0.02$	8.10	<0.001

### 2.2 Byssal thread production and diameter

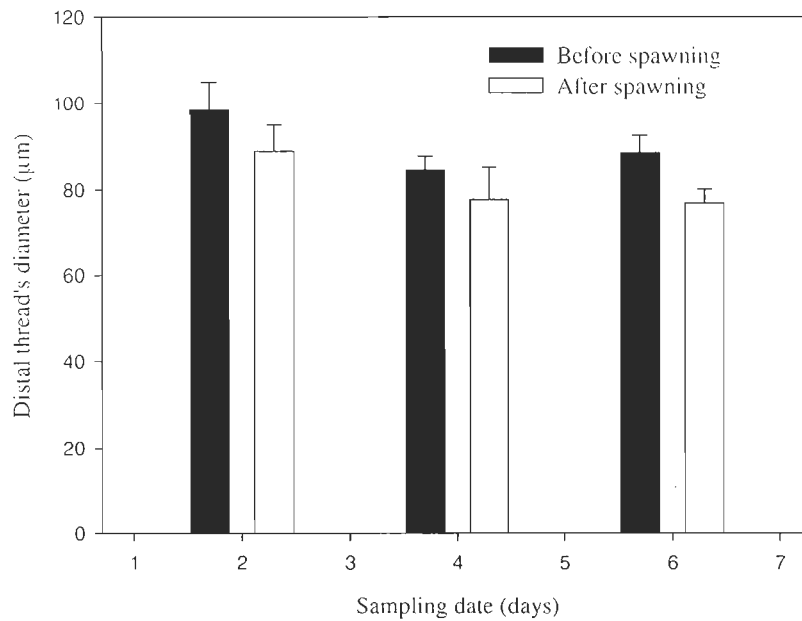
The influence of mussel spawning on the byssal thread production is illustrated in **Fig. 7**. Over a period of six days, the mean number of threads secreted by mussels after spawning was similar to unspawned mussels in these experimental conditions. There was no significant interaction ( $df=2$ ,  $F=0.12$ ,  $p=0.89$ ) and no effect of both spawning ( $df=1$ ,  $F=0.56$ ,  $p=0.46$ ) and sampling date ( $df=2$ ,  $F=0.37$ ,  $p=0.69$ ). The mean number of threads produced varied with values ranging from 10 to 17 threads in 48 hours (**Figure 7**).



**Figure 7** : Comparison of the number of byssal threads secreted (mean values + SE) by experimental unspawned and spawned mussels over a 6-day period.

Concerning the filament diameter, no significant interaction between “spawning x sampling dates” ( $F=0.10$ ,  $p=0.92$ ) was noted. The filament diameter, in contrast, was affected by the spawning ( $F=4.60$ ,  $p=0.03$ ) as seen in **Fig. 8**. The distal thread for unspawned mussels was larger (mean= $90.5 \mu\text{m}$ ) than that of spawned mussels (mean= $81.1 \mu\text{m}$ ) over the three sampling dates. A significant effect of time ( $F=3.28$ ,  $p=0.04$ ) was also observed as demonstrated by a higher diameter two days after spawning ( $p=0.02$  and  $p=0.04$ , respectively), but no difference was observed between the two last dates ( $p=0.77$ ). However, a large range of values was observed in the diameter of filaments sampled on a mussel on a given day. For example, the distal section diameter varied between  $75$  and  $169 \mu\text{m}$  for two byssal threads removed from the same mussels, the same day.





**Figure 8** : Comparison of the diameter of the distal section of byssal threads secreted (mean values + SE) by experimental unspawned and spawned mussels.

### 2.3 Mechanical properties

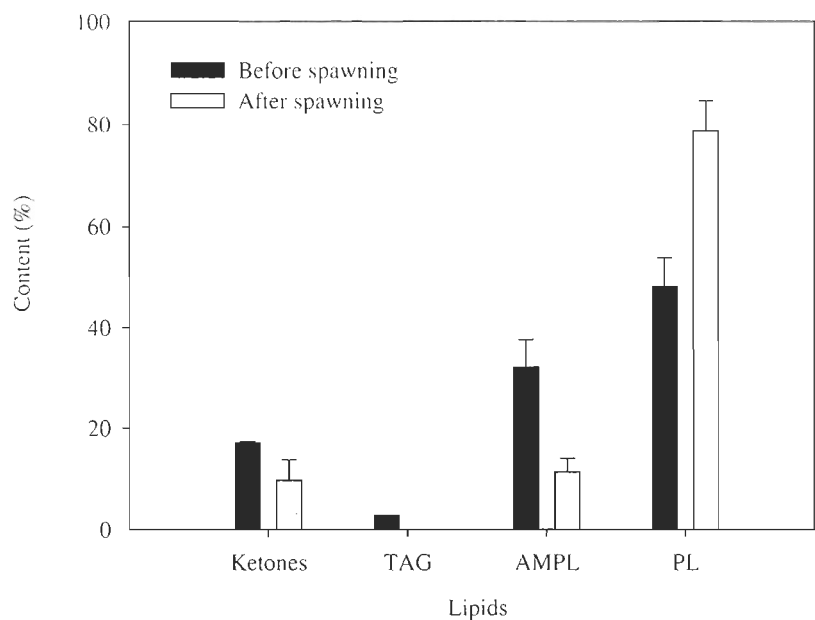
Throughout the experiment, average force values required to break the distal section varied within a narrow range of 0.28-0.37N for spawned and 0.33–0.43N for unspawned individuals. There was no significant interaction of both factors “spawning x sampling dates” ( $F=0.56$ ,  $p=0.57$ ), no effect of time ( $F=1.86$ ,  $p=0.16$ ) but a significant effect of spawning ( $F=7.80$ ,  $p=0.01$ ) has been observed (**Table 2**). The values of stress-at-break, strain-at-break and initial modulus were not statistically distinguishable between the two experimental groups. There was no interaction between both factors ( $p=0.56$ ,  $p=0.43$ , and  $p=0.69$ , respectively), no effect of time ( $p=0.88$ ,  $p=0.83$ , and  $p=0.55$ , respectively) and spawning ( $p=0.45$ ,  $p=0.17$  and  $p=0.25$ , respectively).

**Table 2** : Mechanical properties of the byssal threads (distal region) secreted by unspawned and spawned mussels. Mean values ( $\pm$ SE). Force by mussel was estimated by the mean of the number of thread secreted by each mussel multiplying by their average breaking force.

	Breaking force (N)	Strain at break (%)	Stress at break (MPa)	Initial modulus	Force by mussel (N)
Unspawned	$0.39 \pm 0,02$	$111 \pm 4$	$65 \pm 4$	$64 \pm 10$	$5.6 \pm 0.8$
Spawned	$0.31 \pm 0.02$	$102 \pm 4$	$69 \pm 5$	$45 \pm 8$	$4.9 \pm 0.7$

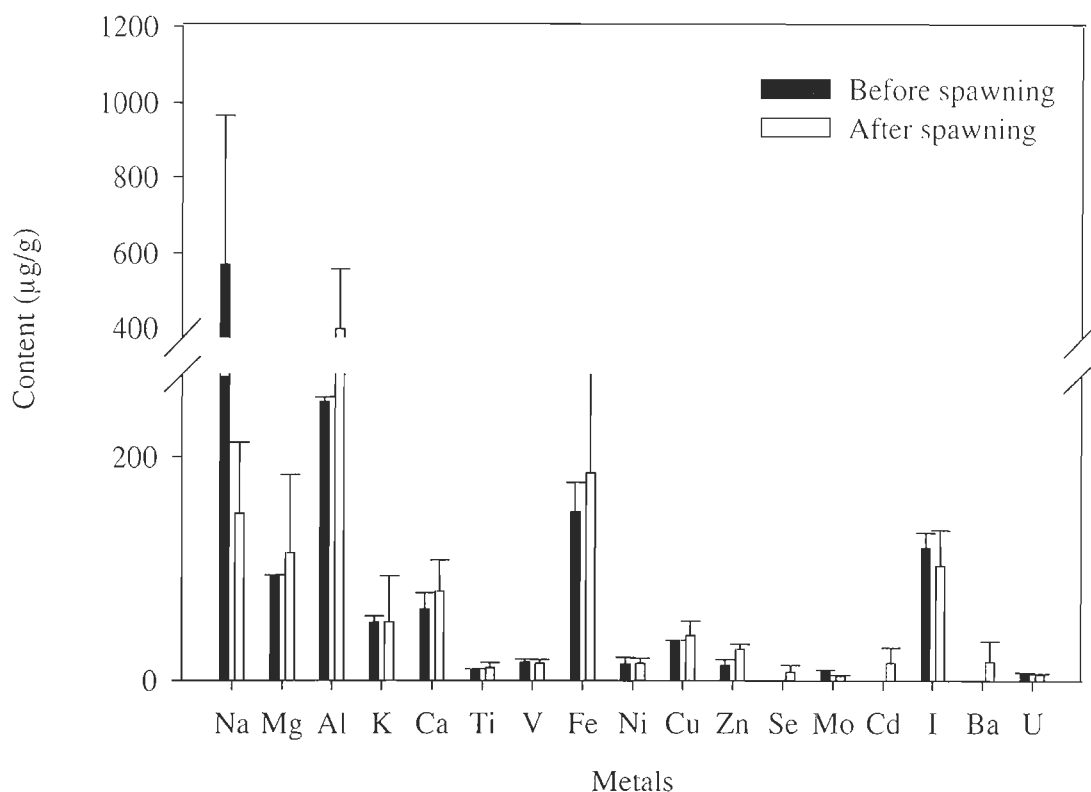
#### 2.4 Molecular composition

The byssus is characterized by a very low lipids' content with  $<0.05\%$  of its dry mass. They are mainly composed of phospholipids ( $>65\%$ ). Interestingly, mussel spawning had a significant effect on the lipids class composition (**Figure 9**). A higher percentage of phospholipids is detected in fibers secreted by spawned mussels ( $F=39$ ,  $p=0.003$ ), as well as lower proportions of ketones and AMPL ( $F=35$ ,  $p=0.004$  and  $F=10$ ,  $p=0.03$ , respectively).



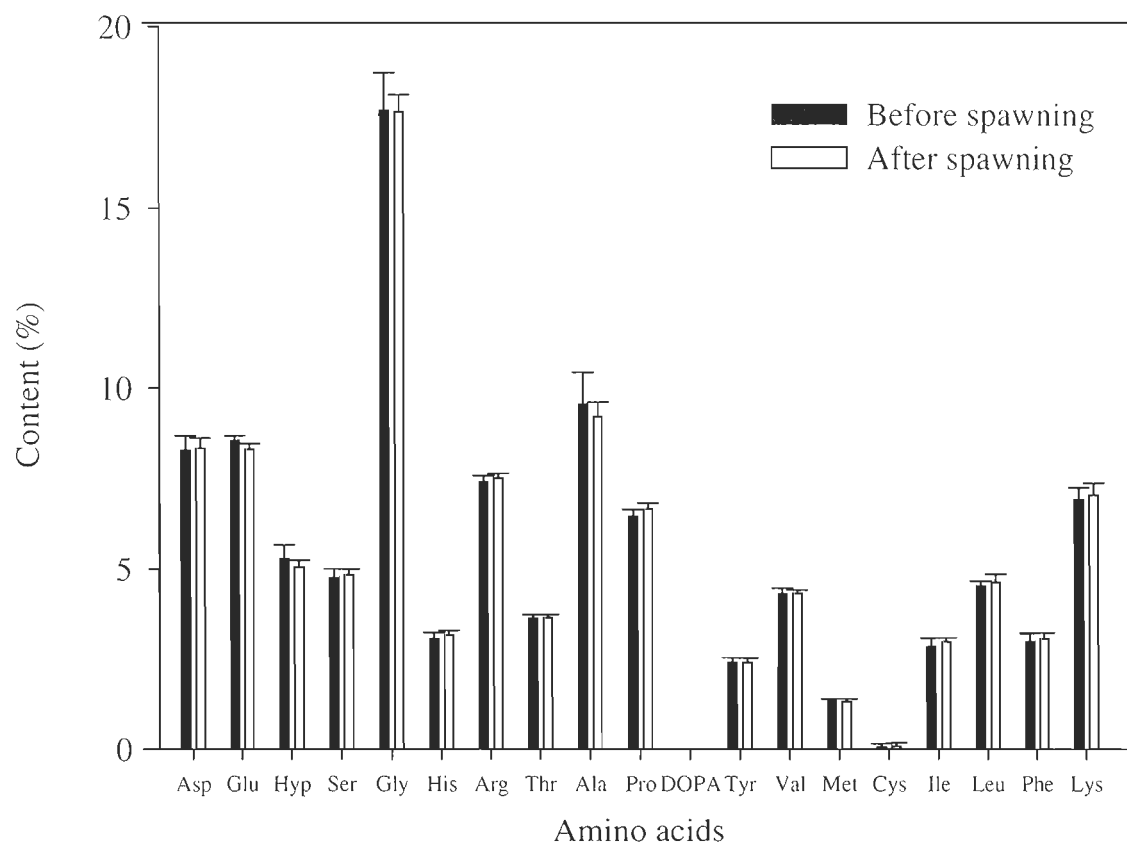
**Figure 9** : Lipids content of byssal threads according to spawning, considering distal sections (mean values + SE).

The metal composition of the byssal threads is presented in **Fig. 10**. The main elements detected in both groups were Na, Al, Fe, I, Mg, Ca, K and Cu. Their composition remained similar between threads produced before or after spawning ( $p > 0.05$ ). Toxic elements such as nickel (around  $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), cadmium (around  $16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), and uranium (around  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), were noted, as well as low concentrations of lead ( $< 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and arsenic ( $< 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (data not shown).



**Figure 10** : Metals composition of byssal threads according to spawning, considering distal sections (mean values + SE).

Finally, the amino acids composition of the distal thread regions produced by spawned and unspawned mussels was compared and showed no significant differences between the two groups (**Figure 11**). In both cases, glycine was the main amino acid in the fibers with 18% of the total residues analyzed, followed by alanine 9-10%, glutamine 8-9%, aspartic acid 8-9%, arginine 7.5%, lysine 7%, and proline 6-7%. Statistical analyses indicate no significant interaction between both factors ( $p > 0.05$ ) and no effect of time ( $p > 0.05$ ) except for proline ( $F = 5.72$ ,  $p = 0.04$ ). Byssal threads secreted after four days had a higher concentration of proline compared to day 2 and 6 ( $p = 0.02$  and  $p = 0.04$ , respectively) but no difference was observed between day 2 and 6 ( $p = 0.6$ ). A significant effect of spawning was also observed for proline and glutamine ( $F = 8.0$ ,  $p = 0.03$  and  $F = 7.3$ ,  $p = 0.04$ , respectively) with lower levels after spawning. Despite this significant differences, the variability between treatments are less than 6% ( $\Delta\text{Glu} = 3\%$ ,  $\Delta\text{Pro} = 3\%$ ).



**Figure 11** : Amino acids composition of byssal threads according to spawning (mean values  $\pm$  SE).

### ***E. DISCUSSION***

As the spawning of mussels requires a high energy demand (Seed and Suchanek 1992, Lemaire *et al.* 2006), Carrington (2002) suggested that the reproductive effort of mussels could influence the byssal thread production and the attachment strength of individuals. Indeed, it is likely that an energy trade off is required between the gamete production and the attachment strength of the individuals (Carrington 2002b, Moeser and *al.* 2006, Zardi and *al.* 2007).

In the present investigation, the spawning of the mussels *Mytilus edulis* in laboratory conditions was shown to contribute to the weakening of the byssal thread force at break, when all other environmental factors are controlled and maintained in the optimal condition for mussels (temperature, food quantity and quality, current and turbulence). The threads' diameter and the force required to break them were significantly lower in recently spawned mussels as compared to unspawned individuals. Moreover, despite the strong inter-individual variation and the great variability between threads from the same mussel in both groups, there was also a significant decrease in thread diameter as a function of time over a 48 hours period. Harvesting all the byssal threads every two days could create a stress in the mussels that affect the secretion process, resulting in a reduction of fiber diameter. However, although there were differences in the breaking force, data from stress-at-break, strain-at-break and initial modulus, which reflect threads' extensibility and rigidity, showed no major difference between the two experimental groups. The energetic trade-off between gamete production and tenacity as described by Carrington (2006) is probably responsible for this weakening. The spawning is a critical period for mussel farmers, especially at the end of the growth cycle, close to commercialization.

Many studies have focused on the number of anchoring filaments secreted by the mussels to explain the seasonal weakening of their attachment. They show a significant relationship between the number of byssal threads and the mussels' attachment strength (Lee *et al.* 1990, Bell and Gosline 1997, Carrington 2002, Babarro *et al.* 2008, Lachance *et al.* 2011). Surprisingly, here, spawning did not cause significant changes in the number of byssal threads secreted either by spawned or unspawned mussels over a 6-day period in the

laboratory. The small time scale of sampling in our study could mask a possible longer term effect. However, results obtained by Babarro et Reiriz (2010) with *M. galloprovincialis* showed significant differences in the number of filaments over the same sampling time, i.e. 6 days after spawning. Moeser et al. (2006) made the same observation in *M. edulis* on a longer time scale coupled with the influence of exogenous factors such as temperature and wave actions. However, they observed that changes in the number of secreted threads were mainly correlated with changes in water temperature (59%) while the gonad index associated with wave height explained only 20% of the variability in thread production. Moreover, several studies showed that the production of byssal threads varied between mussel species and also between populations from the same species (Young 1985, Bell and Gosline 1997, Seed and Richardson 1999). According to our results, the energy expenditure associated to spawning did not cause a difference in the number of filaments produced in laboratory conditions. In the same way, a recent study conducted showed no significant correlations between the number of threads produced and any of the biochemical energy components measured in *M. edulis* (Lachance et al. 2011). Our results suggest that under the conditions of spawning measured here, the number of threads secreted was independent of the energy reserves of the mussels contrary to byssal threads diameter. Overall, spawned mussels secreted less byssal material's in response to the energy expended during spawning only. It is obvious that the mussel attachment strength is not only related to the number of threads secreted (Moeser et al. 2006), but also to their quality (Smeathers and Vincent 1979, Bell and Gosline 1996, 1997). Indeed, Moeser and Carrington (2006) suggested that the energetic trade-off between gamete production and tenacity is linked to the quality rather than the quantity of threads produced seasonally. As shown by our results, mussels produce the same number of threads but the breaking force of each thread can be very different, especially as the threads' diameter measured in the same individual are not homogeneous.

In order to better understand the mechanisms that influence the mechanical properties of the byssus and its attachment, the biochemical composition of the filaments was examined. First, for metal composition, Vaccaro (2001) showed that the mechanical

behavior of the distal section is intimately connected to the presence of different intermolecular “bridges”, i.e. ionic bridging, disulfides and non-covalent interactions in the structure. Indeed, metal ions are used for cross-linking of byssal proteins (Monahan and Wilker 2004) by forming complexes with DOPA (Holten-Andersen et al. 2008). In our study, we observed the same major metal components with similar concentrations in both experimental groups. Yet, it was shown that small amounts of metals lead to a significant (2 times) increase in the hardness of the cuticle of the mussel *M. galloprovincialis* (Holten-Andersen et al. 2008). Our data show that spawning did not influence the metal composition that could influence the breaking force of the filament, although differences in attachment strength were observed. Nevertheless, the presence of toxic elements such as nickel and arsenic is very interesting because it suggests that the byssus is able to absorb or adsorb pollutants but also to store toxins (heavy metals) accumulated by the organism. Byssal threads could possibly be used as a diagnostic tool for determining exposure to environmental or industrial pollutants as done with human hair. Using these filaments as a way to detect trace metal exposure is appealing because it is easily and non-invasively sampled, transported, handled, and analyzed (Coombs and Keller 1981, Koide et al. 1982). Future studies should be conducted to verify this hypothesis.

As far as the lipids content is concerned, a previous study conducted by Cook (1970) on the distal part of the fiber reports that 8% of the dry mass of byssus were constituted from total lipids in *Mytilus edulis*. Surprisingly, our results reveal much lower concentrations for both groups, i.e. less than 0.05% of dry mass of byssus. Although the total lipids were mostly absent, there was a decrease in some lipids classes in the filaments of recently spawned mussels, precisely at the level of AMPL and ketones. Conversely, there are more phospholipids in the threads secreted post-spawn. However, as the lipids content was very low, their mechanistic influence on byssal threads strength seems very unlikely.

The amino acids composition was relatively similar between the spawned and unspawned individuals for at all sampling dates, except for glutamine, proline, and hydroxyproline. It is well established that proline and hydroxyproline are important



constituents of collagen in which they form, with glycine, a repeated triplet (Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>. This Gly-Pro-Hyp sequence is the most stabilizing tripeptide unit for the triple-helix conformation (Engel et al. 1977). To our knowledge, no information is available to identify the role and the importance of glutamine in the byssal alagen. However, crosslinking of metal ions to Glu cannot be ruled out since they can bind to Glu's amine group (Sajadi 2010). In contrast to the results obtained by Babarro (2010) with *M. galloprovincialis*, we observed no changes in basic amino acids, especially histidine and lysine, that could explain the weakening of the attachment force after spawning. Indeed, histidine-rich domains present in proteins have the ability to bind with metal, increasing byssal fiber stability and integrity (Lucas et al. 2002). On the other hand, we observed a larger amount of glutamine and aspartate in *M. edulis* as compared to *M. galloprovincialis*.

In conclusion, we examined the effects of the spawning event on the production, mechanical properties and biochemical composition of *Mytilus edulis* byssal threads. Our results demonstrate that the stress-at-break and the strain-at-break are not affected by spawning, which is consistent with the similarity of the values observed for the composition of the byssal threads in amino acids and metals. These mechanical properties are not affected by the diameter of byssus, contrary to the breaking force, which is consistent with the conclusion that the change in distal diameter is the main factor affected by spawning and is responsible for the weakening of byssal threads strength.

## ***F. ACKNOWLEDGEMENTS***

We would like to thank Giovanni Fabra for developing the technique for measuring byssal attachment strength. Bruno Myrand, Frédéric Byette and Alexandre Arnold are acknowledged for stimulating discussions and their valuable advice, as well as Bertrand Genard for his guidance with the statistical analyses, Iften Redjah for technical support and Michel Fournier for providing mussel from Moules de culture des Iles. Finally, we wish to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Réseau Aquacole du Québec for their financial support.



## CHAPITRE 2

### CONCLUSION

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'influence de la ponte sur la variabilité de la force d'attachement des moules de culture (*Mytilus edulis*). Les résultats obtenus en laboratoire ont montré que la ponte des moules contribue à l'affaiblissement de la force d'attachement des filaments de byssus en réduisant leur diamètre, mais sans altérer de façon majeure la composition moléculaire associée aux lipides, métaux et acides aminés. De plus, la contrainte et la déformation à la rupture ne sont pas affectées par la ponte ce qui est en accord avec la similitude des valeurs observées pour la composition en acides aminés et en métaux. Ces propriétés mécaniques n'étant pas affectées par le diamètre contrairement à la force à la rupture. Étonnamment, le nombre de filaments de byssus n'a pas été perturbé par la dépense d'énergie occasionnée lors de la ponte puisque qu'il est resté similaire dans les deux groupes expérimentaux. Cela suggère, d'une part, que le nombre de byssus sécrétés ne dépend pas de l'effort énergétique de la moule investi dans la ponte et d'autre part, que la force d'attachement n'est pas uniquement liée au nombre de filaments sécrétés pour se fixer à un substrat. Ces résultats sont en accord avec l'expérience que nous avons réalisée en milieu naturel, où nous avons démontré que l'affaiblissement de la force d'attachement des moules n'était pas liée à la quantité de réserves énergétiques accumulées dans la moule (Lachance et al. 2011). En effet, elle est également associée à la force individuelle de chaque filament qui résulte du diamètre et de la structure biochimique de la fibre. L'étude de la composition moléculaire de la partie distale a révélé une concentration en lipides quasi nulle, inférieure à 0,05% et essentiellement composée de phospholipides (plus de 65%). L'influence des lipides dans la force d'attachement semble donc négligeable. En revanche, certains métaux sont impliqués dans le comportement mécanique des fibres puisqu'ils forment des points de réticulation entre les protéines au niveau des zones riches en histidine (Vaccaro 2001). Pourtant, aucune différence permettant d'expliquer un affaiblissement de la force d'attachement n'a pu être établie en fonction de

la ponte par rapport à la composition métallique des filaments. Les éléments majeurs détectés dans les deux groupes sont Na, Al, Fe, I, Mg, Ca, K et Cu. Toutefois, la présence d'éléments toxiques comme le nickel et le cadmium montre le potentiel absorbant du byssus envers les métaux contaminants, néfastes pour la moule. Concernant la composition en acides aminés, elle s'est avérée relativement constante avant et après la ponte bien que des différences aient été observées pour la glutamine, la proline et l'hydroxyproline. Ces deux derniers (Pro, Hyp) sont des composés importants du collagène qui est présent en grande quantité dans le byssus. Cependant, d'après nos connaissances, le rôle et l'importance de la glutamine et/ou de l'acide glutamique (l'analyse en acides aminés ne discriminant pas la glutamine de l'acide glutamique) dans la structure du byssus restent inconnus. L'ensemble de ces résultats apporte néanmoins des connaissances importantes sur l'influence de la ponte en lien avec la variabilité de la force d'attachement des moules (*Mytilus edulis*) en culture. Par conséquent, la diminution radicale de la force d'attachement observée vers la fin du mois de juin est donc en partie liée à la ponte des moules qui coïncide avec la production de byssus de plus petit diamètre, en plus de l'influence négative de la température et de la turbulence (Lachance et al. 2008). Cette diminution du diamètre des filaments pourrait être due à une diminution de la quantité de matériel sécrété dans le canal pédieux ou à une contraction du pied qui réduirait le diamètre du canal.

Les résultats obtenus lors de cette étude fournissent de nouvelles connaissances permettant d'améliorer la production des mytiliculteurs. En effet, compte tenu de l'impact direct de la ponte sur le diamètre des brins de byssus et la force d'attachement des moules, des stratégies pourront être élaborées afin de réduire les risques de pertes par décrochage suite aux périodes de pontes. La manipulation des lignes par exemple (entretien, récolte...), devrait être effectuée avec précaution pendant cette période de faible attachement, surtout sur les boudins de moules de 2 ans, afin d'améliorer le rendement de la production. Un nettoyage des boudins serait préconisé avant la période de ponte dans le but d'éviter une trop grande accumulation d'algues sur les moules, ce qui épargnerait donc un poids supplémentaire pouvant accentuer le « dégrappage ». Il serait intéressant de vérifier

combien de jours sont nécessaires suite à la ponte pour que le diamètre des filaments de byssus revienne à la normale. Cela pourrait servir de guide pour les mytiliculteurs.

Cependant, il est important de rappeler que les conclusions de cette étude se limitent à la partie distale du byssus. Etant donné que la zone de fracture des byssus se situe généralement au niveau de la partie proximale et de la plaque (Bell et *al.*, 1996), des études devront être menées sur ces parties afin de mieux comprendre le ou les mécanismes aboutissant à l'affaiblissement de la force d'attachement du byssus en période de ponte.

La technique utilisée pour mesurer la force des filaments à l'aide du DMTA V (dynamic mechanical thermal analyser) a permis de comparer la force individuelle des filaments de façon standardisée, mais ne reflète pas la force d'attachement réelle de la moule dans sa globalité. De plus, l'interaction byssus/substrat, point névralgique de l'attachement, n'est pas prise en compte lors de la mesure. La technique pourrait donc être améliorée en effectuant la mesure dans de l'eau de mer à la place de l'eau distillée et en gardant le filament lié au substrat pendant la mesure. L'idéal serait de réussir à extraire le byssus dans son intégralité, sans le décrocher de son substrat et de mesurer la force nécessaire pour séparer les deux entités (byssus/substrat) en étirant à partir de la colonne (stem).

Toutefois, la technique de mesure utilisée dans cette étude a permis d'établir de façon précise des relations entre les propriétés mécaniques et la qualité individuelle des brins de byssus aboutissant à l'affaiblissement de la force d'attachement de *Mytilus edulis*. Les conditions de mesure et la configuration de l'instrument (vitesse de déformation, temps de l'analyse, température, alignement de l'échantillon, force de fermeture des mâchoires, et tension initiale) ont été adaptées de façon optimale pour la détermination des propriétés mécaniques des byssus de moules. Les résultats obtenus aident à mieux comprendre l'impact de la ponte sur la rupture des byssus. Enfin, il serait intéressant de comparer la structure et les propriétés de byssus provenant d'espèces différentes afin d'obtenir une meilleure vue d'ensemble.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alfaro A. C. (2005), Byssal attachment of juvenile mussels, *Perna canaliculus*, affected by water motion and air bubbles. *Aquaculture* 255:357–361.
- Babarro J., Reiriz M. (2010), Secretion of byssal threads in *Mytilus galloprovincialis*: quantitative and qualitative values after spawning stress. *J. Comp. Physiol.* 180: 95-104.
- Babarro J. M. F., Reiriz M. J. F., Labarta U. (2008), Secretion of byssal threads and attachment strength of *Mytilus galloprovincialis*: the influence of size and food availability. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 88: 783-791.
- Bairati A., Vitellaro-Zuccarello L. (1976), The ultrastructure of the byssal apparatus of *Mytilus galloprovincialis*. IV. Observations by transmission electron microscopy. *Cell. Tissue Res.* 166: 219-234.
- Beaumont A. R., Hawkins M. P., Doig, F. L., Davies I. M., Snow M. (2008), Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 367, 100-110.
- Bell E. C., Gosline J. M. (1996), Mechanical design of mussel byssus: material yield enhances attachment strength. *J. Exp. Biol.* 199:1005–1017.
- Bell E. C., Gosline J. M. (1997), Strategies for life in flow: tenacity, morphometry, and probability of dislodgement of two *Mytilus* species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159: 197–207.
- Benedict, C., Waite, J. H. (1986), Composition and ultrastructure of the byssus of *Mytilus edulis*. *J. Morph.*, 189: 261-270.
- Bourque F., Myrand B. (2006), Étude descriptive du dégrappage en milieu lagunaire aux Îles de-la-Madeleine. MAPAQ, DIT, Rapport de R-D. no 152. 9 pp.



- Brazeo S. L., Carrington E. (2006), Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *Biol. Bull.* 211: 263-274.
- Carrington E. (2002a), Seasonal variation in the attachment strength of the blue mussel: causes and consequences. *Integr. Comp. Biol.* 47: 1723–1733.
- Carrington E. (2002b), The ecomechanics of mussel attachment: from molecules to ecosystems. *Integr. Comp. Biol.* 42: 846–852.
- Clarke M. (1999), The effect of food availability on byssogenesis by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *J. Molluscan Stud.* 65: 327–333.
- Cook M. (1970), Composition of mussel and barnacle deposits at the attachment interface. In *Adhesion in biological systems* (Manly, R.S. ed.), pp. 139-150. Academic Press, New York.
- Coombs T. L., Keller P. J. (1981), *Mytilus* byssal threads as an environmental marker for metals. *Aquatic Toxicol.* 1: 291–300.
- Coyne K. J., Qin, X. X., Waite, J. H. (1997), Extensible collagen in mussel byssus: A natural block copolymer. *Science*, 277: 1830-1832.
- Cranford P., Dowd M., Grant J., Hargrave B., McGladdery S. E. (2003), A scientific review of potential environmental effects of aquaculture in aquatic ecosystems. Vol. 1. Fisheries and Oceans Canada. Report 0706-6457 no. 2450.
- Engel J., Chen H. T., Prockop D. J., Klump H. (1977), *Biopolymers* 16: 601–622.
- FAO: Food and Agriculture Organization. « Fisheries & aquaculture » Dans *FAO*. En ligne. <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_edulis/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis/en)>. Consulté le 06 février 2012.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Fréchette M., Bergeron P., Gagnon P. (1996), On the use of self-thinning relationships in stocking experiments. *Aquaculture*, 145: 91-112.

- Gosline J., Lillie M., Carrington E., Guerette P., Ortlepp C., Savage K. (2002), Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357: 121-132.
- Hagenau A., Scheidt H. A., Serpell L., Huster D., Scheibel T. (2009), Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Macromol. Biosci.* 9: 162-168.
- Harrington M. J., Waite J. H. (2007), Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *J. Exp. Biol.* 210: 4307-4318.
- Hickman R. W. (1992), Mussel cultivation. in E. M. Gosling, (ed.) *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Galway., 465-504.
- Holten-Andersen N., Waite J. H. (2008), Mussel-designed protective Coatings for compliant substrates. *J. Dental Res.*, 87: 701.
- Hunt H. L., Scheibling R. E. (2001), Predicting wave dislodgement of mussels: variation in attachment strength with body size, habitat, and season. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 213: 157-164.
- Hunt H. L., Scheibling R. E. (2002), Movement and wave dislodgment of mussels on a wave-exposed rocky shore. *Veliger*, 45:273-277.
- Inglis G. J., Gust N. (2003), Potential indirect effects of shellfish culture on the reproductive success of benthic predators. *The J. of Applied Ecol.*, 40: 1077-1089.
- Koide M., Lee D. S., Goldberg E. D. (1982), Metal and transuranic records in mussel shells, byssal threads and tissues, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 15: 679-695.
- Lachance A.-A., Myrand B., Tremblay R., Koutitonsky V., Carrington E. (2008), Biotic and abiotic factors influencing attachment strength of blue mussels *Mytilus edulis* in suspended culture. *Aquat. Biol.*, 2: 119-129.
- Lachance A.-A., Hennebicq R., Myrand B., Sévigny J.-M., Kraffe E., Marty Y., Marcotte I., Tremblay R. (2011), Biochemical and genetic characteristics of suspension-cultured mussels (*Mytilus edulis*) in relation to byssal thread production and losses by fall-off. *Aquat. Living Resour.*, 24: 283-293.

- Lee C. Y., Lim S. S. L., Owen M. D. (1990), The rate and strength of byssal reattachment by blue mussels (*Mytilus edulis* L). *Can. J. Zool.* 68: 2005–2009.
- Lemaire N., Pellerin J., Fournier M., Girault L., Tamigneaux E., Cartier S., Pelletier E. (2006), Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261: 729–751.
- Lucas J. M., Vaccaro E., Waite J. H. (2002), A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* 205: 1807–1817.
- Mallet A. L., Carver C. A. E. (1991), An assessment of strategies for growing mussels in suspended culture. *J. Shellfish Res.* 10: 471–477.
- Mallet A, Myrand B (1995), The culture of the blue mussel in Atlantic Canada. In: Boghen AD (ed) *Cold water aquaculture in Atlantic Canada*, 2nd edn. CIRRD, University of Moncton, Moncton, NB, p 257–298.
- Mahéo R. (1970), Etude de la pose et de l'activité de sécrétion du byssus de *Mytilus edulis* L. *Cah. Biol. Mar.* XI: 475–483.
- M.A.P.A.Q. 2002. État de la mariculture au Québec, p. 39. MAPAQ, SODIM, RMQ, Emplois Québec, Comité sectoriel de main-d'oeuvre des pêches maritimes.
- M.A.P.A.Q. La moule bleue *Mytilus edulis* : technique d'élevage. Dans *MAPAQ*. En ligne. <[http://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Publications/moule\\_bleue.pdf](http://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Publications/moule_bleue.pdf)>. Consulté le 06 février 2012.
- McDowell L. M., Burzio L. A., Waite J. H., Schaefer J. (1999), Rotational echo double resonance detection of cross-links formed in mussel byssus under high-flow stress. *J. Biol. Chem.* 274: 20293–20295.
- McKindsey C. W., Archambault P., Callier M. D., Olivier F. (2011), Influence of suspended and off-bottom mussel culture on the sea bottom and benthic habitats: A review. *Can. J. Zool.* 89: 622–646.
- Moeser G. M., Carrington E. (2006), Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *J. Exp. Biol.* 209: 1996–2003.

- Moeser G. M., Leba H., Carrington E. (2006), Seasonal influence of wave action on thread production in *Mytilus edulis*. J. Exp. Biol. 209: 881–890.
- Monahan J., Wilker J. J. (2004), Cross-linking the protein precursor of marine mussel adhesives: bulk measurements and reagents for curing. Langmuir 20:3724–3729.
- Moreau V., Tremblay R., Bourget E. (2005), Distribution of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* on the Gaspé coast in relation to spatial scale. J. Shellfish Res. 24: 545-551.
- Myrand B., Guderley H., Himmelman J. H. (2000), Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. Mar. Ecol. Prog. Ser. 197: 193-207.
- Myrand B., Tremblay, R., Sévigny J.-M. (2009a), Decreases in multi-locus heterozygosity in suspension-cultured mussels (*Mytilus edulis*) through loss of the more heterozygous individuals. Aquaculture 295: 188-194.
- Myrand B., Tremblay R., Sévigny J.-M. (2009b), Impact of suspension culture using mesh sleeves on genetic characteristics of *Mytilus edulis* L. in Canada. Aquaculture 291: 147-153.
- Myrand B., Tremblay R., Sévigny J.-M. (2002), Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. J. Hered. 93: 238-248.
- Nutrocean, [www.nutrocean.com/fr/produits-micro-algues.html](http://www.nutrocean.com/fr/produits-micro-algues.html), Consulté le 2 novembre 2011.
- Parrish C. (1987), Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan Flame Ionization detection. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44: 722–731.
- Pelc M., Alexander R. R. (1999), Salinity and sediment-mediated byssal thread production by *Mytilus edulis* Linnaeus and *Geukensia demissa* Dillwyn from New Jersey salt marshes. J. Shellfish Res. 18: 375-384.
- Penney R. W., Hart M. J., Templeman N. D. (2007), Shell strength and appearance in cultured blue mussels *Mytilus edulis*, *M-trossulus*, and *M-edulis* x *M-trossulus* hybrids. North American Journal of Aquaculture 69: 281-295.

- Price H. A. (1980), Seasonal variation in the strength of byssal attachment of the common mussel *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Assoc. UK 60: 1035–1037.
- Price H. A. (1982), An analysis of factors determining seasonal variation in the byssal attachment strength of *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Assoc. UK 62: 147–155.
- Price H. A. (1983), Structure and formation of the byssus complex in *Mytilus* (mollusca bivalvia). Moll. Stud. 49: 9-17.
- Qin X. X., Waite J. H. (1995), Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*, J. Exp. Biol. 198: 633–644.
- Qin X. X., Waite J. H. (1998), A potential mediator of alagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 10517–10522.
- Sajadi S.A.A. (2010), Metal ion-binding properties of L-glutamic acid and L-aspartic acid, a comparative investigation Nat. Sci. 2: 85-90.
- Seed R., Richardson C. A. (1999), Evolutionary traits in *Perna viridis* (Linnaeus) and *Septifer virgatus* (Wiegmann) (Bivalvia: Mytilidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 239: 273–287.
- Seed R., Suchanek T. H. (1992), Population and community ecology of *Mytilus*. In: Gosline EG (ed) The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics, and culture. Elsevier, Amsterdam, p 87–169.
- Smeathers J. E., Vincent J. F. V. (1979), Mechanical properties of mussel byssus thread. J. Mollus. Stud. 45: 219–230.
- Statistique-Canada. 2008. Statistiques d'Aquaculture. In C. 23-222-X. www.statcan.gc.ca. Ministre de l'industrie. Consulté le 20 décembre 2011.
- Tremblay R., Myrand B., Sevigny J.-M. (1998), Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) in the Magdalen Islands (southern Gulf of St. Lawrence, Canada). J. Shellfish Res. 17: 1191-1202.

- Vaccaro E., Waite J. H. (2001), Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: A self healing biomolecular material, *Biomacromolecules* 2: 906-911.
- Waite J. H., Qin X.-X. and Coyne K. J. (1998), The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol.* 17: 93-106
- Waite J. H. (1983), Adhesion in byssally attached bivalves. *Biol. Rev.* 58: 209-231.
- Young G. A. (1985), Byssus-thread formation by the mussel *Mytilus edulis*: effects of environmental factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24: 261-271.
- Zardi G. I., McQuaid C. D., Nicastro K. R. (2007), Balancing survival and reproduction: seasonality of wave action, attachment strength and reproductive output in indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 334: 155-163.







