



Université du Québec
à Rimouski

PERFORMANCES PHYSIOLOGIQUES ET FORCES D'ATTACHEMENT DES MOULES TRIPLOÏDES

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en océanographie

en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor

PAR

© **KEVIN OSTERHELD**

Soutenue en Avril 2023

Composition du jury :

Céline Audet, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski

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

Luc Comeau, codirecteur de recherche, Pêche et Océan Canada, Moncton

Benfey Tillmann, examinateur externe, Université du Nouveau Brunswick

Tiago Hori, examinateur externe, Atlantic Aqua Farms, Île-du-Prince-Édouard

Dépôt initial le 19 décembre 2022

Dépôt final le 28 Juin 2023

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 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.

Je dédie cette thèse de Doctorat à mes parents, Maria-Chiara Osterheld et Rüdiger Osterheld, qui m'ont toujours encouragé et soutenu ; à ma petite sœur, Carla Osterheld, qui m'a toujours inspiré par sa ténacité et sa passion dans ce qu'elle entreprend ; et à la femme de ma vie, Mathilde Marchais, qui non seulement m'a toujours encouragé et soutenu, mais a aussi changé ma vie pour toujours.

" - *Qu'est-ce qui peut être plus dangereux que les sorts, Maître Gatien ?*

- *La vérité. Les hommes s'aveugleraient avec des tisons ardents plutôt que de la voir en face.*"

David Gemmell, Dark Moon

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'est pas seulement le résultat d'un travail acharné, mais c'est la rencontre de nombreuses personnes fantastiques tout au long de ma vie qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à accomplir mes objectifs. C'est grâce à eux que j'ai eu le privilège de produire cette thèse et je suis pleinement conscients que sans eux je n'aurais jamais réussi tout ça.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur Réjean Tremblay. Je n'ai pas assez de mots pour exprimer à quel point je te suis reconnaissant pour ta supervision et ton soutien tout au long de ce doctorat. Tu étais toujours prêt à me prodiguer de précieux conseils et une aide très appréciée. Tu as toujours su me mettre en confiance concernant mon travail malgré mon syndrome de l'imposteur. Grâce à toi j'ai eu la chance de pouvoir faire mon doctorat dans les meilleures conditions. Tu t'arrange tout le temps pour être disponibles pour chacun de tes étudiants, malgré un emploi du temps plus que chargé. Réjean, tu auras été pour moi plus qu'un superviseur, tu auras été un mentor ainsi qu'un modèle de chercheur que j'aspire à devenir.

À mon co-directeur Luc Comeau. Tu as toujours été encourageant et à toujours eu des propos extrêmement positifs envers mon travail, ce qui m'a donné une grande confiance dans ce que je faisais et m'a motivé à travailler toujours plus fort. Tu m'as aussi aidé à traverser de nombreux processus académiques et administratifs difficiles et as fait tout ce que tu pouvais pour m'aider à obtenir des ressources financières lorsque mon financement s'est terminé, me permettant de me consacrer entièrement sur ma thèse. Je te suis très reconnaissant pour tout ce que tu as fait pendant mon doctorat.

Je tiens à remercier Tiago Hori pour son aide et son soutien durant ma thèse. Ton intérêt pour ce projet a été grandement apprécié et m'a donné la confiance de penser que mon projet pourrait avoir de réelles répercussions et un impact direct sur la mytiliculture. Cela a été une vraie source de motivation et m'a poussé à travailler encore plus. Aussi, savoir que tu considères que le travail accompli vaut la peine d'être poursuivi et pourrait avoir des implications concrètes dans le milieu de l'aquaculture me rend particulièrement fier d'avoir eu la chance de travailler sur ce projet de doctorat.

À John Davidson pour son aide durant mon doctorat. Tu m'as aidé plus que je ne l'aurais espéré. Tu étais toujours prêt à expédier des moules à Rimouski, et quand je suis venu sur l'Île-du-Prince-Édouard, non seulement tu venais tous les jours à l'écloserie où je travaillais, même si cela signifiait plusieurs heures de route, mais tu m'as également emmené visiter l'île, me permettant de me faire de beaux souvenirs de ce séjour trop court sur l'Île-du-Prince-Edward. J'ai énormément apprécié nos discussions et ton implication dans ce projet, c'était très enthousiasmant.

Je tiens à remercier Atlantic Aqua Farms, le ministère des Pêches et des Océans, ainsi que Ressources Aquatiques Québec pour leur soutien financier durant ma thèse.

À mon amie Nathalie Gauthier. Je tiens à te remercier du fond du cœur. Non seulement pour ton aide très appréciée durant ma thèse, et je dois avouer que je n'aurais jamais réalisé cette thèse sans ton aide. Je veux également te remercier pour les rires que nous avons partagés en travaillant, les belles discussions que nous avons eues, Ton petit grain de folie qui matchait si bien avec le mien. Nathalie, tu es aussi extrêmement compréhensive et tu

m'as toujours prodigué de bons conseils personnels pendant les périodes les plus difficiles de ces cinq années. Ce fut un plaisir de travailler avec toi et je sais que je chérirai ces souvenirs.

Je tiens à remercier Élodie Bouchard, Clara Lagarrigue et Flavie Perron de m'avoir aidé lors de mes travaux de laboratoire. Leur aide a été grandement appréciée et un énorme soulagement durant les étés assez occupés. En plus d'aider, leur sourires et plaisanteries ont rendu le travail de laboratoire beaucoup plus joyeux et fun.

Je souhaite également remercier Christian Pellerin de m'avoir laissé accéder à son laboratoire à Montréal afin de faire les analyses de tensiométrie. Son aide et ses précieux conseil ainsi que son accueil chaleureux m'ont énormément aidé à comprendre et traiter les données obtenues et ainsi à mieux appréhender le comportement mécanique des fibres de byssus. Je souhaite aussi remercier sincèrement Isabelle Marcotte, Alexandre Arnold, et José Babbaro pour leur aide et leurs précieux conseils, et tout particulièrement pour la section d'analyse de spectroscopie RMN qui n'aurait pas été possible sans eux.

Je tiens à remercier Marine Holbach pour ses conseils et son soutien durant mon doctorat. Elle m'a aidé à travers de nombreux processus administratifs différents et a été à l'écoute des problèmes que j'ai pu traverser.

Un merci particulier à Martine Belzile, la secrétaire de l'ISMER qui depuis mon arrivé à l'ISMER en 2012, n'a pas cessé de m'aider dans toutes les démarches administratives que j'ai rencontrées. Toujours de bonne humeur, elle se préoccupe énormément des étudiants. L'ISMER peut s'enorgueillir d'avoir une telle personne au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier mon ami d'enfance Stéphane Bianco. Cela peut sembler fou, mais quand nous avons tous les deux environ 8 ans, nous avons décidé que nous voulions devenir biologistes marins. Cela a pris du temps et j'ai fait quelques détours, mais aujourd'hui je l'ai fait, et d'une certaine manière, je sais que je te dois beaucoup pour cela. Tu as été le premier à me parler d'océanographie et je ne l'ai jamais oublié.

À Alain Degrace, les membres de la fridje, les UQARIens, ainsi qu'à tous les gens que j'ai rencontrés à la Ligue d'improvisation de Rimouski je veux vous dire un gros merci. Découvrir et apprendre l'improvisation théâtrale avec vous tous a été l'une des plus belles expériences de ma vie. Vous m'avez aidé à découvrir de nouvelles facettes de ma personnalité et à me développer d'une manière que je ne pensais pas possible. Vous m'avez aidé à avoir confiance en moi et à sortir de ma zone de confort. Jouer avec vous sur scène toutes les semaines a été un immense plaisir qui a participé à forger l'homme que je suis aujourd'hui. De toutes ces personnes, je tiens à dire un merci particulier à Caroline Lambert, Catherine Duval-Guevin, Alex Thériault, Vincent Fournier, Claudia Maltais et Félix Jaques. Vous êtes tous des personnes extraordinaires et de grands improvisateurs. Je suis heureux de vous appeler mes amis.

Je tiens à remercier mes précieux amis Sophie Robert, Martin Debofle, Élodie Libert, Gaël Lafenêtre, Sarah-Béatrice Bernier, Gwenaëlle Gremion, Sarah Brown-Vuillemin, Véronique Potvin, et Quentin Duboc. Vous avoir comme amis durant cette thèse a été un privilège et un grand plaisir. J'ai apprécié tous les moments passés ensemble. Cinq ans pour une thèse, ça peut paraître long, mais avec des amis comme vous, c'est passé en un clin d'œil.

À Loïc et Mélanie Spinazza, je tiens à vous remercier d'être resté les mêmes malgré la distance. Vous m'avez accepté et m'avez fait me sentir à ma place lors de notre Bachelor à l'Université de Lausanne. Aujourd'hui, bien qu'une grande distance nous sépare, on a su

garder le contact et rester proche. Je considère comme un cadeau le fait de vous avoir rencontré et j'espère que nous resterons amis quoi qu'il arrive dans nos vies.

Aux membres du groupe LÉA, merci pour votre soutien, pour les rires, mais aussi pour les discussions enrichissantes et les bons conseils que vous m'avez donnés tout au long de mon doctorat. C'était un plaisir que d'apprendre à vous connaître.

A mes parents, Rüdiger et Maria-Chiara Osterheld, je ne pense pas que je pourrais jamais vous exprimer à quel point je vous suis reconnaissant pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi. Depuis le jour de ma naissance, vous n'avez jamais cessé de faire passer mon intérêt avant le vôtre. Vous m'avez donné la vie la plus confortable que l'on puisse espérer. Vous m'avez donné une éducation mais surtout vous m'avez donné un sens moral et la capacité de prendre des décisions que je considère juste et digne. Vous m'avez encouragé à étudier dur pour que je puisse choisir ce que je voulais faire de ma vie. Quand je ne comprenais pas certaines choses, vous restiez tard pour travailler avec moi et m'aider. Vous m'avez aidé à devenir une meilleure personne et j'espère qu'un jour je réussirai à être l'homme que vous voyez en moi. Vivre loin de vous est parfois difficile mais je pense que cela m'a aidé à comprendre à quel point j'ai de la chance d'avoir des parents comme vous. Je vous aime.

À ma sœur Carla, j'ai toujours pensé que je devais te protéger et prendre soin de toi, mais avant que je ne m'en rende compte, tu es devenue une femme incroyable. Je suis toujours impressionné de voir à quel point tu peux travailler dur pour réaliser tes ambitions. Tu es devenue quelqu'un avec de grandes valeurs morales et tu te bats pour les préserver et défendre les causes auxquelles tu crois. Je suis fier d'être ton frère et je t'aime.

A ma fiancée Mathilde Marchais. Un merci ou un je t'aime seraient loin d'exprimer ce que je ressens pour toi. Tu n'es pas seulement la fille que j'aime et que j'aimerai toujours, tu es surtout ma meilleure amie et mon monde. Chaque moment que je passe avec toi semble ne durer qu'un instant même si je souhaiterais qu'ils durent pour toujours. Tu es la personne qui me connaît le mieux, en fait tu me connais mieux que je ne me connais moi-même. Tu me comprends, tu me réconfortes et tu m'aides à me débarrasser de mes peurs. Quand je suis à tes côtés, le monde semble meilleur. Tu vois le bien chez les gens et tu fais de moi une meilleure personne. Grâce à toi je vois la vie avec des yeux différents, et je serai toujours reconnaissant de t'avoir rencontrée. Tu sais me rassurer et m'aider à traverser les moments difficiles. T'avoir à mes côtés a fait de cette thèse un plaisir, à chaque fois que je commençais à stresser, tu étais là pour m'apaiser. Je manque de mots pour exprimer à quel point je t'aime, mais je travaillerai chaque jour pour te rendre heureuse et t'épargner des ennuis et de la tristesse. Je t'aime mon cœur !

RÉSUMÉ

La mytiliculture est une ressource économique importante pour le Canada, avec par exemple, une production de 26 000 tonnes en 2019 pour une valeur de plus de 43 millions de dollars. Cependant, une cause majeure de perte de production pour les mytiliculteurs provient du détachement des moules au cours de leur croissance. Ce phénomène est particulièrement important durant la saison de reproduction. En effet, les moules investissent la majeure partie de leur énergie dans la reproduction et ont donc moins d'énergie pour la byssogenèse. Cela conduit à un affaiblissement du byssus, qui peut ultimement mener au détachement des moules. De tels détachements peuvent considérablement réduire la productivité des mytilicultures et résulter en la perte de plus de 50% de la production. Récemment, il y a eu un intérêt croissant pour le développement des écloséries de moules et plus spécifiquement pour la production de moules triploïdes. En effet, il est connu que la triploïdie tend à réduire la fertilité des bivalves et peut même produire des bivalves entièrement stériles qui ont plus d'énergie à investir dans leur croissance et d'autres tissus vitaux (par exemple le byssus). L'objectif principal de cette thèse de doctorat était donc de valider les effets de la triploïdie chez *Mytilus edulis*, notamment concernant ses capacités de reproduction et d'attachement, ainsi que les potentiels impacts sur la physiologie et le métabolisme des moules. De plus, le développement de techniques de production de moules triploïdes dans des conditions d'écloserie était aussi un aspect important de ce projet.

Le premier objectif de cette thèse consistait à développer des techniques efficaces d'induction de la triploïdie, applicables dans des conditions d'écloserie par un personnel non spécialisé. Afin d'induire la triploïdie, il a été décidé d'inhiber l'extrusion du second globule polaire d'œufs fécondés. Des traitements à chaud ou à froid ont été appliqués, ainsi que des traitements chimiques en utilisant de la 6-(Diméthylamino)purine (6-DMAP). De plus, l'efficacité des traitements a été comparée en fonction de leur moment d'application (post-fécondation). Les résultats ont montré que le traitement des œufs à 17 minutes post-fécondation avec 400 μM de 6-DMAP, a induit les plus forts taux de triploïdie avec plus de 90% d'induction. De plus, les larves triploïdes ont montré un avantage de croissance significatif jusqu'à la fin de l'étude, au moment de leur fixation.

Le second objectif de cette thèse portait sur l'étude de la production et les propriétés mécaniques des fibres de byssus, chez des moules *Mytilus edulis* de petite taille (< 30 mm), avant les premiers investissements en reproduction. La production de byssus a été stimulée en plaçant les moules dans un canal hydrodynamique pendant 3 jours. À la fin des 3 jours, les fibres ont été comptées, collectées, puis des analyses de tensiométrie ont été appliquées sur chaque fibre. Les résultats ont montré que bien que les moules n'investissaient pas encore massivement de l'énergie en reproduction, les triploïdes produisaient significativement plus

de fibres (65%) que les diploïdes, avec des propriétés mécaniques altérées et notamment une augmentation du module de Young (i.e. augmentation de l'élasticité de la fibre) de 45% chez les triploïdes. De plus, les moules triploïdes avaient des taux de filtrations et de potentiel de croissance supérieurs de respectivement, 40% et 260% comparés aux diploïdes.

Le troisième objectif visait à comparer les performances reproductrices des moules diploïdes et triploïdes dans deux groupes de tailles différentes (< 30 mm et > 50 mm). Les résultats n'ont pas montré d'investissement reproductif important chez les moules < 30 mm ni de différence entre les diploïdes et triploïdes pour ce groupe de taille. En revanche, les moules > 50 mm ont montré une réduction de l'investissement de reproduction chez les triploïdes, ainsi qu'une maturation incomplète des gamètes, des signes de résorption des gamètes et un sexe-ratio fortement altéré avec une absence de femelles.

Le quatrième objectif était de comparer la production, les propriétés mécaniques, ainsi que la composition du byssus de moules de taille commercialisable (> 50 mm). La production de byssus et les analyses des propriétés mécaniques ont été faites selon la même méthodologie que pour le 2ème objectif. La composition en acides aminés et métaux des fibres a également été analysée. Les résultats ont montré des tendances similaires chez les moules > 50 mm avec les résultats présentés en lien avec le deuxième objectif. La composition et la structure en acides aminés des fibres n'étaient pas significativement différentes entre les 2 groupes. Cependant, certains métaux, tels que le B, Cu, SR, Os, W, Ag, Nb, Bi, et Tl étaient en concentration plus importante dans le byssus des moules diploïdes. Les moules triploïdes ont montré une augmentation du taux de filtration, du potentiel de croissance, ainsi que de la résistance de la coquille de respectivement 48%, 57%, 40%.

Ensemble, les résultats de cette étude montrent un fort potentiel des moules triploïdes pour l'aquaculture, avec une croissance augmentée, la production de plus de fibres de byssus ayant des propriétés mécaniques supérieures, mais également moins d'investissement en reproduction et potentiellement plus d'énergie disponible pour d'autres activités métaboliques. Ainsi, la production de moules triploïdes pourrait réduire les pertes dues au détachement et augmenter les taux de production grâce à une croissance supérieure et une meilleure survie.

Mots clés : Triploïdie, Byssus, *Mytilus edulis*, Bivalve, Attachement, Reproduction, Filtration, Potentiel de croissance, Croissance

ABSTRACT

Mussel farming is an important economic resource for Canada accounting for a production of 26,000 tonnes produced in 2019 and a value over \$43 million. A major cause of loss of production for mussel farmers originates from the fall-off of mussels during their growth. This phenomenon is particularly important during the reproductive season since mussels invest most of their energy in reproduction and therefore have less energy available for byssogenesis. This leads to a weakening of the byssus, which can ultimately result in the fall-off of the mussels. This can considerably reduce the productivity of mussel farms and result in the loss of more than 50% of production. Recently there has been a growing interest in the development of mussel hatcheries and more specifically in the production of triploid mussels. Indeed, it is known that triploidy tends to reduce the fertility of bivalves and can even produce sterile bivalves which would have more energy to invest in their growth and in other vital tissues (i.e. the byssus). The main objective of this doctoral thesis was therefore to validate the effects of triploidy in *Mytilus edulis*, in particular regarding its reproductive and attachment performances, as well as the potential impacts on its physiology and metabolism of mussels. In addition, the development of techniques to produce triploid mussels under hatchery conditions was also an important aspect of this project.

The first objective of this thesis consisted in developing effective triploidy induction techniques applicable in hatchery conditions by non-specialized personnel. To induce triploidy, it was decided to inhibit the extrusion of the second polar body of fertilized eggs. Hot or cold treatments were applied, as well as chemical treatments using 6-(Dimethylamino)purine (6-DMAP). In addition, the efficiency of the treatments was compared according to their time of application (post-fertilization). The results showed that the treatment of eggs at 17 minutes post-fertilization with 400 μM of 6-DMAP induced the highest levels of triploidy with more than 90% induction. Additionally, triploid larvae showed a significant growth advantage until the end of the study when larvae settled.

The second objective of this thesis focused on the production and mechanical properties of byssus threads in small *Mytilus edulis* mussels (< 30 mm), before their first investments in reproduction. Byssus production was stimulated by placing the mussels in a hydrodynamic flume for 3 days. At the end of the 3 days, the threads were counted, collected, tensiometric analyzes were applied to each thread. The results showed that although the mussels did not yet invest massive energy in reproduction, the triploids produced significantly more threads (65%) than the diploids, with altered mechanical properties and in particular an increase in Young's modulus of 45% in triploids. In addition, the clearance rate and scope for growth were respectively 40% and 260% higher in triploids compared to diploids.

The third objective aimed to compare the reproductive performance of diploid and triploid mussels of two different size groups (< 30 mm and > 50 mm). The results did not show significant reproductive investment in mussels < 30 mm, nor any difference between diploids and triploids for this size group. On the other hand, mussels > 50 mm showed a reduction in reproductive investment in triploids, as well as an incomplete maturation of gametes, signs of gamete resorption and a strongly altered sex ratio with an absence of females.

The fourth objective compared the production, the mechanical properties, as well as the composition of the byssus of commercial size mussels > 50 mm. The byssal production and the analyzes of the mechanical properties were made according to the same methodology as for the 2nd chapter. The amino acid and metal composition of the fibers were also analyzed. The results showed similar trends in mussels > 50 mm with the results of the 2nd chapter. The structure and composition in amino acids of the byssal threads were not significantly different between the 2 groups. However, some metals, such as B, Cu, SR, Os, W, Ag, Nb, Bi, Tl were in higher concentration in the byssus of diploid mussels. The triploid mussels showed an increase in filtration rate, growth potential, as well as shell strength by 48%, 57%, 40% respectively.

Together, the results of this study show a strong potential of triploid mussels for aquaculture, with increased growth, production of more byssal threads with superior mechanical properties, but also less investment in reproduction and potentially more energy available for other metabolic activities. Thus, the production of triploid mussels could reduce losses due to fall-off and increase the production rates through superior growth and better survival.

Keywords: Triploidy, Byssus, *Mytilus edulis*, Bivalve, Attachment, Reproduction, Clearance rate, Scope for growth, Growth

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ix
RÉSUMÉ.....	xvi
ABSTRACT	xix
TABLE DES MATIÈRES	xxii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxvii
LISTE DES FIGURES.....	xxix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xxxiii
LISTE DES SYMBOLES	xxxv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. AQUACULTURE AU CANADA	1
1.1 Cycle de vie des moules.....	1
1.2 Méthode de Mytiliculture	6
1.3 Collecte du naissain	6
1.4 Méthodes de production en période de croissance	8
2. IMPACTS ÉCOLOGIQUES	9
2.1 Activités anthropiques et eutrophisation.....	9
2.2 Utilisation des bivalves comme régulateurs de l'eutrophisation	10
2.3 Les bivalves comme puits à carbone	15
2.4 Impacts de l'aquaculture de bivalves sur les communautés marines	18
3. CHUTE ET ATTACHEMENT DE MOULES	19
3.1 Chute (fall-off) de moules.....	19
3.2 Forces d'attachement	23
3.3 Composition et propriétés mécaniques du byssus	25
4. POLYPLOÏDIE.....	32
5. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	33

5.1	Portée de l'étude	33
5.2	Objectifs spécifiques et hypothèses.....	37
5.3	Chapitre I : Production de moules triploïdes en conditions aquacoles.....	37
5.4	Chapitre II : Fixation et activité métabolique des naissains de moules triploïdes	38
5.5	Chapitre III : Activité reproductrice des moules triploïdes	40
5.6	Chapitre IV : Force de fixation et composition des fibres de byssus des moules triploïdes de taille commerciale.....	41

CHAPITRE 1 EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTES STRATÉGIES POUR INDUIRE LA TRIPLOÏDIE CHEZ *MYTILUS EDULIS* EN RELATION AVEC LA PERFORMANCE DES PREMIERS STADES DE DÉVELOPPEMENT

1.1	RESUME	43
1.2	ABSTRACT	46
1.3	INTRODUCTION	47
1.4	MATERIAL AND METHODS	49
1.4.1	Experimental design	49
1.4.2	Triploidy induction.....	50
1.4.3	Ploidy measurements in larvae.....	52
1.4.4	Larval survival and growth.....	53
1.4.5	Statistical analysis	53
1.5	RESULTS	54
1.5.1	Triploidy induction.....	54
1.5.2	Larval survival.....	55
1.5.3	Larval Growth	56
1.6	DISCUSSION	58
1.7	CONCLUSION.....	61
1.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	61

CHAPITRE 2 LA TRIPLOÏDIE CHEZ *MYTILUS EDULIS* IMPACTE LES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES FIBRES DE BYSSUS

2.1	RESUME	63
2.2	ABSTRACT	66
2.3	INTRODUCTION	67

2.4	MATERIALS AND METHODS	70
2.4.1	Experimental design.....	70
2.4.2	Induction and measurement of triploidy.....	72
2.4.3	Byssal thread production.....	72
2.4.4	Mechanical properties.....	75
2.4.5	Food assimilation rate.....	76
2.4.6	Standardized clearance rate.....	77
2.4.7	Oxygen consumption (VO ₂).....	77
2.4.8	Mussel size and condition index.....	78
2.4.9	Scope for growth (SFG).....	78
2.4.10	Statistical analysis.....	79
2.5	RESULTS.....	80
2.5.1	Induction of triploidy	80
2.5.2	Byssogenesis and mechanical characteristics	80
2.5.3	Mussel size and condition index.....	82
2.5.4	Physiological parameters	84
2.6	DISCUSSION.....	86
2.6.1	Byssogenesis and thread characteristics	86
2.6.2	Bioenergetics.....	90
2.7	CONCLUSION.....	93
2.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	94
CHAPITRE 3 INVESTISSEMENT EN REPRODUCTION ET DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MOULES TRIPLOÏDES <i>MYTILUS EDULIS</i>		95
3.1	RESUME.....	95
3.2	ABSTRACT.....	98
3.3	INTRODUCTION.....	100
3.4	MATERIALS AND METHODS.....	101
3.4.1	Growth and reproduction	103
3.4.2	Spawning induction	104
3.4.3	Statistics	104
3.5	RESULTS.....	105
3.5.1	< 30 mm mussels' cohort.....	105
3.5.2	> 50 mm mussels' cohort.....	107

3.6	DISCUSSION	114
3.7	CONCLUSION.....	119
3.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	120
	CHAPITRE 4 COMPARAISON DE LA PRODUCTION, DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE ET DE LA COMPOSITION DES FIBRES DE BYSSUS DE DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES DE <i>MYTILUS EDULIS</i>	121
4.1	RÉSUMÉ	121
4.2	ABSTRACT	124
4.3	INTRODUCTION	125
4.4	MATERIALS AND METHODS	127
	4.4.1 Experimental design	127
	4.4.2 Byssal production	128
	4.4.3 Mechanical properties	128
	4.4.4 Byssal threads composition	130
	4.4.5 Nuclear Magnetic Resonance	130
	4.4.6 Metal composition	131
	4.4.7 Physiological and metabolic analyses	131
	4.4.8 Mussel size and shell thickness	132
	4.4.9 Statistical analysis	132
4.5	RESULTS	133
	4.5.1 Byssogenesis and mechanical properties.....	133
	4.5.2 Byssal threads composition	136
	4.5.3 Metal composition of byssal threads	139
	4.5.4 Physiological analyses control of scope for growth	141
4.6	DISCUSSION	143
4.7	CONCLUSION.....	152
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	154
6.	CONTRIBUTION DE L'ETUDE.....	154
	6.1 Écloseries de moules et production de triploïdes	154
	6.2 Les moules triploïdes pour une meilleure fixation	156
7.	SERVICES ENVIRONNEMENTAUX DES MOULES TRIPLOÏDES.....	161

8. PERSPECTIVES	167
ANNEXES	171
ANNEXE I FLOW CYTOROMETRY SPECTRA OF DIPLOID AND TRIPLOID CELLS. NUCLEUS WERE STAINED WITH THE FLORESCENT MARKER PROPIDIUM IODIDE (PI-A).....	172
ANNEXE II GONADS OF DIPLOID AND TRIPLOID FROM LABORATORY < 30 MM MUSSELS HARVESTED IN DECEMBER 2020. PICTURES A) AND B) ARE RESPECTIVELY DIPLOID AND TRIPLOID GONADS AT A MINOR DEVELOPMENTAL STAGE. PICTURES C) AND D) ARE RESPECTIVELY DIPLOID AND TRIPLOID GONADS AT AN UNDIFFERENTIATED DEVELOPMENTAL STAGE	173
ANNEXE III HISTOLOGICAL CUTS OF DIPLOID AND TRIPLOID FROM > 50 MM MUSSELS AT TWO DIFFERENT TIME POINTS DURING THEIR SPAWNING SEASON. A) AND B) ARE HISTOLOGICAL CUTS OF A DIPLOID AND A TRIPLOID MUSSEL, RESPECTIVELY, HARVESTED ON 20.05.21. C) AND D) ARE HISTOLOGICAL CUTS OF A DIPLOID AND A TRIPLOID MUSSEL, RESPECTIVELY, HARVESTED ON 17.06.21	174
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Conditions of experiments performed to inhibit the extrusion of the second polar body in <i>Mytilus edulis</i> and induce triploidy.....	51
Table 2. Mechanical measurements performed on diploid and triploid byssal threads.....	81
Table 3. Shell properties of juvenile diploid and triploid mussels	84
Table 4. Physiological characteristics of diploid and triploid mussels.....	86
Table 5. Maximal mean growth of < 30 mm laboratory cohort for diploid and triploid mussels (mm) from the beginning of the experimentation (June) until their sampling for condition and gonadosomatic index estimation.....	105
Table 6. Tensile mechanical measurements of diploid and triploid mussels.....	135
Table 7. Metabolic analyses of diploid and triploid mussels performed at 10 and 20°C.....	142
Table 8. Shell size.....	143

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Cycle de développement de la moule <i>Mytilus edulis</i>	3
Figure 2. Larves pédiveligères de <i>Mytilus edulis</i> montrant son pied cilié extensible.	4
Figure 3. Deux classes de taille de moules attachées à des cordes mytilicoles.	8
Figure 4. Représentation des boudins à moules.....	9
Figure 5. Concentration de chlorophylle a (Chl a) et de la matière organique particulaire totale (TPM) à proximité de la ferme expérimentale de moules de Limfjorden.....	11
Figure 6. Réduction relative (% de différence par rapport aux concentrations ambiantes de Chl-a) dans une ferme	12
Figure 7. Cycle d'extraction et de libération de nutriments dus à l'aquaculture de bivalves.....	14
Figure 8. Approche écosystémique du cycle du carbone (lignes continues et pointillées pour le carbone organique et inorganique, respectivement) et rétroaction de la mytiliculture sur le pool de nutriments inorganiques (ligne pointillée).	16
Figure 9. Photographies sous-marines prises par des plongeurs montrant une ligne de moules et l'épifaune qui lui est associée.....	19
Figure 10. Diagramme montrant le cycle de vie des moules <i>Mytilus</i> (en bas à gauche, lignes noires), son intégration dans la production aquacole et 10 facteurs relatifs aux pertes de moules pendant le pré-ensemencement et les stades de pouponnière.	22
Figure 11. Représentation schématique de la composition des fibres de byssus.....	27
Figure 12. Relation entre le pied de moule et la production d'une nouvelle fibre de byssus.	28
Figure 13. Vue d'ensemble schématique de la sécrétion de fibre ressemblant à la modélisation par injection, mettant en évidence les aspects passifs et actifs du processus d'assemblage.	29

Figure 14. Représentation du comportement mécanique d'une fibre de byssus sous tension et après relâchement de la tension.....	31
Figure 15. Carte des lieux d'échantillonnage et de travail en laboratoire	36
Figure 16. Successful induction of triploidy following various treatments of 5-day-old <i>M. edulis</i> larvae.....	55
Figure 17. Survival rates (mean % living larvae \pm standard error of means) of larvae at 5- and 15-days post-fertilization (dfp) following 6-(dimethylamino)purine (6-DMAP) or cold-shock treatments to induce triploidy.	56
Figure 18. Larval growth of diploid and triploid mussels until settlement.	57
Figure 19 : Representation of mussel's setup on L-shaped glass for the induction of byssal thread production.	74
Figure 20 : Comparison of byssal threads' production and mechanical properties.	82
Figure 21 : Morphological differences between diploid and triploid mussel shells.	83
Figure 22 : Metabolic measurements in diploid and triploid mussels.....	85
Figure 23 : Condition and gonadosomatic indexes of < 30 mm diploid and triploid mussels conditioned for investment into gametes production over 6 months. ...	106
Figure 24 : Reproductive investment and condition index of > 50 mm diploid and triploid mussel from Prince Edward Island at multiple time points from May 2021 until end of September.	111
Figure 25 : Comparison of gametes developmental stages in > 50 mm cohort of diploid and triploid mussels sampled at multiple timepoints during their spawning season from May 2021 until end of September 2021 in Prince Edward Island	113
Figure 26 : Dissection of a diploid and a triploid mussel harvested on 20.05.21 on Prince Edward Island.	114
Figure 27. Production of byssal threads by diploid and triploid mussels over three days under hydrodynamic flume conditions of 10 cm s-1.....	134
Figure 28. Composition of amino acids in term of percentage between diploid and triploid byssal threads.	137
Figure 29. NMR spectrum of diploid and triploid byssal threads.....	138
Figure 30. Metal concentrations in diploid and triploid byssal threads.	140

Figure 31 : Représentation synthétique des principaux résultats obtenus et des liens entre chacun d'eux, du chapitre 1 à 4.	160
Figure 32 : Représentation des services écologiques potentiels des moules triploïdes pour la réduction de l'eutrophisation.	165

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

6-DMAP	6-(diméthylamino)purine
Abs	Absorbance
ANOVA	Analyse of variance
Chl-a	Chlorophylle a
CI	Condition Index (Indice de condition)
CR	Clearance rate (Taux de filtration)
GSI	Gonadosomatic index (Indice gonadosomatique)
GVF	Gonad volume fraction (Fraction volumique des gonades)
Î.-P.-É.	Île-du-Prince-Édouard
OD	Oxygène dissous
PEI	Prince Edward Island
PERMANOVA	Permutational multivariate analyse of variance (Analyse multivariée permutationnelle de la variance)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Résonance Magnétique Nucléaire)
SFG	Scope for growth (Potentiel de croissance)
VO₂	Oxygen consumption/respiration rate (Consommation d'oxygène/taux de respiration)

LISTE DES SYMBOLES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. AQUACULTURE AU CANADA

Au Canada, l'aquaculture de moules (*Mytilus edulis*) a débuté dans les années 1980 avec une production relativement faible (< 5 000 tonnes métriques) (Boghen 1995). Cependant, la mytiliculture s'est rapidement développée pour devenir un secteur économique majeur dans les zones côtières du pays (Ytrøy 2008, Statistics Canada 2019). En 2019, la production canadienne totale de moules était de 26 000 tonnes, ce qui représente 43 millions de dollars canadiens. Ces valeurs correspondent à 60 % de la production totale de bivalves au Canada et 37 % des revenus de cette industrie (Statistics Canada 2019). La région la plus active est l'Île-du-Prince-Édouard (Î.-P.-É.), qui produit 80 % de la production canadienne de moules.

1.1 Cycle de vie des moules

Les moules du genre *Mytilus* ont la capacité de s'adapter à des conditions environnementales extrêmement variables (salinité, température, courants, dessiccation) (Seed et Suchanek 1992). Bien que *Mytilus edulis* puisse coloniser une grande variété d'habitats et de substrats, l'espèce est particulièrement présente dans les eaux plus froides des hémisphères nord et sud (Gosling 1992). *Mytilus edulis* a un rythme de développement relativement rapide et peut se reproduire au cours de sa première année (Duinker et al. 2008), avec un cycle de reproduction divisé en deux étapes distinctes : la gamétogenèse et la quiescence. La gamétogenèse représente une période d'investissement énergétique pour le développement des gamètes jusqu'à leur maturité et émission dans la colonne d'eau lors de la ponte (Seed et Suchanek 1992, Gabbott 1983). Dans la phase de quiescence post-ponte, la nourriture est stockée sous forme de réserves énergétiques à utiliser ultérieurement pour la

croissance et la gamétogenèse. Dans l'hémisphère Nord, la gamétogenèse commence à la fin de l'automne ou au début de l'hiver, et se poursuit jusqu'à la maturité des gamètes à la fin de l'hiver ou au printemps. Ceci est suivi par des événements de pontes successives du printemps jusqu'au début de l'automne (Lowe et al. 1982). La qualité et la quantité de gamètes libérées par les moules peuvent varier en raison de multiples facteurs, notamment la disponibilité et la qualité de la nourriture (Seed et Suchanek 1992).

Chez *Mytilus edulis*, les réserves énergétiques sont principalement stockées sous forme de lipides et de protéines. Une petite quantité de glycogène se trouve dans les cellules adipogranulaires à l'intérieur du manteau, alors qu'une plus grande quantité de glycogène est présente dans les tissus conjonctifs vésiculaires à l'intérieur du manteau et des palpes labiaux (Lenoir et al. 1989, Peek et Gabott 1989). Deux grandes stratégies de reproduction ont été décrites pour les bivalves. La première, connue sous le nom de stratégie conservatrice, consiste en une production de gamètes reposant exclusivement sur la quantité de réserves énergétiques stockées. La deuxième stratégie est une stratégie opportuniste utilisant les réserves énergétiques combinées à l'énergie alimentaire présente dans l'environnement. L'utilisation de stratégies différentes entre plusieurs populations de *Mytilus edulis* suggère une flexibilité chez cette espèce et la possibilité d'ajuster leur stratégie en fonction des conditions environnementales (Seed et Suchanek 1992, Rodhouse et al. 1984a, Rodhouse et al. 1984b, Lowe et al. 1982). De multiples facteurs endogènes ou exogènes peuvent également affecter la reproduction des moules. Les facteurs endogènes concernent principalement le cycle hormonal, le génotype, ou encore les niveaux de réserves énergétiques et en éléments essentiels. Les principaux facteurs exogènes sont la nourriture, la salinité et la température (Seed et Suchanek 1992, Newell et al. 1982). Tous les facteurs agissant sur la disponibilité de la nourriture, l'assimilation de la nourriture et le stockage des nutriments auront un impact indirect sur le succès reproducteur des moules (Newell et al. 1982). La température est un facteur clé, et Lubet et Aloui (1987) cités dans Seed et Suchanek (1992) ont défini des limites de température pour une gamétogenèse optimale. En dehors de ces limites, la gamétogenèse tend à décliner. De plus, la température est également impliquée

dans l'induction de la ponte, et les chocs thermiques sont la méthode la plus couramment utilisée pour stimuler la ponte des bivalves dans les écloséries (Helm et al. 2004).

Les moules ont un processus de fécondation externe qui dépend de la libération simultanée de spermatozoïdes et d'ovules dans l'eau (Figure 1). Le sperme est libéré en continu tandis que les œufs sont relâchés par intermittence sous forme de nuages (Helm et al. 2004). Une fois fécondé, l'œuf va rapidement débiter sa division cellulaire pour atteindre le stade d'embryon cilié (4 à 5 heures) ayant la capacité de se déplacer dans la colonne d'eau. Au cours des 24 à 48 heures qui suivent, l'embryon va se transformer en une larve trochophore (60 à 80 μm) et il va développer une coquille (prodissoconch I) lors de sa transformation en " larve D ". Avec ces modifications structurelles, les larves deviennent véligères avec une longueur comprise entre 100 et 120 μm , taille à partir de laquelle elles vont commencer la sécrétion d'une nouvelle coquille (prodissoconch II).

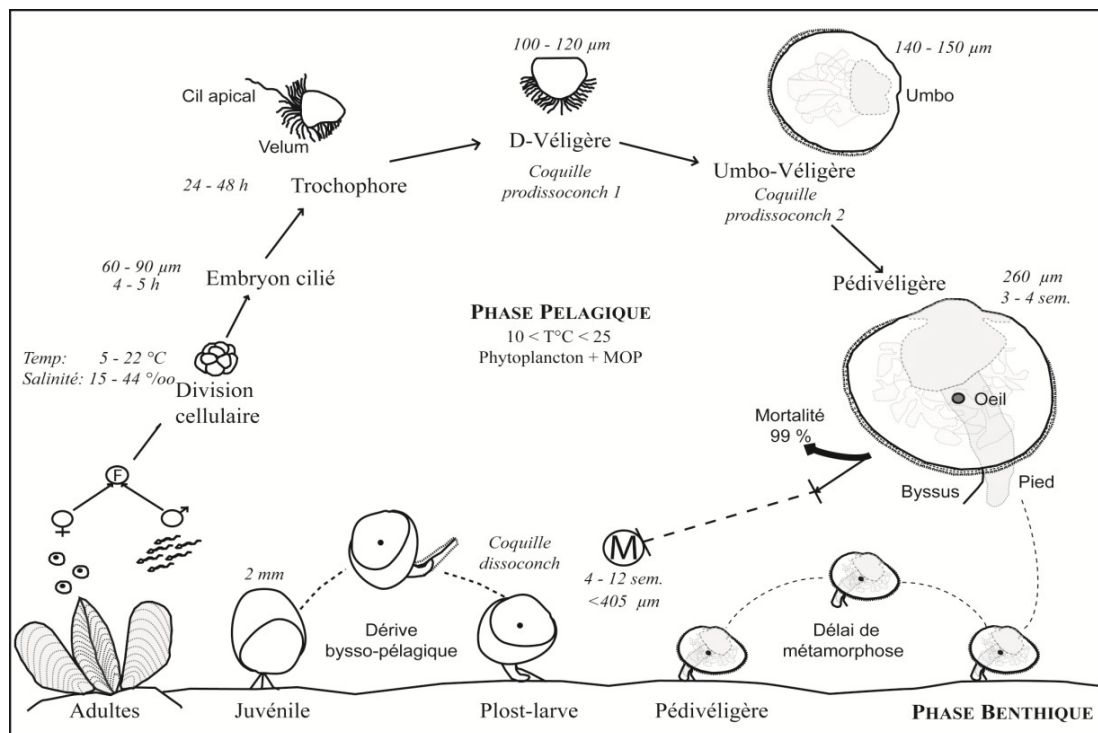


Figure 1. Cycle de développement de la moule *Mytilus edulis*. F : fécondation ; M : métamorphose. Issu de Toupoint 2012

Le velum est situé à l'extrémité des prodissoconchs et est recouvert d'un anneau de cils qui permettent aux larves de nager et de s'alimenter sur de petites particules de tailles comprises entre 1 et 20 μm (Bayne 2017). La durée de développement des larves véligères est de 2 à 3 semaines, selon la température et la disponibilité de la nourriture, jusqu'à ce qu'elles atteignent une longueur d'environ 250 μm , moment où les larves deviendront compétentes avec la capacité de se fixer à partir du développement d'un pied cilié extensible. Ce stade est appelé pédivéligère (Figure 2).



Figure 2. Larves pédivéligères de *Mytilus edulis* montrant son pied cilié extensible. Courtoisie de Réjean Tremblay

La compétence consiste en la capacité des larves à se fixer sur un substrat et à se métamorphoser en juvéniles (Seed et Suchanek 1992). La métamorphose va induire de nombreux changements morphologiques, comme une perte du vélum et un développement des branchies (Cannuel et al. 2009) ainsi que la sécrétion de la coquille dissoconch. Cette coquille se distingue par sa pigmentation, son orientation et une composition minérale similaire aux coquilles des bivalves adultes (Bayne 2017, Fuller et Lutz 1988). La sécrétion de la dissoconch crée une ligne de démarcation, appelée prodissoconch II, qui sert de

marqueur discriminant le moment de la métamorphose (Martel et al. 2014). Cependant, si aucun substrat adéquat n'est trouvé ou si les conditions trophiques ne sont pas appropriées, les larves resteront dans la colonne d'eau et retarderont temporairement leur métamorphose et leur fixation jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille supérieure à 400 μm (Martel et al. 2014, Bayne 1965, Sprung 1984, Seed et Suchanek 1992, Toupoint 2012, Androuin et al. 2022). Si les larves de *Mytilus sp.* peuvent se fixer sur une grande variété de substrats, elles semblent particulièrement attirées par les substrats filamenteux, tels que les fibres de byssus de leurs congénères (Petraitis 1978, Eyster et Pechenik 1988, Seed et Suchanek 1992), les algues filamenteuses (Petersen 1984a,b, Seed et Suchanek 1992), ainsi que les cordes fibreuses utilisées dans l'industrie mytilicole (Kuriakose et Appukuttan 1996, Seed et Suchanek 1992). Contrairement aux larves véligères qui présentent un phototropisme positif, qui les maintiennent près de la surface de l'eau, les larves pédivéligères ont un géotropisme positif et sont insensibles aux changements de pression lors de leur migration vers le fond pour la fixation (Bayne 2017).

Après la métamorphose, les moules peuvent passer par des phases successives d'attachement et de détachement et revenir temporairement à une phase pélagique secondaire pour retrouver des conditions optimales en termes de nourriture et de substrat (Bayne 1964, Seed et Suchanek 1992, Forêt et al. 2018a). Ces processus de migration secondaires s'effectuent par la sécrétion de longues fibres de byssus maintenant les jeunes juvéniles à l'intérieur de la colonne d'eau durant leur dérive (Lane et al. 1985). Ces étapes sont également qualifiées de dérive bysso-pélagique et sont observées jusqu'à une longueur juvénile d'environ 2,5 mm (de Blok et Tan-Mass 1977, Lane et al. 1985, Forêt et al. 2018b). À cette taille, un juvénile est essentiellement benthique avec une certaine capacité de mouvement en utilisant son pied pour ramper sur le substrat jusqu'à ce qu'il trouve un habitat plus favorable pour former des colonies (Seed et Suchanek 1992). En effet, la formation de colonies offre une meilleure résistance aux forces mécaniques de l'eau et à l'action des vagues en réduisant la surface exposée et en favorisant une meilleure fixation que celle fournie par une moule individuelle (Seed et Suchanek 1992).

1.2 Méthode de Mytiliculture

Bien que les méthodes de culture se soient améliorées au cours des dernières décennies, il est à noter que la mytiliculture est pratiquée depuis la préhistoire (Erlandson 1988, Ytrøy 2008). La production de moules nécessite un endroit abrité pour éviter le délogement, une certaine protection contre les prédateurs, une bonne disponibilité de la nourriture, et de bonnes conditions d'oxygène dissous (Kamermans et Capelle 2019). La production de moules est réalisée à l'échelle mondiale et est dominée par l'Asie avec la Chine comme premier producteur, suivie par l'Amérique avec le Chili, l'Europe avec l'Espagne, l'Océanie avec la Nouvelle-Zélande et l'Afrique avec l'Afrique du Sud (ACTION 2020). La mytiliculture repose principalement sur la production de deux genres (*Mytilus* et *Perna*) et neuf espèces : *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *M. platensis*, *M. unguiculatus*, *M. planulatus*, *Perna canaliculus*, *P. perna*, et *P. viridis* (Kamermans et Capelle 2019).

1.3 Collecte du naissain

La mytiliculture repose sur la collecte de juvéniles métamorphosés récemment fixés, appelés naissains. Deux approches sont utilisées : 1) la collecte de juvéniles sauvages à l'aide de collecteurs artificiels (cordes) sur lesquels le naissain s'attache naturellement, et 2) la production en éclosérie par reproduction contrôlée ainsi que l'élevage de larves dans un environnement contrôlé (Kamermans et Capelle 2019). La collecte du naissain sauvage représente la méthode la plus économique, mais l'approvisionnement est imprévisible et variable. En outre, il y a un manque de contrôle de la qualité ainsi qu'un risque élevé d'encrassement biologique (biofouling) (Correia-Martins et al. 2022). Les collecteurs sont constitués de différents matériaux, bien que le matériau le plus fréquemment utilisé soit des cordes en polypropylène d'un diamètre de 12 à 18 mm (Figure 3). Par opposition, la production de moules en éclosérie est coûteuse, mais stable et elle permet de faire des croisements sélectifs ou de développer des naissains triploïdes, augmentant ainsi la valeur

des moules produites (Kamermans et Capelle 2019). Au Canada, les naissains proviennent actuellement de collectes sauvages, mais on note un intérêt récent pour le développement d'écloseries de moules (CleanFish, projet MPO 17-G-03).

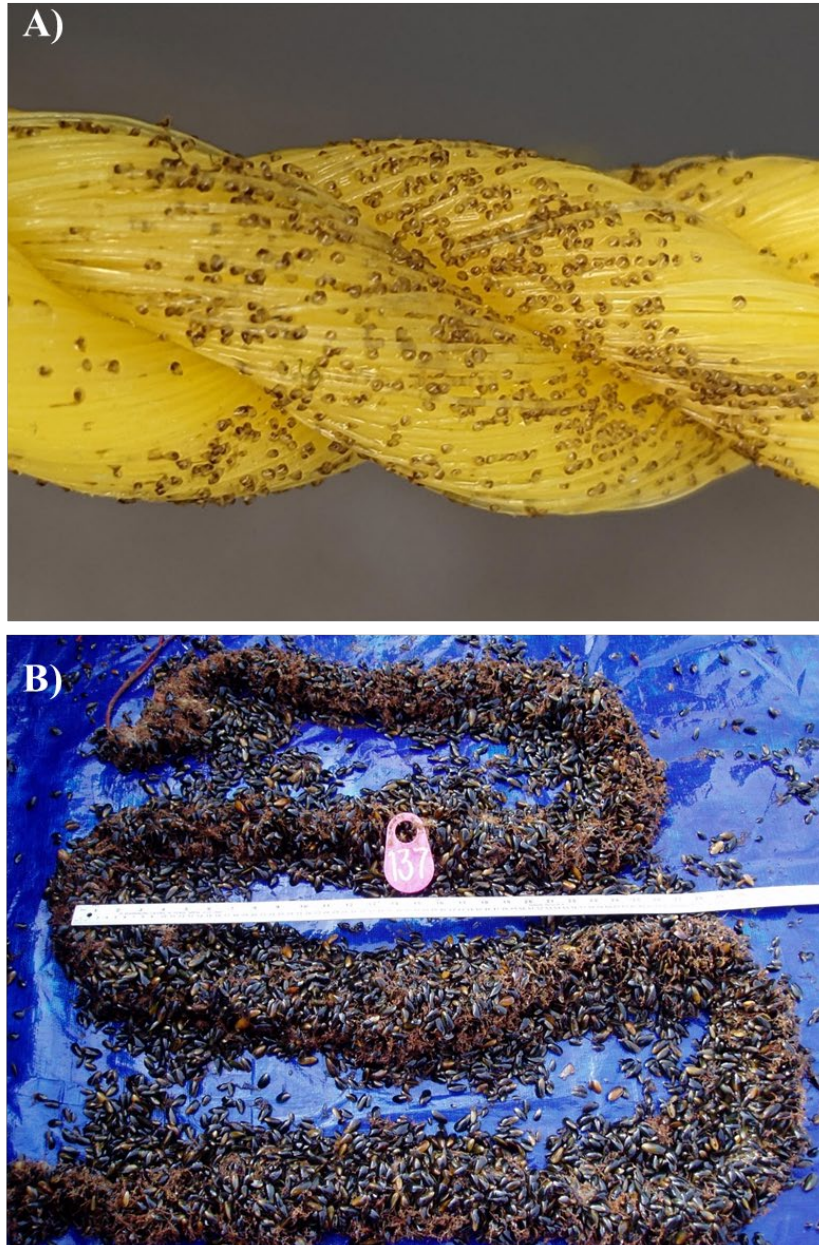


Figure 3. Deux classes de taille de moules attachées à des cordes mytilicoles. A) Naissain de moules attachées à une corde en polypropylène. B) Moules > 20 mm attachées à un boudin d'élevage (longline). Les deux photos sont une gracieuseté de Réjean Tremblay

1.4 Méthodes de production en période de croissance

Une fois que le naissain a atteint une longueur de coquille d'environ 20 mm, les moules sur collecteurs sont récoltées, séparées en différentes catégories de taille et transférées dans des manchons en filet (appelés aussi boudins ou mussel socks en anglais). Ces unités tubulaires mesurent environ 40 mm de diamètre et contiennent de 400 à 800 moules par mètre (Fréchette 2012). Les boudins sont ensuite transférés vers un site de culture jusqu'à ce que les moules qu'ils contiennent atteignent une taille commercialisable (>55 mm) (Comeau et al. 2017). Bien qu'il existe plusieurs méthodes de culture, seule la culture en boudins (longline) est employée dans l'est du Canada. L'élevage en boudins est bien adapté à la zone qui est caractérisée par une présence saisonnière de glace. Les boudins sont suspendus à quelques mètres sous la surface de l'eau (Figure 4) (Kamermans et Capelle 2019). De tels déploiements représentent une approche extrêmement efficace pour réduire les risques de prédation benthique, puisque les boudins n'atteignent pas le fond marin. Il diminue également la formation de perles dans la cavité du manteau compte tenu du moindre risque d'exposition au sable dans la colonne d'eau. De plus, la répartition uniforme des individus le long de la corde offre un accès alimentaire optimisé pour tous les individus. Il a été démontré que l'élevage en boudins permet une meilleure croissance des moules, par rapport à d'autres méthodes d'élevage, telles que les élevages sur les poteaux ou directement sur le sable (Garen et al. 2004). Cependant, la culture en boudins pourrait être sujette à certaines difficultés, telles que l'auto-amincissement (self-thinning) ou le détachement des moules (Fréchette 2012) ainsi que l'encrassement biologique (Clarke et Therriault 2007, Leblanc et al. 2007, Kamermans et Capelle 2019).

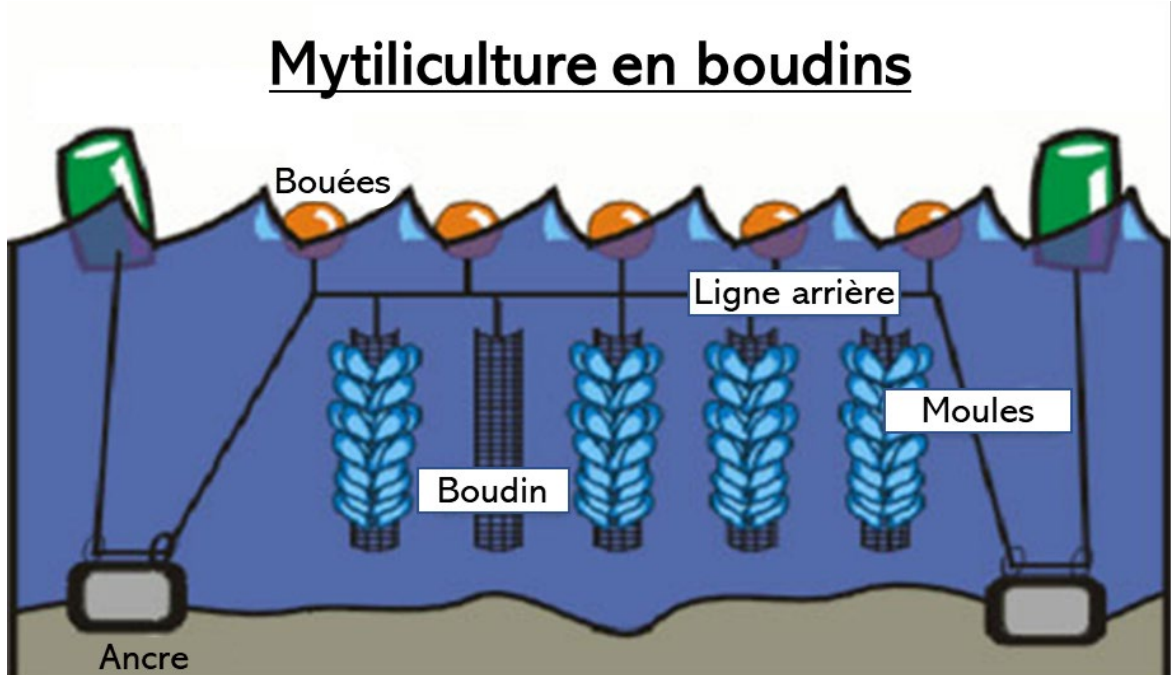


Figure 4. Représentation des boudins à moules (modifié de Fisheries Then and Now, consulté novembre 2022)

2. IMPACTS ÉCOLOGIQUES

2.1 Activités anthropiques et eutrophisation

Les activités anthropiques, telles que l'agriculture et l'aquaculture nécessitant un apport alimentaire (poissons et crustacés), peuvent entraîner le rejet de quantités importantes de nutriments dans l'environnement, notamment en termes d'azote et de phosphore (Schindler et al. 2006, David et Gentry 2000, de Lacerda et al 2006). De Lacerda et al. (2006) ont montré des apports significatifs d'azote et de phosphore dans six estuaires le long des côtes brésiliennes dont les émissions anthropiques étaient d'un à deux ordres de grandeur supérieurs aux émissions naturelles. Ils ont constaté que les élevages de crevettes étaient la plus grande source d'azote ($1.9 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$) suivis de l'agriculture végétale ($1.3 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$), puis de l'élevage ($0.7 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$). En revanche, les sources les plus élevées de phosphore

étaient l'agriculture animale ($0.9 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$) et l'agriculture végétale ($0.34 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$), tandis que les élevages de crevettes comptaient pour $0.23 \text{ t km}^{-2} \text{ an}^{-1}$ des émissions de phosphore. Ces apports d'azote et de phosphore stimulent la production de phytoplancton qui peut induire des phénomènes d'eutrophisation des eaux (Conley et al. 2009, Diaz et Rosenberg 2008). L'un des principaux impacts de l'eutrophisation est la réduction des concentrations d'oxygène dissous (OD) conduisant à des zones hypoxiques lorsque la concentration d'OD est inférieure à la limite de $2 \text{ ml O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Diaz et Rosenberg 2008). La réduction d'OD résultant de l'eutrophisation est partiellement due à la consommation d'oxygène dissous pendant la nuit par le phytoplancton (Cranford 2019, Burkholder et Shumway 2011), mais aussi principalement par la croissance microbienne due au phytoplancton mort (Burkholder et Shumway 2011, Wallace et al. 2014, Diaz et Rosenberg 2008). Par la suite d'autres phases d'hypoxie transitoire peuvent survenir lors de phénomènes de mortalité massive de la faune benthique, augmentant ainsi les apports de matière organique et la croissance microbienne (Diaz et Rosenberg 2008).

2.2 Utilisation des bivalves comme régulateurs de l'eutrophisation

L'élevage de bivalves est considéré comme une aquaculture extractive fournissant des services écosystémiques en stockant l'excès de nutriments et en les convertissant en biomasse de bivalves (Lindahl et al. 2005, Petersen et al. 2016). Grâce à la grande capacité des moules à filtrer et nettoyer l'eau des particules organiques (jusqu'à $10 \text{ L h}^{-1} \text{ individu}^{-1}$) (Cusson et al. 2005), de grandes quantités de phytoplanctons riches en nutriments peuvent être consommées, réduisant ainsi les impacts de l'eutrophisation (Cranford 2019). Des études sur *Mytilus edulis* ont montré que la forte production de phytoplancton dans les zones eutrophes permet une croissance rapide des moules. Une fois les moules récoltées pour la consommation humaine, l'azote et le phosphore qu'elles ont assimilés par la consommation du phytoplancton seront extraits de l'environnement (Nielsen et al 2016, Rose et al. 2015, Petersen et al 2014). Dans la revue de littérature de Burkholder et Shumway (2011), sur les 62 écosystèmes d'élevage de bivalves analysés, seuls 4 ont eu un impact négatif important sur leur environnement, soit lorsque la culture était réalisée dans un lagon avec une eau mal

renouvelée et une importante biomasse de bivalves cultivés. Les 58 écosystèmes restants ont montré des effets négligeables ou seulement locaux. Les cultures en suspension (boudins ou radeaux) sont très efficaces pour la réduction des concentrations de phytoplancton dans l'eau. Ces méthodes d'élevage augmentent la répartition des moules sur l'ensemble de la colonne d'eau, ce qui peut augmenter fortement le nombre de bivalves produit, mais aussi augmenter le taux de filtration par unité de surface par rapport aux populations benthiques (Cranford 2019). Nielsen et al. (2016) ont trouvé une réduction de 13 à 31 % de la concentration de particules à l'intérieur d'une ferme de moules située dans un fjord eutrophique comparé à la concentration de particules autour de la ferme (Figure 5).

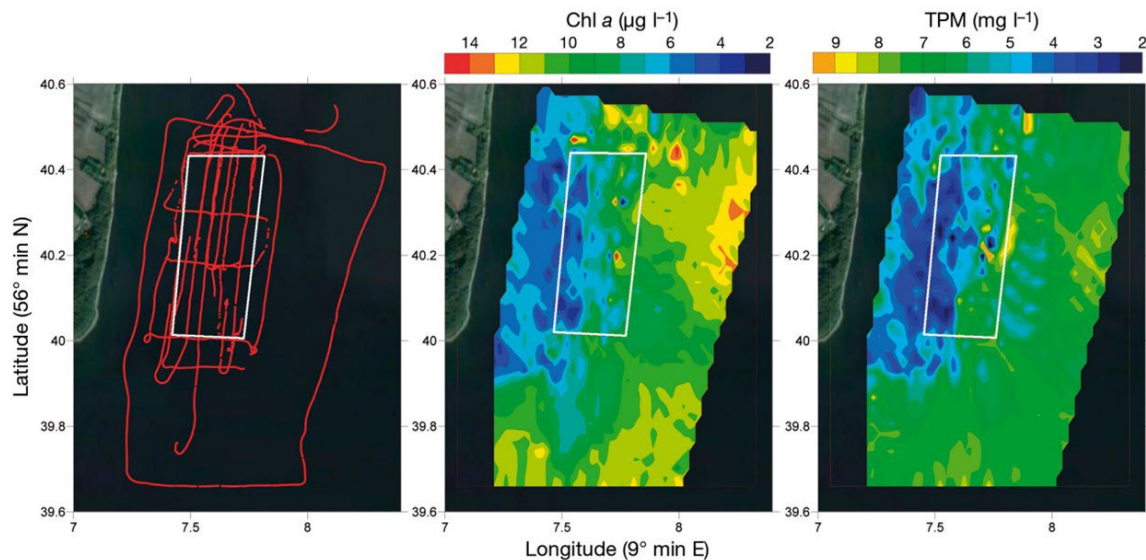


Figure 5. Concentration de chlorophylle a (Chl a) et de la matière organique particulaire totale (TPM) à proximité de la ferme expérimentale de moules de Limfjorden représentée par le polygone blanc, le 1er septembre 2010. Les lignes rouges représentent le parcours d'échantillonnage. Modifié de Nielsen et al. (2016)

Des résultats similaires ont été observés par Taylor et al. (2021) avec une diminution de la chlorophylle-a (Chl-a) dans les élevages de moules pouvant aller jusqu'à 69 % (Figure 6). Ainsi, il a été démontré que la réduction de l'eutrophisation par la filtration et

l'alimentation des bivalves fournit de nombreux services écologiques tels que la réduction du phytoplancton, l'augmentation de la pénétration de la lumière améliorant la santé des herbiers marins, la réduction de la proliférations d'algues toxiques et la réduction de la présence d'agents pathogènes microbiens ainsi que la séquestration de biotoxines et contaminants (Cranford 2019, Newell et Koch 2004, Burkholder et Shumway 2011).

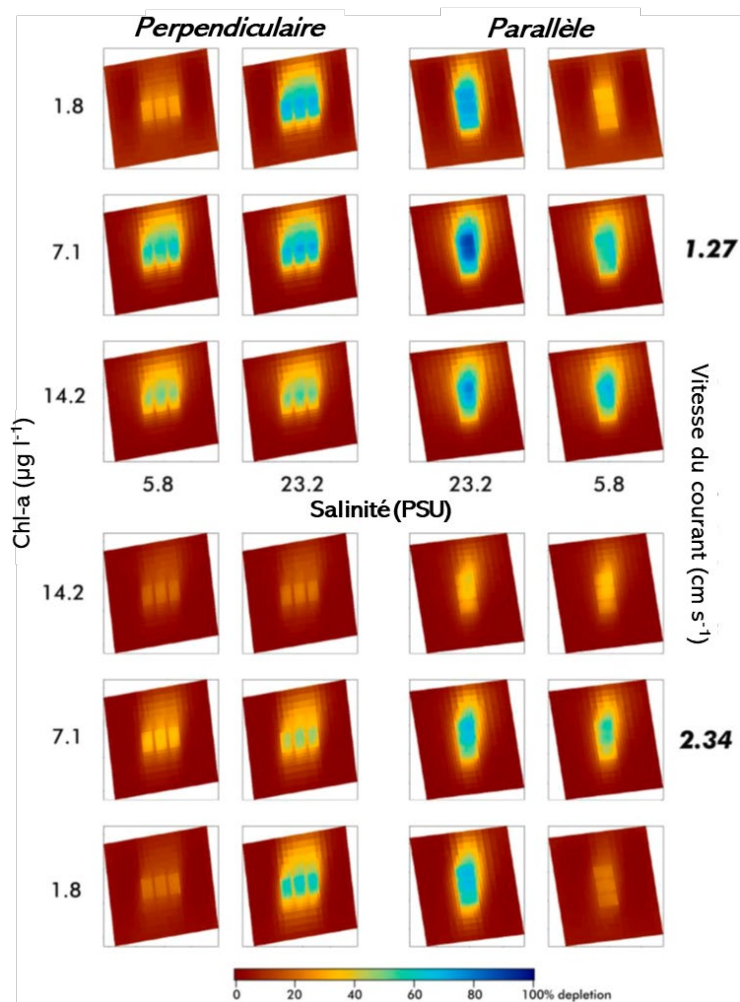


Figure 6. Réduction relative (% de différence par rapport aux concentrations ambiantes de Chl-a) dans une ferme entièrement approvisionnée orientée perpendiculairement (à gauche) ou parallèlement (à droite) aux courants prédominants aux vitesses de base (1.27 cm s^{-1}) et à des vitesses modérément accrues (2.34 cm s^{-1}). La salinité et les intervalles Chl-a augmentent au centre. Modifié de Taylor et al. (2021)

Cependant, alors que l'alimentation des bivalves entraîne principalement une réduction phytoplanctonique, des études ont observé que, dans certaines conditions, la filtration des bivalves pourrait stimuler la production primaire de certaines espèces spécifiques. Par exemple, l'alimentation sélective de *M. edulis* sur du plancton > 4µm peut favoriser le développement de petites espèces à croissance rapide (Riemann et al. 1988, Norén et al. 1999, Nielsen et Maar 2007, Møhlenberg et Riisgård 1978). De plus, les bivalves peuvent libérer des nutriments par leur excrétion, ainsi que par le rejet de fèces et pseudofèces qui peuvent ainsi stimuler la production de phytoplancton (Jordan et Valiela 1982, Nielsen et Maar 2007, Hulot et al. 2020). En effet, le renouvellement du nitrate pourrait être augmenté par les bivalves grâce à leur excrétion, principalement sous forme d'ammoniaque, ainsi que par la bio déposition de fèces et pseudo-fèces (Jordan et Valiela 1982) (Figure 7). La libération de nutriments et la stimulation consécutive de la production primaire ne se limitent pas aux bivalves, mais peuvent également être étendues à leur épibionte (Richard et al. 2006, Jansen et al. 2019). Une étude réalisée en mésocosmes a montré que 60 % de l'azote libéré par une ostréiculture provenait de sa communauté d'épibiontes (Lacoste et al. 2014). De plus, Jansen (2012) a montré que le métabolisme de l'ascidie (*Ciona intestinalis*), une espèce biosalissante (biofouling), pourrait régénérer jusqu'à 18 % de l'azote total rejeté par les communautés d'élevage de moules. Ainsi, la culture de bivalves peut appliquer une régulation top-down sur les communautés planctoniques grâce à leur capacité de filtration sélective (Nielsen et Maar 2007, Hulot et al. 2020, Huang et al. 2008), mais aussi une régulation bottom-up en relâchant des nutriments favorisant les espèces à croissance rapide telles que le picoplancton (Riemann et al. 1988, Nielsen et Maar 2007).

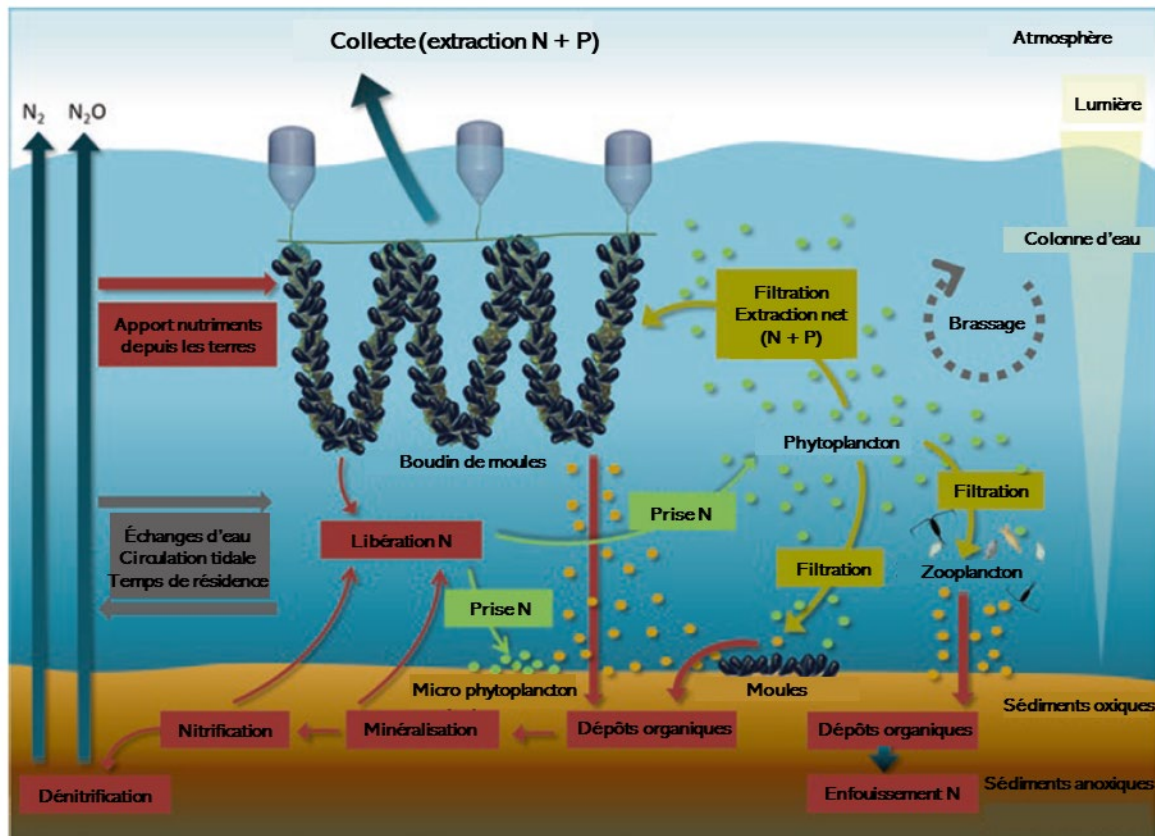


Figure 7. Cycle d'extraction et de libération de nutriments dus à l'aquaculture de bivalves. Modifié de Petersen et al. 2019

L'élevage de moules est considéré comme un puits de nutriments. En effet, les moules stockent dans leurs tissus et leurs coquilles les nutriments assimilés, de sorte qu'une fois les moules récoltées, les nutriments seront extraits de l'écosystème (Petersen et al. 2016, Songsangjinda et al. 2000, Petersen et al. 2019). Parmi les nutriments filtrés, 10 à 50 % peuvent être stockés dans les tissus et ainsi être éliminés lors de la récolte des bivalves (Jansen et al. 2019). Comme les bivalves sont composés de 1,4 % d'azote et de 0,14 % de phosphate, la récolte de 10 000 huîtres par semaine pourrait correspondre à une extraction de 13,6 kg d'azote et 1,4 kg de phosphates (Shumway et al. 2003). Cela pourrait représenter une extraction de 100 kg d'azote par an. Ainsi, une ferme ostréicole de 1 ha pourrait compenser les rejets azotés de 40 à 50 habitants du littoral (Shumway et al. 2003). L'étude de Lindahl et al. (2005) sur la mytiliculture dans le fjord de Gullmar (Suède) a calculé une réduction de 20

% de l'azote net grâce à l'extraction par les moules. Comparativement aux méthodes d'épuration traditionnelles qui représentent un coût compris entre 9,7 et 14,40 USD kg⁻¹ pour éliminer l'azote anthropique, la production de 2800 t de moules pourrait réduire ce coût jusqu'à 1 USD kg⁻¹. En plus des tissus mous et de la coquille, les fibres de byssus produites par les moules sont également un moyen efficace d'éliminer les nutriments de l'écosystème. Le byssus est connu pour incorporer des niveaux élevés de carbone et d'azote pouvant représenter jusqu'à 44 % et 21 % de leurs budgets respectifs (Hawkins et Bayne 1985). Il a été calculé que de 11 à 19 % de l'élimination de l'azote dans le fjord de Skive (Danemark) par la collecte de moules serait associée à la production de byssus par les moules bleues (Petersen et al. 2014, 2019).

2.3 Les bivalves comme puits à carbone

Par leur filtration, les moules assimilent le carbone du phytoplancton et peuvent ainsi jouer le rôle de puits de carbone, notamment par la séquestration stable du carbone à l'intérieur de leur coquille (Strand et Ferreira 2019, Suplicy 2020). Aussi, la production de byssus peut représenter jusqu'à 44 % du bilan carbone des moules et ainsi servir de puits de carbone lorsque les moules sont récoltées avec leur byssus (Hawkins et Bayne 1985). Cependant, la respiration des moules associée à leur croissance et leur métabolisme représente une libération de CO₂, de sorte que les moules sont souvent considérées comme des générateurs de carbone plutôt que comme des puits de carbone (Suplicy 2020). Une quantité non négligeable de carbone peut également être libérée sous forme de CO₂ à cause de la reminéralisation des fèces et pseudofèces si ces biodépositions ne sont pas rapidement séquestrées dans les sédiments (Filgueira et al. 2015). De plus, dans le bilan carbone, le dégagement de CO₂ lors de la calcification de la coquille doit également être pris en compte puisque la biocalcification de 1 mole de CaCO₃ (la forme principale de carbone dans les coquilles de moules) génère une libération d'environ 0,6 mole de CO₂. Il en résulte un taux de séquestration net total de 0,4 mole de CO₂ (Ware et al. 1992). Dans leur revue, Filgueira et al. (2019) ont estimé que la productivité mondiale annuelle de coquilles de bivalves d'élevage avoisinerait les 7 x 10⁶ tonnes, composées à 95 % de carbonate de calcium. En

supposant que le CaCO_3 est composé de 12 % de carbone, la séquestration mondiale totale du carbone serait d'environ 8×10^5 tonnes de carbone par an. Ils ont également considéré que la demande énergétique pour la croissance de la coquille représentait 10 % de l'énergie totale et que la séquestration nette de carbone dans la coquille était en moyenne de 21 %. Par conséquent, la séquestration annuelle effective de carbone par les coquilles de bivalves représenterait 6.3×10^5 tonnes d'équivalent CO_2 . Le cycle du carbone dans le cadre d'une mytiliculture a été schématisé par Cranford et al. (2012) (Figure 8).

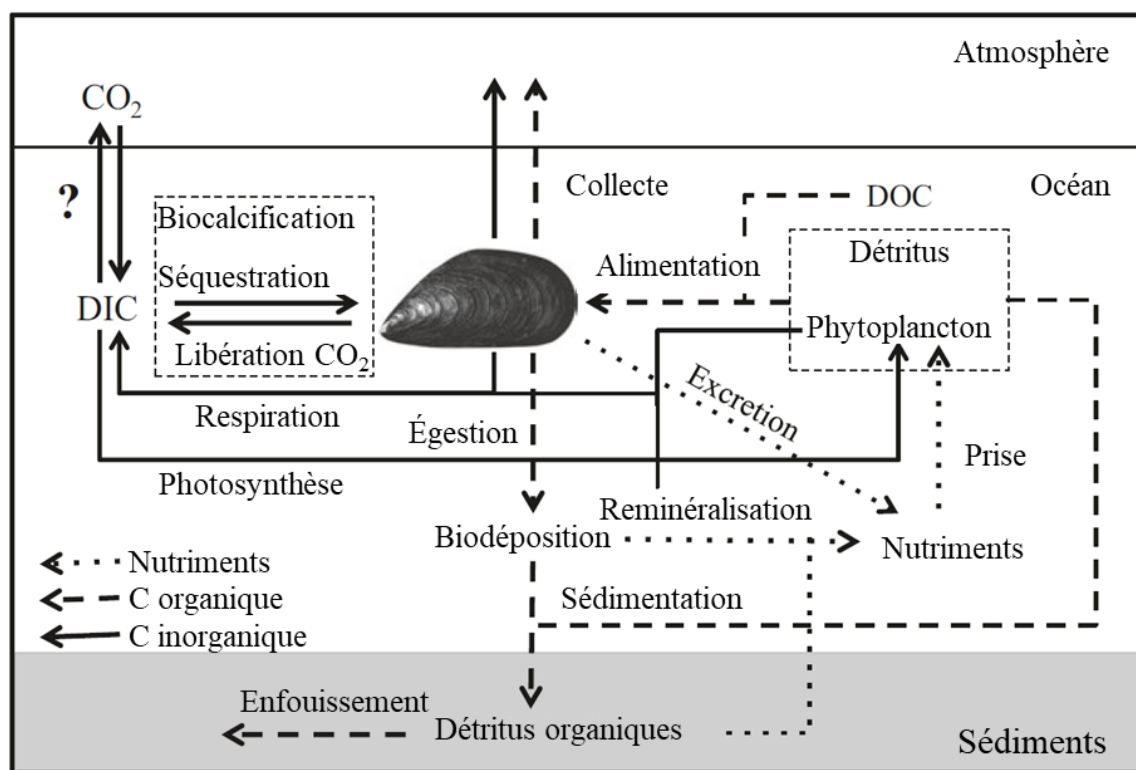


Figure 8. Approche écosystémique du cycle du carbone (lignes continues et pointillées pour le carbone organique et inorganique, respectivement) et rétroaction de la mytiliculture sur le pool de nutriments inorganiques (ligne pointillée). Modifié de Cranford et al. 2012

Bien que les coquilles de bivalves puissent servir de puits de carbone, il n'est toujours pas clair si l'aquaculture des bivalves agit globalement comme une source ou un puits net de carbone. Les travaux de Álvarez-Salgado et al. (2022) ont entre autres montré que la période

de mise en culture et la durée de la production peuvent affecter le bilan carbone de la mytiliculture. En effet, ils ont démontré que, dépendamment du moment de l'année de la mise en croissance des moules, ces dernières pouvaient avoir un bilan de net de séquestration du carbone, ou au contraire être une source d'émission de carbone. Ils ont également mis en avant l'importance du devenir des déchets, principalement des coquilles de moules, après la consommation humaine. Un effet, le plus souvent ces coquilles sont jetées avec le reste des déchets ménager puis incinérés. La combustion des coquilles va alors libérer dans l'atmosphère une grande partie du carbone stocké sous forme de CaCO_3 .

De plus, l'élevage de bivalves nécessite l'émission de carbone, soit sous forme de carburant utilisé pour les infrastructures, les bateaux, le transport des bivalves récoltés, soit pour les emballages plastiques utilisés dans leur commercialisation et transport (Suplicy 2020, Aubin et al. 2018). Ainsi, les performances environnementales des élevages de bivalves, par rapport à la réduction de carbone, dépendent des pratiques aquacoles employées ainsi que de la quantité de carburant consommée (Aubin et al. 2018). En examinant les pratiques mytilicoles en France, Aubin et al. (2018) ont estimé un impact négatif (séquestration) ou positif (émission) sur le budget carbone allant de -50 à $86 \text{ kg CO}_2\text{-eq tonne}^{-1}$. Les effets sur le bilan carbone dépendraient de la productivité des moules, de la consommation de carburant ainsi que du matériel et des structures d'élevage. En outre, d'autres études ont conclu à des effets nets d'atténuation *via* la séquestration du carbone grâce à la mytiliculture (Fry 2012, Sun et al. 2022). Par exemple, Sun et al. (2022) ont estimé qu'entre 2015 et 2019, la production de fruit de mer en Chine a participé à la séquestration de $6,2 \text{ Mt CO}_2\text{-eq an}^{-1}$; ce qui représenterait un puits de carbone équivalent à une forêt de $12,2 \text{ Mha}$. Ils ont également prédit qu'à l'échelle mondiale, une séquestration de $5,64 \text{ Gt}$ d'équivalent CO_2 pourrait avoir lieu en 2020, ce qui représenterait $17,6 \%$ des émissions annuelles totales de CO_2 de la Chine. Ces auteurs ont considéré la biodéposition, la récolte de la coquille et des tissus mous comme de la séquestration du carbone, tout en considérant la respiration, la calcification de la coquille et la reproduction comme étant de la libération de carbone. De plus, ils ont conclu que la mytiliculture était la production la plus efficace

pour la séquestration du carbone (14.31 t CO₂ ha an⁻¹), par rapport à l'ostréiculture (11.99 t CO₂ ha an⁻¹), aux mangroves (8.29 t CO₂ ha an⁻¹), et herbiers (5.06 t CO₂ ha an⁻¹).

2.4 Impacts de l'aquaculture de bivalves sur les communautés marines

L'aquaculture de bivalves affecte les communautés entourant les fermes par leur excrétion d'ammoniaque, mais aussi *via* la biodéposition. En effet, le catabolisme des fèces et des pseudofécès peut entraîner des changements dans les communautés microbiennes (Lee et al. 2015, Murphy et al. 2019). De plus, l'augmentation de la matière organique sur le fond marin peut entraîner un changement des communautés benthiques sous les fermes, avec une plus grande abondance d'espèces opportunistes telles que *Prionospio steenstrupi* et *Pectinaria granulata* (McKindsey et al. 2012, Callier et al. 2008, Callier et al. 2009, Pocklington et al. 1994, Carregosa et al. 2014), pouvant mener à une augmentation concomitante de la consommation d'oxygène benthique (Giles et al. 2006, Christensen et al. 2003). Ces changements peuvent potentiellement réduire la biodiversité benthique sous les fermes de bivalves, en particulier lorsque le niveau de biodéposition est élevé et que les conditions de renouvellement de l'eau sont faibles, ce qui peut entraîner une diminution de la concentration en oxygène (Callier et al. 2009, Mirto et al. 2000, McKindsey et al. 2011). Cependant, les structures déployées pour l'élevage des bivalves peuvent aussi augmenter la biodiversité, car elles peuvent servir d'habitat à d'autres espèces (Shumway et al. 2003, Theuerkauf et al. 2021, Brand et Jeffs 2022, Drouin et al. 2015). Les structures aquacoles ainsi que les bivalves eux-mêmes peuvent servir de support de fixation pour de nombreuses espèces, en particulier pour les espèces biosalissantes telles que les tuniciers (Comeau et al. 2015, Forrest et Atalah 2017, Atalah et al. 2020, Brand et Jeffs 2022) (Figure 9).



Figure 9. Photographies sous-marines prises par des plongeurs montrant une ligne de moules et l'épifaune qui lui est associée (modifié de Sardenne et al. 2019)

L'augmentation de la biodiversité benthique sous la ferme est souvent associée à la chute des bivalves lors de leur croissance et plus particulièrement lors de la récolte (Bourque et Myrand 2006). En effet, les bivalves qui tombent sur le fond marin sont une source de nourriture pour les prédateurs (crustacés, étoiles de mer et gastéropodes), augmentant ainsi l'abondance locale de ces derniers (Drouin et al 2015, D'Amours et al 2008, Wilding et Nickell 2013, Sardenne et al 2019).

3. CHUTE ET ATTACHEMENT DE MOULES

3.1 Chute (fall-off) de moules

Dans la culture de moules en boudins, la proportion de moules se détachant des boudins suspendus avant la récolte est considérable, pouvant aller de 30 à 46 % de la production (Bourque et Myrand 2006, Comeau et al. 2017). Cependant, la chute de naissain depuis les

collecteurs est généralement plus importante encore et a été estimée entre 75 à 89 % du naissain (Comeau et al. 2015, 2017). Pour compenser ces pertes, les mytiliculteurs tendent à augmenter les densités initiales d'élevage, ce qui entraîne nécessairement une augmentation de l'entretien nécessaire pour le maintien des moules ainsi que des impacts sur l'environnement. La chute des moules peut entraîner des déplacements indésirables des ressources énergétiques vers les fonds marins (Comeau et al. 2017, Fréchette 2012). Fréchette (2012) a calculé que la biomasse de moules perdue en raison du détachement pendant la phase de croissance était environ trois fois la biomasse effectivement récoltée par les mytiliculteurs pour la commercialisation et représenterait jusqu'à 59 % de l'apport total de matière organique vers les fonds marins. Plusieurs facteurs, tels que des impacts environnementaux, biologiques et de manipulation, peuvent influencer le détachement des moules allant du pré-ensemencement jusqu'aux conditions de transport (Figure 10) (South et al. 2021, South et al. 2022

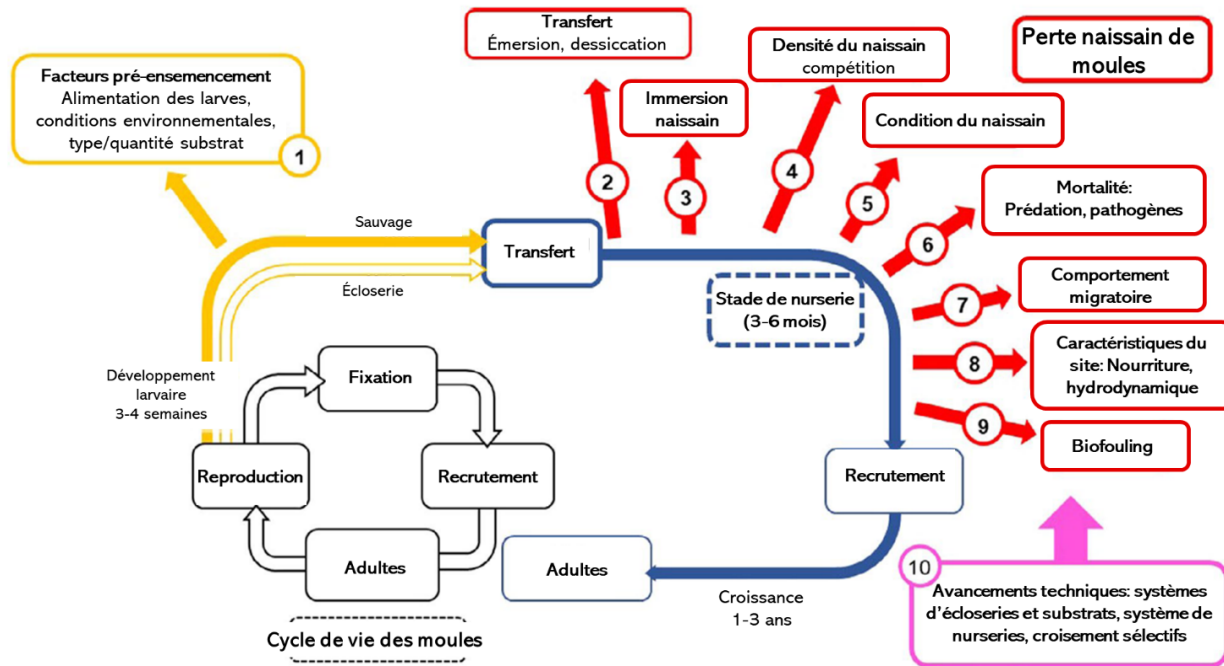


Figure 10. Diagramme montrant le cycle de vie des moules *Mytilus* (en bas à gauche, lignes noires), son intégration dans la production aquacole et 10 facteurs relatifs aux pertes de moules pendant le pré-ensemencement et les stades de pouponnière. Deux sources de naissain (1) sont représentées : sauvages et d'écloserie (flèches jaunes remplies et non remplies, respectivement). Les facteurs de pré-ensemencement qui peuvent influencer les pertes après l'ensemencement sont indiqués par une flèche jaune pleine (notez que ces facteurs peuvent être gérés en écloserie). Les stades d'alevinage et de grossissement de la mytiliculture sont représentés par des lignes bleues et des flèches. Les causes des pertes survenues au stade de la pouponnière (2-9) sont indiquées par des flèches rouges pleines. Des avancées technologiques (10), dans la case rose, sont les facteurs nécessaires pour gérer et réduire les pertes tout au long du stade de pouponnière. Les pertes d'alevins de moules au stade de la pouponnière peuvent représenter > 95 % de la densité de départ. Modifié de South et al. 2022

L'auto-amincissement est l'un des facteurs les plus récurrents agissant sur la chute des moules et résulte de la compétition intraspécifique pour la nourriture et l'espace (Fréchette et al. 1996, Fréchette et al. 2010, Fréchette 2012, Gagnon 2019, Guiñez 2005a, Guiñez 2005b, Comeau et al. 2015, 2017, Lachance-Bernard et al. 2010). Fréchette et al. (2010) ont attribué la majeure partie de la perte de moules résultant de l'auto-amincissement à une compétition pour l'espace. Cette perte de moules peut être intensifiée par la présence d'encrassements biologiques (biofouling) et à la compétition interspécifique pour un espace et des ressources alimentaires limités (Comeau et al 2015). Le détachement peut se produire lorsque la force d'attachement de la moule est dépassée par la somme des forces qui lui sont appliquées (Gagnon 2019, Carrington et al. 2015). Les forces nécessaires pour détacher les moules dépendent de la qualité des fibres de byssus (comme discuté ci-dessous), du nombre de fibres produites, de la fixation par les moules voisines, du poids des moules, de la vitesse de l'eau et de l'effet des vagues, et de l'angle entre la force appliquée et les fibres de byssus (Gagnon 2019, Cole et Denny 2014).

3.2 Forces d'attachement

Les moules peuvent s'attacher au substrat, à des cordes ou à leurs congénères grâce à la production d'un tissu spécifique appelé le byssus. La qualité des fibres de byssus ainsi que leur nombre jouent un rôle central dans la force d'attachement de la moule (Smeathers et Vincent 1979, Bell et Gosline 1996, Bell et Gosline 1997). Le diamètre des fibres est également connu pour être essentiel pour leur résistance et par conséquent pour leur force d'attachement (Bouhleb et al. 2017, Hennebicq et al. 2013). Par exemple, Bouhleb et al. (2017) ont analysé les propriétés mécaniques des fibres de byssus de diverses espèces de bivalves et ont conclu que le diamètre expliquerait 62% de la force ultime des fibres. Le stade de développement des moules et leurs conditions environnementales peuvent également affecter la production de byssus ainsi que les propriétés des fibres. Par exemple, Babarro et Carrington (2013) ont observé chez *M. galloprovincialis* une corrélation positive entre la taille de la moule et l'épaisseur des fibres de byssus, ainsi qu'une corrélation négative entre la taille de la moule et le nombre de fibres sécrétées, suggérant la production de moins de

fibres mais de meilleure qualité chez les moules de grande taille. Cependant, une vitesse d'écoulement élevée peut diminuer la performance mécanique des fibres de byssus, ce qui suggère que les grandes moules auraient tendance à être plus vulnérables à l'action des vagues dans les environnements avec des courants importants (Babarro et Carrington 2013). D'autres études sur *M. edulis* et *P. canaliculus* tendent à indiquer que les flux d'eau ainsi que la turbulence peuvent stimuler la production de byssus et, par conséquent, améliorer la force d'attachement des moules (Lachance et al. 2008, Alfaro 2006, Dolmer et Svane 1994). Des variations saisonnières de la force d'attachement et de la production de fibres de byssus ont également été observées. Ces variations ont été associées aux changements saisonniers de la disponibilité des métaux agissant sur le schéma de réticulation entre les fibres de byssus individuelles, à la température et à l'investissement de reproduction (Lachance et al. 2008, Lachance et al. 2011, Seguin-Heine et al. 2014). Des expériences en laboratoire et sur le terrain ont suggéré une relation directe entre la température de l'eau, le nombre de fibres produites et la force de fixation, et ce jusqu'à ce qu'une température optimale soit atteinte, au-dessus de laquelle la force de fixation diminue avec l'augmentation de la température (Young 1985, Rupp and Parsons 2004, Selin and Vekhova 2004, Garner and Litvaitis 2013). À des températures défavorablement élevées, la qualité des fibres de byssus est également affectée, ce qui entraîne une force d'attachement plus faible (Garner and Litvaitis 2013, Seguin-Heine et al. 2014, Moeser et Carrington 2006, Carrington 2002a). Par exemple, Li et al. (2020) ont observé une production de fibres avec un diamètre réduit chez les moules *M. coruscus* exposées à des températures élevées. Ces résultats étaient liés à la diminution de la polyphénol oxydase du byssus et impliquent des effets néfastes des changements climatiques et du réchauffement concomitant des océans sur les propriétés d'attachement des moules.

Chez *M. edulis*, la reproduction et en particulier les événements de ponte ont été associés à une réduction de 32 à 40 % de la force d'attachement du byssus (Lachance et al. 2008, Seguin-Heine et al. 2014), ce qui est en accord avec les études sur *M. galloprovincialis* qui montrent une réduction de la byssogenèse et de l'efficacité d'absorption des aliments chez les moules ayant pondu (Babarro et Reiriz 2010). Hennebicq et al. (2013) ont également démontré, en conditions de laboratoire, que la ponte affecte directement la résistance du

byssus, par la production de filaments avec des diamètres réduits et de faibles concentrations en acides aminés, notamment une diminution en histidine et en lysine. Ensemble, ces résultats suggèrent des compromis énergétiques, en particulier chez les moules exposées à un habitat hydrodynamique turbulent, avec plus d'énergie allouée dans les tissus protecteurs (attachement du byssus et épaisseur de la coquille) et moins d'énergie dans les tissus mous, comme les gonades (Carrington 2002a, Moeser et Carrington 2006). La gamétogenèse est un processus énergétique très coûteux dont on estime qu'il peut nécessiter de 50 à 90 % de l'énergie dépensée par les moules (Babarro et Reiriz 2010, Lachance et al. 2008). En outre, la byssogenèse est également un processus énergétiquement exigeant, pouvant nécessiter entre 8 et 15 % du budget énergétique des moules (Griffiths et King 1979, Babarro et Reiriz 2010). Une étude récente de Roberts et al. (2021) a montré que ce coût énergétique peut être beaucoup plus élevé, en particulier lorsque les moules produisent de nombreuses fibres de byssus. En endommageant artificiellement et successivement le byssus des moules, ils ont découvert qu'elles pouvaient produire 5 fois plus de fibres de byssus. Ainsi, les auteurs ont démontré que ces moules investissaient jusqu'à 66 % de leur budget énergétique dans des coûts non reproductifs contre un maximum de 24 % chez le groupe contrôle. Ces coûts accrus de byssogenèse étaient liés à la réduction de la croissance des tissus mous et de la coquille.

3.3 Composition et propriétés mécaniques du byssus

Les fibres de byssus peuvent être comparées aux tendons humains, car elles sont rigides et capables de supporter des tensions importantes. Cependant, elles sont six fois plus résistantes que les tendons humains (Bell et Gosline 1996, Waite et al. 1998, Troncoso et al. 2008) et ont la capacité de se réparer elles-mêmes (Allen et al. 1976, Vaccaro et Waite 2001, Carrington et Gosline 2004, Harrington et Waite 2007, Harrington et al. 2009, Reinecke et al. 2016, Bouhleb et al. 2017). Le byssus est produit par la glande byssale, qui est située dans une rainure à l'intérieur du pied des moules, par un processus similaire au moulage par injection de polymères (Waite et al. 1998). La morphologie du byssus a été décrite comme étant une structure constituée de six parties différentes (Figure 11) (Smeathers et Vincent 1979). La première partie est la racine du byssus qui est fixée au byssus. Poussant à partir de

la racine, la tige supporte de 20 à 60 fibres de byssus (Bell et Gosline 1997) aidée par les anneaux des fibres qui sont directement attachés à la tige. Les quatrième et cinquième parties sont la partie proximale ondulée et la partie distale lisse de la fibre. La partie ondulée proximale est plate en section transversale et hautement extensible. Bien que moins extensible, la partie distale de la fibre de byssus représente environ 65 à 75 % de sa longueur, mais a un diamètre inférieur à la partie proximale. Enfin, le disque adhésif ou plaque adhésive est situé à l'extrémité de la fibre de byssus et est directement fixé au substrat. L'ensemble du byssus permet aux moules de se maintenir sur le substrat jusqu'à des vitesses de courant de 10 m/s et des accélérations de 400 m/s² (Troncoso et al. 2008).

La structure moléculaire des fibres de byssus est composée de protéines de type collagène appelées préCols (Qin et al. 1997, Waite et al. 1998, Harrington et Waite 2007, Troncoso et al. 2008, Hagenau et al. 2011, Bouhleb et al. 2017). Des études sur la structure des préCols ont révélé que les protéines possèdent des séquences peptidiques, mais pas de site de N-glycosylation ni les propéptides classiques du procollagène (Waite et al. 1998). Cependant, un domaine central de collagène pesant entre 40 et 50kDa a été observé. Ce domaine correspond approximativement à la moitié de la molécule. Trois préCols différents ont été décrits dans les fibres de byssus. Le préCol-P est présent dans la région élastique proximale des fibres, tandis que la protéine majeure de la région rigide distale est le préCol-D. Le troisième type de préCols est le préCol-NG (non gradué) qui est présent à la fois dans les régions distale et proximale (Arnold et al. 2013). Le préCol-NG est un préCol hybride qui possède des propriétés de préCol-P et de préCol-D. Des domaines flanquant spécifiques sont présents des deux côtés du domaine collagène. Ces domaines structuraux sont spécifiques pour chaque préCol. Le préCol-P est flanqué de domaines de type élastine, tandis que le préCol-D est entouré de "spider dragline silk". Pour les préCols-NG, ces domaines sont similaires aux protéines des parois cellulaires à forte teneur en glycine (Gly) (Waite et al. 1998). Il est connu que la présence de métaux comme le fer ou le cuivre est importante pour maintenir les propriétés mécaniques des fibres de byssus et permettre leur résistance ainsi que leur élasticité (Vaccaro et Waite 2001, Holten-Andersen et al. 2009). Afin de se lier aux métaux, les fibres de byssus contiennent une quantité importante de résidus d'histidine,

connus pour avoir une grande affinité pour les métaux. En effet, la stabilisation des préCols inter- et intra-moléculaires est régie par la liaison de molécule de métal aux résidus histidine (Waite et al. 2002).

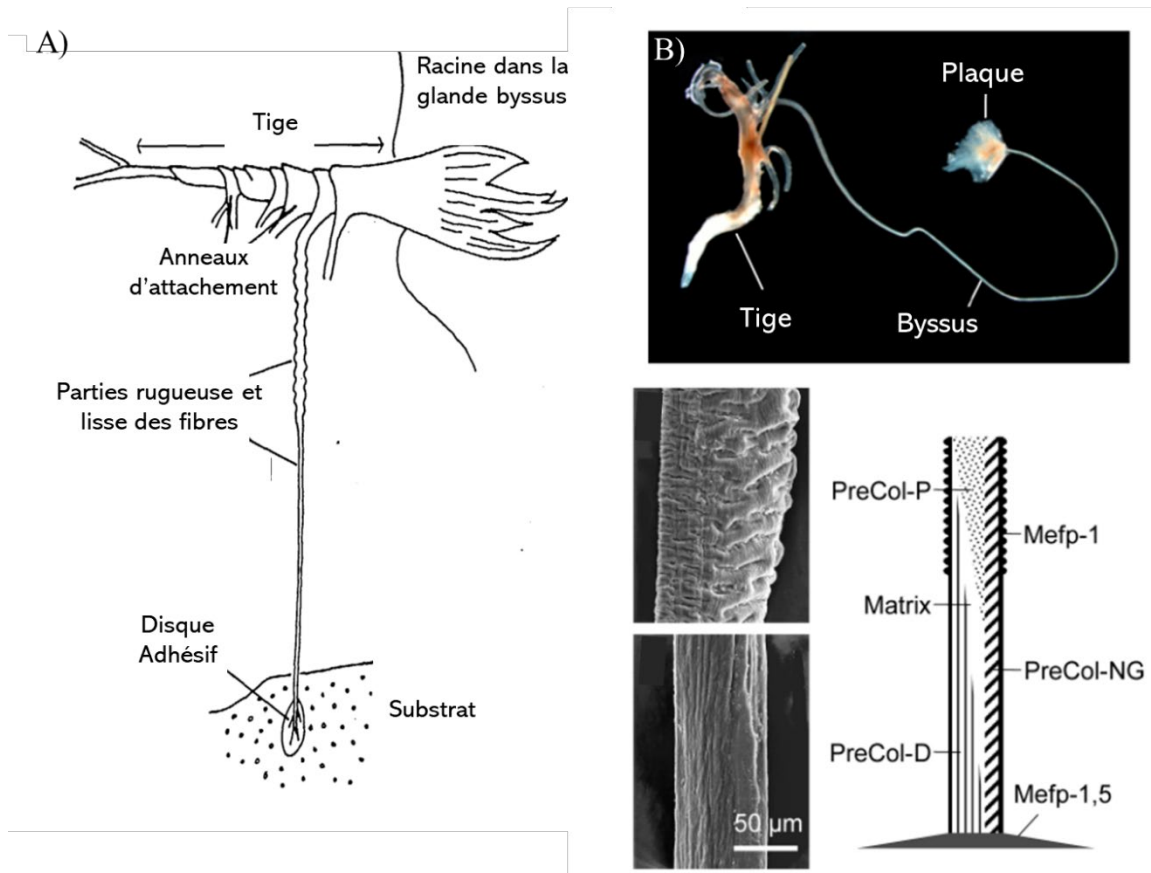


Figure 11. Représentation schématique de la composition des fibres de byssus. A) Image des fibres de byssus avec mise en avant de la partie proximale élastique, la partie distale rigide et la plaque de byssus. Modifié de Smeathers et Vincent 1978. B) Image des fibres de byssus avec description de la composition en préCols des fibres, ainsi que leur localisation dans les fibres. Modifié de Arnold et al. 2013

Le processus de synthèse des fibres de byssus est extrêmement rapide et une fibre peut être produite en 3 à 5 minutes (Priemel et al. 2017). Ainsi, des stocks de précurseurs byssaux semblent être continuellement présents dans les glandes byssales (Waite et Harrington 2022). Il est supposé que trois types différents de protéines soient stockés, 1) le collagène dans la glande collagène, 2) les cathécoloxydases qui seraient présentes dans la glande accessoire,

également appelée glande enzymatique ou glande cuticule, et 3) les protéines catécholiques présentes à la fois dans la glande accessoire et la glande phénolique, également appelée glande à plaque (Figure 12) (Waite et Harrington 2022). Chacune de ces 3 glandes est remplie de vésicules de sécrétion permettant ainsi une production presque instantanée de fibre de byssus (Waite et Harrington 2022).

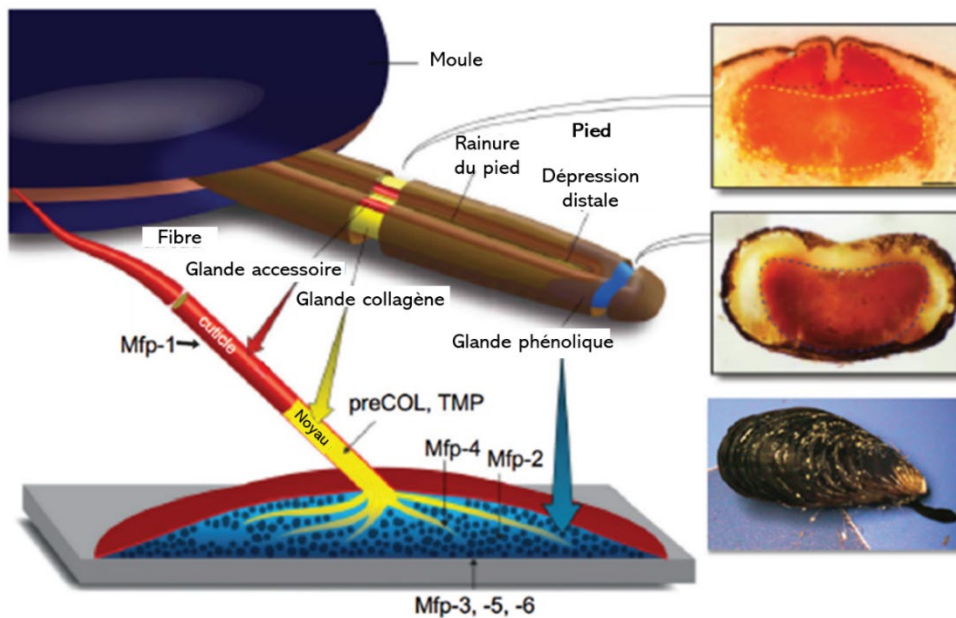


Figure 12. Relation entre le pied de moule et la production d'une nouvelle fibre de byssus. De nouvelles fibres sont modélisées par injection à la demande dans la rainure de la pédale et la dépression distale du pied à partir de précurseurs stockés dans trois glandes, connus sous le nom de glandes phénol (bleu), collagène (jaune) et accessoires (enzyme ou cuticule) (rouge). Des tranches de deux pieds, une proximale et une distale, colorées par la méthode d'Arnou, montrent des catéchols répartis dans tout le noyau du pied mais atteignant les niveaux les plus élevés dans les glandes accessoires et phénoliques. La distribution de huit protéines dérivées du pied, toutes contenant de la DOPA, est montrée. Modifié de Waite et Harrington 2022 et adapté de DeMartini et al. 2017

La formation du noyau allant de la base du pied à la dépression distale entourant la rainure se produit dans la glande de collagène, la plus grande des trois glandes. Dans cette glande, les préCOLs sont stockées sous forme de mésophase de cristal liquide smectique dans

les vésicules (i.e. arrangement des molécules en couches parallèles) (Jehle et al. 2021). Il a été suggéré que la transition du pH du milieu acide dans la vésicule au pH plus basique de l'eau de mer pourrait, au moins partiellement, expliquer comment le cristal liquide des préCols peut rapidement passer du liquide au solide (Waite et al. 1998, Harrington et Waite 2008). Puis, lors de la fabrication de la fibre, le noyau collagénique est recouvert d'une cuticule protectrice (Priemel et al. 2017) provenant de l'enzyme ou la glande accessoire. Enfin, la glande phénolique forme la plaque sécrétée dans la dépression distale du pied avec des protéines riches en acides aminés phénoliques stockées en condition réductrice et au pH particulièrement acide de 2 (Waite et Harrington 2022, Priemel et al. 2017, Priemel et al. 2020, Martinez Rodriguez et al. 2015) (Figure 13).

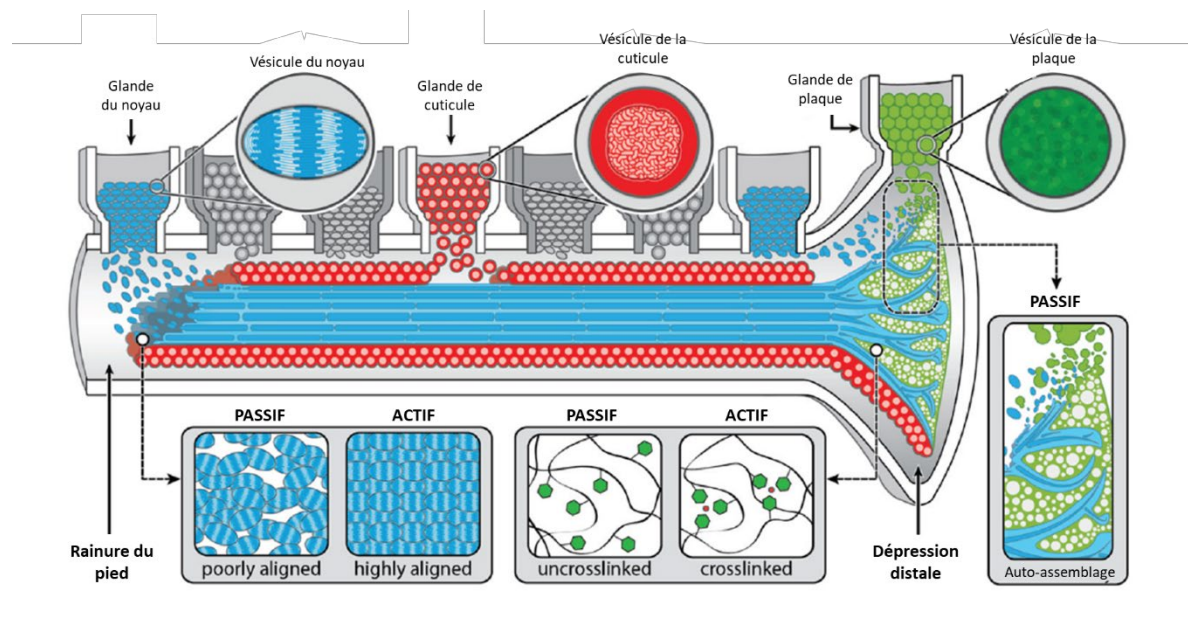


Figure 13. Vue d'ensemble schématique de la sécrétion de fibre ressemblant à la modélisation par injection, mettant en évidence les aspects passifs et actifs du processus d'assemblage. Modifié de Waite et Harrington 2022 adapté de Priemel et al. 2017 sous licence creative commons (CC BY 4.0)

La résistance du byssus peut être mesurée en exerçant une tension croissante sur les fibres de byssus jusqu'à atteindre une charge sous-critique, puis en réduisant la tension. De tels mécanismes montrent le cycle de charge/tension ainsi que de déformation de la fibre de

byssus (Carrington et Gosline 2004). Des études ont montré que le comportement des fibres est dépendant de l'allongement appliqué sur la fibre. Lorsque l'extension est inférieure au seuil, les fibres sont très résistantes. À faible extension, la région distale est rigide et hautement résiliente (Carrington et Gosline 2004). De plus, la région distale est très stable et le comportement tension-rigidité est principalement déterminé par la région proximale. À basse tension, la région proximale peut se stabiliser entre les cycles et présenter un "adoucissement du stress" (Carrington et Gosline 2004). En revanche, lorsque le seuil est dépassé, les fibres sont moins élastiques, la rigidité est réduite et une quantité importante d'énergie est perdue pendant le cycle de charge. En effet, lorsque l'extension du cycle est dépassée, la région distale se déforme et l'énergie est dissipée par frottement (Carrington et Gosline 2004). Cela conduit rapidement à une perte de conformation et à une faible rigidité qui se traduit par une dissipation d'énergie réduite. Néanmoins, la déformation est réversible et après quelques jours la région distale retrouve sa rigidité et sa capacité à dissiper l'énergie. De tels phénomènes montrent que les byssi des moules sont capables d'auto-guérison et peuvent retrouver leurs propriétés élastiques et rigides même après un stress excessif. Krauss et al (2013) ont observé un allongement du cadre des préCols lors de la déformation des fibres ce qui provoque une récupération rapide et élastique lorsque la charge appliquée sur la fibre est retirée. Il a été observé que le domaine collagène des préCols ne s'allonge pas significativement (Harrington et al. 2009). Cependant, des preuves tendent à indiquer que les allongements des fibres de byssus résultent du dépliement et de l'allongement des domaines flanquants et riches en histidine (Harrington et al. 2009, Hagenau et al. 2011, Krauss et al. 2013, Reinecke et al. 2016). En effet, des feuilletts bêta et des structures en triple hélice de collagène ont été trouvés dans les domaines flanquants des préCols, et pourraient agir comme cadre élastique (elastic frame) (Hagenau et al. 2011, Arnold et al. 2013, Reinecke et al. 2016). De plus, des réseaux sacrificiels ont été trouvés dans les fibres de byssus. Ces réseaux consistent en des liaisons non covalentes telles que des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques ou de coordination avec des métaux, qui, dans le cas des fibres de byssus, peuvent comprendre les interactions entre la région riche en histidine et les métaux présents dans les fibres (Reinecke et al. 2016). La rupture d'une telle interaction peut entraîner une

augmentation de la longueur lors de la déformation des protéines (Krauss et al. 2013, Reinecke et al. 2016), conduisant finalement à une augmentation de la longueur de la fibre (Figure 14) (Reinecke et al. 2016). Il a été suggéré que la rupture des liens sacrificiels, résultant de la coordination des métaux, était impliquée dans le processus de dissipation d'énergie dans les fibres de byssus (Vaccaro et Waite 2001, Harrington et Waite 2007, Reinecke et al. 2016). Le comportement dissipatif des fibres de byssus ainsi que leur capacité d'auto-régénération sont dus à la fois au réseau sacrificiel ainsi qu'aux cadres de protéines élastiques avec une structure de feuillet bêta croisé présentant les domaines flanquants des préCols (Reinecke et al. 2016).

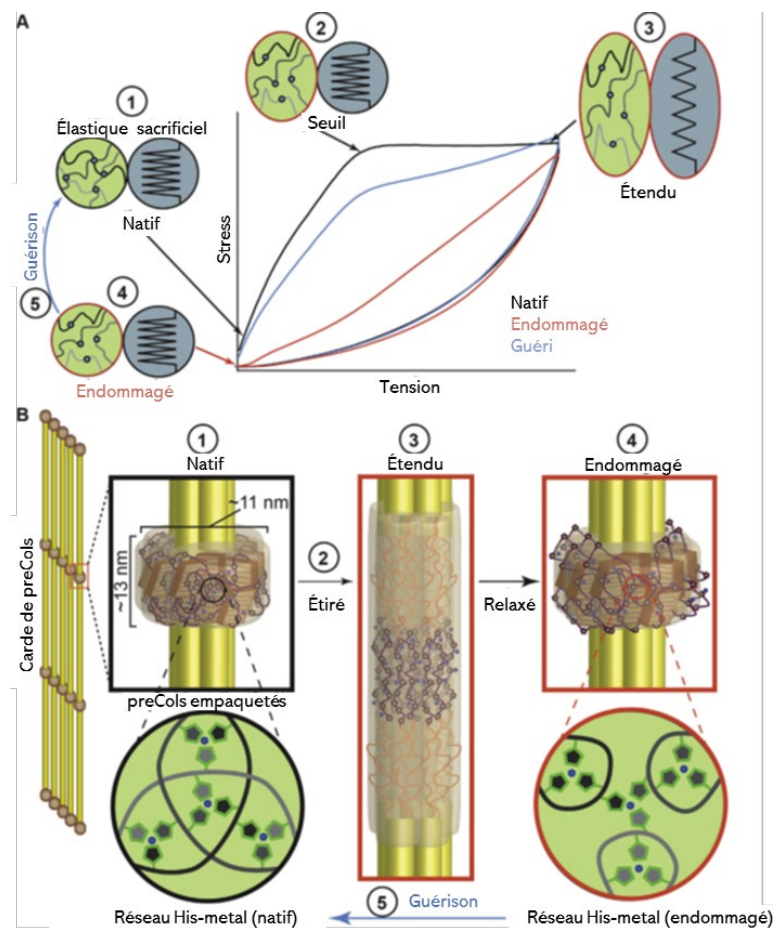


Figure 14. Représentation du comportement mécanique d'une fibre de byssus sous tension et après relâchement de la tension. L'importance des liens sacrificiels. De Reinecke et al 2016

4. POLYPLOÏDIE

La plupart des poissons et des bivalves sont naturellement diploïdes, leur ADN étant stocké dans des paires de chromosomes. Cependant, il est possible de manipuler leur fécondation pour ajouter un ensemble de chromosomes et obtenir des organismes triploïdes. Ces poissons (truites et saumons) et bivalves (huîtres, palourdes, moules et pétoncles) triploïdes ont une fertilité plus faible ou peuvent même être entièrement stériles (Allen Jr et al. 1982, Allen Jr et Downing 1986a, Komaru 1989, Allen Jr et Downing 1990, Komaru et al. 1995, Kiyomoto et al. 1996, Benfey 2016). Les effets de la triploïdie sur la gamétogenèse peuvent varier selon les espèces. Certains bivalves ont développé des gamètes non matures ou sont complètement stériles, à l'instar de *Chlamys nobilis* ou *Mya arenaria* (Allen Jr et Downing 1986a, Komaru et al. 1988). D'autres espèces de bivalves ont au contraire été capables de produire des gamètes fertiles, comme observé chez *Crassostrea gigas* (Guo et Allen Jr 1994a). La réduction de la fertilité due à la triploïdie chez les bivalves est souvent associée à un investissement reproductif réduit et à une relocalisation de l'énergie pour d'autres besoins physiologiques et métaboliques tels que la croissance (Ruiz-Verdugo et al. 2000, 2001). En effet, plusieurs études ont montré que les bivalves triploïdes avaient une croissance plus rapide (Allen Jr et Downing 1986b, Allen Jr et Downing 1990, Brake et al. 2002, Brake et al. 2004). Cette énergie relocalisée pourrait également être investie pour un système immunitaire accru, offrant ainsi une meilleure résistance face aux pathogènes chez les organismes triploïdes (Nell 2002, Duchemin et al. 2007). Par exemple, il a été démontré que les huîtres triploïdes peuvent avoir une activité phagocytaire plus élevée, ce qui résulterait en une meilleure tolérance aux toxines des algues nuisibles, comme *Alexandrium minutum* (Haberkorn et al. 2010). Cependant, certaines études suggèrent que l'avantage de la triploïdie pourrait dépendre des conditions environnementales (Brake et al. 2004, Duchemin et al. 2007, Callam et al. 2016). Par exemple, les huîtres triploïdes semblent montrer une croissance plus élevée sous des latitudes plus chaudes que dans des eaux plus froides (Nell 2002), ce qui suggérerait un rôle significatif de la température sur les avantages triploïdes. Des résultats similaires ont été observés avec la disponibilité de la nourriture pour les

coquilles Saint-Jacques. En effet, dans les environnements trophiques riches, l'utilisation des réserves énergétiques était moindre, réduisant la différence entre les diploïdes et les triploïdes (Maldonado-Amparo et al. 2004, Racotta et al. 2008).

Une caractéristique particulière qui a été observée chez les bivalves triploïdes est la possibilité d'une réversion de la triploïdie (Allen Jr et al. 1996, Miyagoshi et Fujikawa-Yamamoto 2006, Zhang et al. 2010a, Zhang et al. 2010b). Une fois débutée, la réversion de la triploïdie est un processus progressif avec un nombre croissant de cellules diploïdes dans les organismes, ce qui peut ultimement mener à un retour vers un organisme complètement diploïde (Allen Jr et al. 1996, Zhang et al. 2010a, Zhang et al. 2010b). Zhang et al. (2010a) ont observé chez les huîtres la présence d'amas de chromosomes présents dans les cellules lors de la métaphase. Le nombre de cellules avec des amas de chromosomes était positivement corrélé avec le nombre total de cellules hypotriploïdes avec un nombre de chromosomes compris entre 20–26 ou 26–29 par cellule. Ils ont donc proposé que les amas de chromosomes puissent mener à une mauvaise ségrégation lors de la division cellulaire, ce qui résulterait en la formation de cellules aneuploïdes. Cette perte de chromosomes pourrait être un processus rapide, car les cellules perdent de nombreux chromosomes en même temps. La perte d'un ensemble complet de chromosomes semble se produire au travers de nombreuses étapes, et entraîner des conséquences importantes, comme la récupération de la fertilité et la perte de l'avantage des triploïdes (Zhang et al. 2010a).

5. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

5.1 Portée de l'étude

Atlantic Aqua Farms est une compagnie de production de bivalves basée sur l'Île-du-Prince-Édouard (Î.-P.-É.), qui s'intéresse actuellement au développement d'écloseries de moules, afin de produire du naissain de meilleure qualité, et ce, même durant les années où la productivité naturelle est faible. Une solution pour améliorer la qualité du naissain serait de développer des moules triploïdes. En effet, ces dernières devraient avoir une fertilité

réduite, mais une meilleure croissance, leur permettant ainsi d'atteindre leur taille commerciale plus rapidement. Les mytiliculteurs pourraient ainsi obtenir de meilleurs rendements. De plus, une croissance plus rapide pourrait se traduire par un meilleur contrôle des environnements eutrophiques. En effet, en raison de leur croissance plus rapide, les triploïdes devraient avoir une consommation plus élevée et plus rapide des algues responsables de l'eutrophisation qui se sont développées suite aux apports anthropiques de nutriments. Cela pourrait aider à extraire les déchets anthropiques du système marin une fois les moules récoltées. De plus, comme les bivalves devraient grandir plus rapidement, leur coquille se développerait également plus vite, ce qui pourrait entraîner une séquestration plus élevée du carbone sous forme de CaCO_3 . Ainsi, l'impact écologique de la mytiliculture devrait être réduit avec une empreinte carbone améliorée grâce à cette réduction accrue du carbone par les moules triploïdes.

De plus, comme les bivalves triploïdes investissent moins d'énergie dans la reproduction et ont donc plus d'énergie disponible pour d'autres activités métaboliques et physiologiques, nous émettons l'hypothèse que les moules triploïdes pourraient avoir une byssogénèse améliorée résultant en de meilleures performances physiologiques et d'attachement du byssus. Cet attachement amélioré conduirait à moins de pertes dues au détachement des moules, notamment lors de la manipulation, et donc à des profits plus élevés pour l'industrie. De plus, avec des moules triploïdes possédant une meilleure fixation, les éleveurs pourraient réduire les densités de moules sur les boudins, ce qui en retour pourrait réduire le phénomène d'auto-amincissement, améliorant encore une fois le rendement de la production.

5.1.1 Modèles d'étude et zones d'étude : du naissain à la taille commerciale

Dans cette thèse, j'ai utilisé des moules diploïdes d'élevage de *Mytilus edulis* sp. (longueur de coquille, 50–60 mm) qui ont été échantillonnées au hasard dans une concession de moules dans la baie St Peters à l'Île-du-Prince-Édouard, Canada (46° 26' 30,7" N, 62° 44' 51,3" O) (Figure 15). À partir de ces moules, des naissains triploïdes ainsi que des contrôles

diploïdes ont été produits au laboratoire humide de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR, Québec, Canada). Ces naissains ont été élevés jusqu'à l'atteinte d'une taille commerciale au laboratoire humide de l'Université du Québec à Rimouski. En parallèle, d'autres lots de moules triploïdes et diploïdes ont été produits à l'Île-du-Prince-Édouard et élevés dans un laboratoire aquatique portatif avec un système d'eau courante au port de Georgetown, Î.-P.-É.

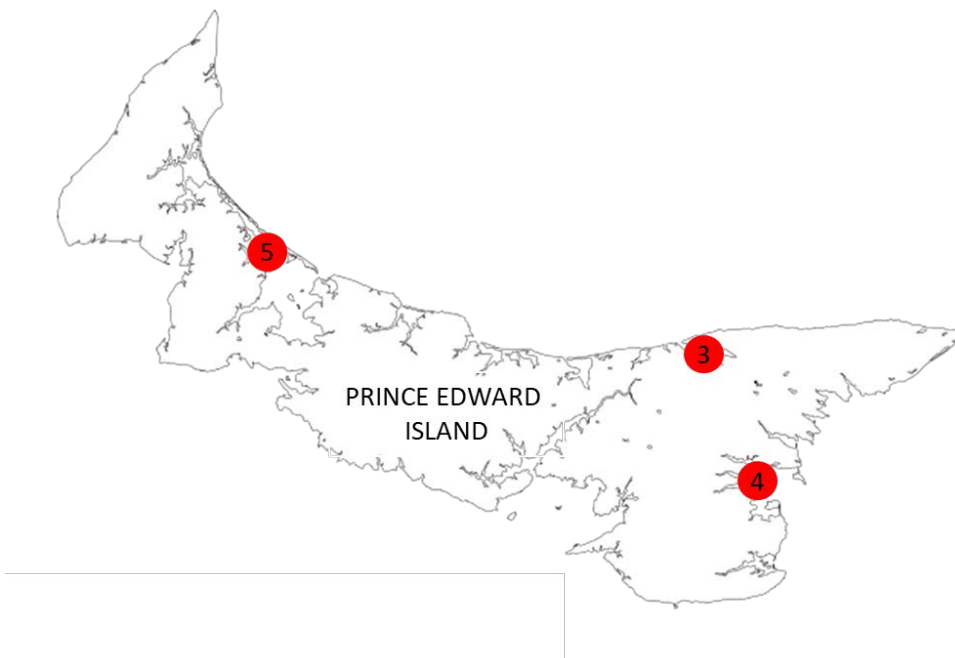


Figure 15. Carte des lieux d'échantillonnage et de travail en laboratoire (1) Laboratoire humide de l'université du Québec à Rimouski, (2) Île-du-Prince-Édouard (Î.-P.-É.), (3) St Peters Bay, (4) Georgetown harbour, (5) Lennox Island. Modifié de Clayden et al. 2010

5.2 Objectifs spécifiques et hypothèses

L'objectif principal de ma recherche doctorale était de déterminer si les moules triploïdes peuvent représenter un intérêt pour l'aquaculture, notamment grâce à une fixation améliorée et une activité reproductrice réduite. Je me suis particulièrement intéressé à la production de fibres de byssus par les moules triploïdes, ainsi qu'à leur activité physiologique. En effet, j'ai supposé que la triploïdie induirait une réduction de l'activité reproductrice chez les moules, ce qui conduirait à une redistribution des ressources énergétiques, et pourrait en retour modifier l'activité de certains processus métaboliques tels que la filtration (pour la respiration et l'alimentation), la croissance et la fixation. Avec de telles modifications, la triploïdisation des moules pourrait être un outil d'intérêt pour l'aquaculture, produisant ainsi des moules avec un potentiel amélioré et des taux de production plus élevés. À cet égard, mes recherches aident à répondre à la question générale suivante :

Les moules triploïdes sont-elles bénéfiques pour la mytiliculture au Canada ?

5.3 Chapitre I : Production de moules triploïdes en conditions aquacoles

La première étape pour déterminer si les moules triploïdes peuvent présenter un intérêt pour la mytiliculture est de pouvoir produire efficacement des moules triploïdes dans les conditions réelles d'une éclosierie. En effet, la triploïdisation des moules a déjà été réalisée par inhibition de l'extrusion des globules polaires (Yamamoto et Sugawara 1988, Scarpa et al. 1994, Brake et al. 2002). Cependant, ces méthodes n'étaient guère adaptées aux conditions d'une éclosierie, car elles nécessitent un suivi constant des œufs fécondés ainsi que l'estimation du pourcentage d'œufs ayant déjà extrudé leur globule polaire, ce qui prend du temps et peut être difficile à appliquer pour les productions à grande échelle. De plus, l'un des produits chimiques les plus couramment utilisés pour inhiber l'extrusion des globules

polaires chez les bivalves est la cytochalasine B (CB), un produit qui doit être dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et les œufs traités doivent être rincés avec du DMSO après le traitement, ajoutant ainsi des étapes supplémentaires ainsi que l'utilisation de composés toxiques dans l'écloserie.

Mon objectif était de développer une méthode simple pour produire des moules triploïdes dans les conditions d'une écloserie. De plus, la méthode de production devait induire un pourcentage élevé de triploïdes avec une bonne survie afin d'être intéressante pour la production commerciale de naissain triploïde. À cet égard, j'ai émis les hypothèses suivantes :

- (1) un contrôle étroit du temps d'application du traitement post-fécondation, de la durée du traitement, ainsi que de la température de l'eau, permet la production de niveaux élevés de larves triploïdes;
- (2) les larves triploïdes traitées dans ces conditions contrôlées ont une croissance plus rapide et une survie similaire aux larves témoins non traitées.

Ces hypothèses ont été testées par de multiples analyses présentées au chapitre I. Divers traitements ont été appliqués pour inhiber l'extrusion du second globule polaire afin d'induire la triploïdisation des œufs fécondés. L'efficacité de l'induction de la triploïdie a été évaluée à différentes températures et les traitements ont été appliqués à différents moments post-fécondation. Une analyse de variance multivariée permutationnelle (PERMANOVA), désignée ANOVA, a été appliquée pour comparer les traitements. De plus, la survie et la croissance des larves jusqu'à la fixation ont été comparées par PERMANOVA bidirectionnelle. Des tests *post-hoc* ont été appliqués lorsque des interactions significatives étaient observées afin d'identifier les différences entre les niveaux au sein des facteurs.

5.4 Chapitre II : Fixation et activité métabolique des naissains de moules triploïdes

Les bivalves triploïdes sont connus pour avoir généralement une croissance plus rapide que les diploïdes, probablement en raison de leur faible investissement énergétique dans la

reproduction et de la relocalisation de cette énergie pour d'autres processus métaboliques (Allen Jr et Downing 1986b, Barber et Mann 1991). Chez les moules, l'activité reproductrice a été associée à une réduction de la force d'attachement (Lachance et al. 2008, Seguin-Heine et al. 2014), ce qui peut entraîner une augmentation des pertes de moules par détachement. Il est attendu que les moules triploïdes aient une fertilité réduite et qu'elles aient donc plus d'énergie disponible pour une meilleure fixation que les diploïdes. Cependant, les juvéniles de moules sont encore à un stade où l'investissement reproducteur est minimal (< 30 mm). On peut donc se demander si les triploïdes juvéniles ont une meilleure fixation que les contrôles diploïdes.

Mes objectifs étaient tout d'abord de comparer la production de fibres de byssus entre les juvéniles diploïdes et triploïdes, car le nombre de fibres joue un rôle important dans l'attachement des moules. J'ai également comparé les propriétés mécaniques des fibres de byssus des moules triploïdes et diploïdes juvéniles. Enfin, j'ai étudié les effets de la triploïdie sur les activités métaboliques et physiologiques des juvéniles de moules. J'ai suggéré les hypothèses suivantes :

- (1) bien que les moules juvéniles n'investissent pas massivement dans la reproduction, les juvéniles triploïdes produisent davantage de fibres de byssus avec des propriétés mécaniques améliorées;
- (2) les moules triploïdes juvéniles ont plus d'énergie disponible pour la croissance et d'autres activités métaboliques et physiologiques telles que la filtration que les diploïdes.

Ces hypothèses ont été testées suite à de multiples analyses. La comparaison de la production de fibres de byssus ainsi que la comparaison de leurs propriétés mécaniques ont été analysées par les tests-*t* de Student et validées par le test de Shapiro-Wilk. Des PERMANOVA ont été réalisées pour valider les analyses métaboliques et physiologiques. L'utilisation de PERMANOVA a été choisie pour fournir une analyse de la variance en

présence d'un plan déséquilibré et d'une distribution non normale. Des tests *post-hoc* ont été effectués lorsque des interactions significatives ont été détectées.

5.5 Chapitre III : Activité reproductrice des moules triploïdes

Alors que la triploïdie chez les bivalves est souvent considérée comme réduisant leur fertilité ou même aboutissant à une stérilité complète, les niveaux de réduction de la fertilité peuvent varier selon les espèces et les études (Allen Jr et al. 1982, Allen Jr et Downing 1986a,b, Komaru 1989, Guo et Allen Jr 1994a). De plus, une variation de la fertilité des bivalves triploïdes peut être observée au sein d'une même espèce. En effet, Jouaux et al. 2010 ont montré que les huîtres triploïdes *Crassostrea gigas* pouvaient avoir des modèles Alpha (α) ou Beta (β), le premier modèle étant attribué aux huîtres triploïdes produisant une quantité importante de gamètes, tandis que le second était attribué aux huîtres avec seulement une faible production de gamètes. De plus, d'autres études ont montré des sexe-ratios altérés chez les bivalves triploïdes (Kiyomoto et al. 1996) ou un retard de maturation des gamètes (Cox et al. 1996). À cet égard, il était intéressant d'examiner l'investissement reproducteur des moules triploïdes. Mon objectif était de comparer l'investissement reproducteur et la maturation des gamètes et des gonades sur l'ensemble de la saison de reproduction chez des moules diploïdes et triploïdes de deux groupes de tailles : < 30 mm, et taille commerciale (> 50 mm). Le sexe-ratio des moules sexuellement matures a également été comparé. J'ai émis les hypothèses suivantes :

- (1) les moules triploïdes ont un investissement reproductif plus faible que les diploïdes avec un moindre développement des gonades et un retard de maturation des gamètes;
- (2) la triploïdie des moules entraîne une altération du sexe-ratio.

Ces hypothèses ont été testées par l'utilisation de multiples analyses. La procédure de Shapiro-Wilk a été appliquée pour valider l'homoscédasticité et l'ANOVA à deux voies a été utilisée pour comparer l'indice gonadosomatique et l'indice de condition des moules diploïdes et triploïdes, avec le niveau de ploïdie et le temps comme facteurs. Le test-*t* de Student a été

utilisé pour la fraction volumique des gonades des moules de < 30 mm, tandis qu'une ANOVA à deux voies a été effectuée pour le volume de la fraction gonadique des moules de taille commerciale avec le niveau de ploïdie et le temps comme facteurs.

5.6 Chapitre IV : Force de fixation et composition des fibres de byssus des moules triploïdes de taille commerciale

La composition des fibres de byssus est connue pour jouer un rôle important dans leurs propriétés mécaniques et donc dans leur force d'attachement. En effet, la composition en acides aminés, en particulier en résidus histidine, est impliquée dans les liaisons non covalentes avec des métaux tels que le fer, le cuivre, et le zinc dans les fibres de byssus (Waite et Harrington 2022). Ces coordinations métalliques sont importantes pour les propriétés mécaniques des fibres de byssus, notamment pour leur capacité d'auto-guérison. Dans les expériences présentées au chapitre II, j'ai observé des propriétés mécaniques altérées, suggérant que les fibres de byssus des moules triploïdes pourraient avoir une composition modifiée, que ce soit en termes de teneur ou de structure en acides aminés, ou encore en termes de présence des ions métalliques. De plus, certaines études ont mis en évidence des différences dans la production et les propriétés des fibres de byssus entre les petites (naissains) et les grandes moules (Babarro et Carrington 2013). Par conséquent, il était intéressant de valider si les moules triploïdes de taille commerciale possédaient une production de byssus similaire avec les mêmes propriétés mécaniques, que celles mesurées au cours des expériences présentées au chapitre II.

Mes objectifs étaient de comparer la composition et la structure en acides aminés des fibres de byssus diploïdes et triploïdes, ainsi que leur composition en métaux. Par ailleurs, j'ai voulu comparer les résultats de production de byssus, d'activités physiologiques et métaboliques obtenus au cours d'expériences réalisées sur des naissains de moules (voir chapitre II), avec les mêmes mesures effectuées sur des moules de taille commerciale. J'ai émis les hypothèses suivantes :

- (1) les fibres de byssus des moules triploïdes ont une composition ou une structure altérée en acides aminés et en métaux, expliquant ainsi les variations de leurs propriétés mécaniques;
- (2) les moules de taille commerciale ont une production de byssus et des patrons d'activités physiologiques et métaboliques similaires aux naissains (< 30mm). Cependant, les différences entre les deux groupes devraient être plus marquées à cause de l'investissement reproductif réduit chez les triploïdes.

Ces hypothèses ont été testées par de multiples analyses. La comparaison de la composition des fibres de byssus en termes d'acides aminés et de métaux a été réalisée par le test-*t* de Student et PERMANOVA. La production de fibres de byssus ainsi que la comparaison de leurs propriétés mécaniques ont été analysées par des tests-*t* de Student et validées par le test de Shapiro-Wilk. Enfin, les activités métaboliques ont également été validées à l'aide du test-*t* de Student et du test de Shapiro-Wilk.

CHAPITRE 1

EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTES STRATÉGIES POUR INDUIRE LA TRIPLOÏDIE CHEZ *MYTILUS EDULIS* EN RELATION AVEC LA PERFORMANCE DES PREMIERS STADES DE DÉVELOPPEMENT

1.1 RESUME

Récemment, il y a eu un grand intérêt pour le développement d'écloseries de moules, *Mytilus edulis*, dû en partie à la possibilité de produire des moules triploïdes. L'objectif de cette étude était d'examiner l'efficacité d'induction de la triploïdie chez les moules par différents traitements et de déterminer les effets de la triploïdie sur le développement larvaire. Afin de produire des triploïdes, l'extrusion du second globule polaire d'œufs fécondés a été inhibée par des traitements à la 6-(diméthylamino)purine (6-DMAP) ou par des chocs thermiques, froid ou chaud. La triploïdie a été mesurée par cytométrie de flux pour tous les traitements. Le traitement au 6-DMAP était le plus efficace avec des taux de triploïdie de 90%, suivi par les traitements à chaud (56%) et ceux au froid (30%). Aucune différence de survie n'a été observée entre les diploïdes et les triploïdes induits avec du 6-DMAP du stade de larves D et jusqu'à leur fixation. De plus, une croissance augmentée a été observée chez les larves triploïdes comparées aux larves diploïdes. Globalement, cette étude a montré que le 6-DMAP est une méthode hautement efficace pour induire la triploïdie chez les moules et pour produire des larves triploïdes à forte croissance.

Cet article, intitulé « *Efficiency of various strategies to induce triploidy in Mytilus edulis in relation to their first-stage performance* », a été publié dans sa version finale en 2021 dans la revue *Journal of Applied Aquaculture*. En tant que premier auteur, j'ai contribué à l'essentiel de la recherche sur l'état de la question, au développement de la méthode et à l'exécution des tests de performance. Le Professeur Réjean Tremblay ainsi que les Docteurs

Luc Comeau, Tiago Hori, ainsi que le maître John Davidson ont fourni l'idée originale, ils ont aidé à la recherche sur l'état de la question, ainsi qu'au développement de la méthode et à la révision de l'article. Le Docteur Claude Belzile a également aidé au développement de la méthode et à la révision de l'article. Une version abrégée de cet article a été présentée à la conférence annuelle de *Ressources Aquatiques Québec* en 2019 à Rimouski.

**EFFICIENCY OF VARIOUS STRATEGIES TO INDUCE
TRIPLOIDY IN *MYTILUS EDULIS* IN RELATION TO THEIR FIRST-
STAGE PERFORMANCE**

Kevin Osterheld ^{a*}, John Davidson ^b, Luc A. Comeau ^c, Tiago Hori ^d, Claude Belzile ^a and
Réjean Tremblay ^a

^a Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines,
Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada. Kevin.Osterheld01@uqar.ca;
Rejean_Tremblay@uqar.ca; Claude_belzile@uqar.ca

^b Fisheries and Oceans Canada, Gulf Region Sector Office, 165 John Yeo Drive,
Charlottetown, PEI, C1E 3J3, Canada. John.Davidson2@dfo-mpo.gc.ca

^c Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, P.O. Box 5030, Science Branch,
Moncton, NB, E1C 9B6, Canada. Luc.Comeau@dfo-mpo.gc.ca

^d Atlantic Aqua Farms, 918 Brush Wharf Rd, Vernon Bridge, PEI C0A 2E0, Canada.,
Tiago@canadiancove.pe.ca

1.2 ABSTRACT

Recently, there is a greater interest for the development of mussel *Mytilus edulis* hatcheries, particularly for the production and commercialization of triploid bivalves. The aims of this study were to examine the efficiency of inducing triploid mussels by various treatments and to determine the effect of triploidy on larval development. To produce triploids, extrusion of the second polar body of fertilized eggs was inhibited by 6-(dimethylamino)purine (6-DMAP), cold-shock, or heat-shock treatments. Triploidy was detected by flow cytometry for all the treatments. Treatment with 6-DMAP was the most efficient with a rate of triploidy of 90%, followed by heat-shock (56%) and cold-shock (30%) treatments. No survival differences were observed between diploids and 6-DMAP-induced triploid larvae from the D-shape stage up to their settlement. Moreover, increased growth was observed in triploid larvae compared to diploid larvae. Overall, this study showed that 6-DMAP is a highly efficient method to induce triploidy in mussels, with triploid larvae having faster growth compared to diploid.

Keywords: Triploidy, larvae, survival, growth, mussel farming, *Mytilus edulis*

1.3 INTRODUCTION

In Canada, blue mussel (*Mytilus edulis*) aquaculture represents approximately 37% of shellfish aquaculture revenues, and they contribute to more than 43.7 million CAD dollars to the economy (Statistics Canada 2019). Currently, the industry relies exclusively on the collection of wild spats (Mallet and Myrand 1995, Comeau et al. 2008a). However, this situation could change rapidly in light of recent interest in producing triploid mussels, which requires hatcheries. The underlying rationale is that mussels naturally invest massive amounts of their energy into gametogenesis. At times, the process of gametogenesis represents 50–90% of the energy allocation in mussels (Rodhouse et al. 1984a, Seed and Suchanek 1992, Lachance et al. 2008, Babarro and Reiriz 2010). Such an investment ultimately results in spawning, which leads to a net energy loss for mussels and productivity for the industry.

The presence of more than two sets of chromosomes, called polyploidization, is a naturally occurring phenomenon during the evolution of eukaryotes (Otto and Whitton 2000). Triploidization occurs in nature and can also be induced in the laboratory. Triploidy is commonly associated with low fertility and often sterility (Allen Jr et al. 1982, Allen Jr and Downing 1986a, Komaru 1989, Allen Jr and Downing 1990, Komaru et al. 1995, Kiyomoto et al. 1996, Husband 2004). In bivalves, sterility is often associated with an incomplete synapsis of homologous chromosomes (Komaru 1989, Kiyomoto et al. 1996). However, other factors may also play a role in triploid-associated sterility (Kiyomoto et al. 1996). It has been observed that triploid oysters can allocate significant energy into reproduction at the beginning of gametogenesis, but this energy investment represents only 47% of the investment by diploid oysters (Normand et al. 2008). Thus, triploid bivalves contribute less energy to reproduction and their rates of fertility are lower. These energy savings may be allocated to other metabolic needs, thereby resulting in increased growth (Allen Jr and Downing 1986b, 1990, Ruiz-Verdugo et al. 2001, Brake et al. 2002, Brake et al. 2004).

Induction of triploidy in bivalves is achieved by inhibiting extrusion of either the first or the second polar body during meiosis I or II to obtain three chromatids, two from the mother and one from the father (Gosling 2015; Yamamoto and Sugawara 1988, Beaumont and Kelly 1989, El-Wazzan and Scarpa 2009, Yang and Guo 2018, Wu et al. 2019, De La Rosa et al. 2020). However, production of living triploids is easier to achieve *via* inhibition of the second polar body and is often favored (Gérard et al. 1999; Allen Jr and Bushek 1992, Scarpa et al. 1993, Scarpa et al. 1994, Barreto-Hernández et al. 2018, Wu et al. 2019, De La Rosa et al. 2020). To block the extrusion of polar bodies, physical or chemical treatments can be applied to fertilized eggs (Beaumont 1991, Nell 2002, Barreto-Hernández et al. 2018, Ma et al. 2018). Physical treatments include exposure to pressure changes (Beaumont and Fairbrother 1991, Desrosiers et al. 1993, Mallia et al. 2006, De La Rosa et al. 2020) or exposure to low (1 °C) or high (20–32 °C) temperatures (Yamamoto and Sugawara 1988, Beaumont and Kelly 1989, Nell 2002). Meanwhile, chemical treatments are often performed with cytochalasin B (CB) or 6-(dimethylamino)purine (6-DMAP) (Beaumont and Kelly 1989, Desrosiers et al. 1993, Scarpa et al. 1994, Nell 2002, Wu et al. 2019). Due to the cytotoxicity of CB dissolved in DMSO, 6-DMAP is preferred (Desrosiers et al 1993, Nell 2002). 6-DMAP is a protein kinase and cyclin-dependent kinase inhibitor which has exhibited varying success for inducing triploidization (Desrosiers et al. 1993, Nell et al. 1996). The main advantages of 6-DMAP are its solubility in water and its low toxicity (Desrosiers et al. 1993).

In this study, the objective was to optimize successful triploidization of *M. edulis* by investigating the efficiency of cold-shock, heat-shock, and 6-DMAP treatments. Furthermore, we aimed to develop and facilitate the application of triploidy induction treatment in aquaculture operations. Thus, we optimized a method using microscope observation to validate the fertilization level of the eggs needed to determine when > 50% of eggs have extruded their first polar body. In *M. edulis*, timing of a treatment can selectively inhibit the first or second polar body. For example, application of a treatment for 10 min either 5-10 min after fertilization, or 20-25 min after fertilization, can inhibit the first versus second polar body (Yamamoto and Sugawara 1988, Scarpa et al. 1993). Since inhibition of

the first polar body is associated with high larval mortality in *M. edulis* (Brake et al. 2002), treatment timing was designed to selectively inhibit extrusion of the second polar body. The performance of larvae and post-larvae were subsequently evaluated following each treatment.

1.4 MATERIAL AND METHODS

1.4.1 Experimental design

Two-year-old cultured *M. edulis* (shell length, 50–60 mm) from wild collection on artificial suspended collectors were randomly sampled in late May 2018 from a mussel lease in St. Peter's Bay, Prince Edward Island, Canada (46° 26' 30.7" N, 62° 44' 51.3" W). Within 24 h of collection, the mussels were transferred on ice to a wet laboratory at the Université du Québec à Rimouski (UQAR, Quebec, Canada). The mussels were maintained in seawater at < 12 °C to avoid spontaneous spawning and were fed continuously with a mixed suspension of microalgae containing: *Tisochrysis lutea* (CCMP 1324), *Chaetoceros neogracilis* (CCMP 1317), *Pavlova lutheri* (CCMP 459), and *Nannochloropsis oculata* (CCMP 525) at a ratio of 1:1:1:1 equivalent biomass according to culture algal dry weight. Microalgae cell counts were determined with a Multisizer 4e Beckman Coulter counter and a 50-µm pore orifice. To maintain gamete production, the mussels were given a daily ratio of 5% dry weight algae/dry weight mussel. Algal strains were obtained from the Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (Maine, USA).

Sperm and eggs were collected separately, and spawning was induced by thermal shock (Rayssac et al. 2010). Briefly, mussels were put in individual flasks of 500 ml, each flask containing one mussel, to allow sperm and eggs to be collected separately, thus preventing unwanted fertilization. Each treatment was performed in technical triplicate with gametes originating from the same genitors, as well as in treatment triplicate with gametes from different genitors. The control group was also performed in technical and treatment triplicates. For each treatment and each replicate, the eggs from 1 female and sperm from 1

male were used. The gametes from males and females were counted (gametes ml⁻¹) and eggs were fertilized at a ratio of 10 spermatozooids oocyte⁻¹. Untreated fertilized eggs from the same parents were used as controls.

Ploidy levels were validated in 5-days-old mussel larvae by using flow cytometry (CytoFLEX Cytometer, Beckman Coulter, IN, USA) as described below. If triploidy levels exceeded 5%, the larval and post-larval cultures were closely monitored for growth, survival, and triploid level until their settlement. If triploid levels were < 5%, the larval batches were discarded. Larval mussels were reared in a batch system (Rayssac et al. 2010). Briefly, after embryogenesis, fully shelled "D" veligers (D-larvae) were reared at 18 °C in 2.5 L glass culture Fernbach at a ratio of 5 larvae ml⁻¹. D-larvae were fed every two days with 30 µl ml⁻¹ *Tisochrysis lutea*, *Chaetoceros neogracilis*, *Pavlova lutheri*, and *Nannochloropsis oculata* at 1:1:1:1 equivalent biomass estimated by culture algal dry weight. Water was changed every two days with filtered (1 µm), ultraviolet (UV)-treated seawater provided. When > 50% of the larvae reached the pediveliger stage, they were transferred to flow-through downwellers supplied with water at 18–20 °C and 27 PSU (Rayssac et al. 2010). The larvae were fed continuously and *Skeletonema costatum* was included in their diet at 1:1:1:1:1 equivalent biomass estimated by culture algal dry weight.

1.4.2 Triploidy induction

Prior to fertilization and treatments, the eggs were kept for 1h at room temperature for a better eggs' synchronicity. Fertilized eggs were subjected to thermal shock (cold and hot) and chemical exposure (6-DMAP) at different temperatures to block extrusion of the second polar body and induce triploidy (Table 1).

Table 1. Conditions of experiments performed to inhibit the extrusion of the second polar body in *Mytilus edulis* and induce triploidy. Treatments were heat-shock, cold-shock, and 6-dimethylamino)purine (6-DMAP)

Treatment	Heat-shock		Cold-shock	6-DMAP (400 μ M)	
Time started after fertilization	17 min	21 min	21 min	17 min	21 min
Duration	10 min	10 min	10 min	10 min	
Temperature	27°C	27°C	1°C	18 °C	25°C
	–	30°C	2°C	–	20–22°C
	–	–	5°C	–	18°C

Usually, treatments are applied when > 50% of the fertilized eggs have already extruded their first polar body. However, in industrial aquaculture conditions, the microscopical verification of the extrusion of the eggs' polar bodies prior the treatment might be ambitious. To bypass such visual observation and based on previous work of Brake et al. (2002, 2004) the optimal time necessary to obtain most efficient triploid level was determined. Briefly, heat-shock treatments were performed at 21 min post-fertilization for 10 min at 27 °C or at 30 °C. Due to handling time for treatment application (i.e. cleaning of sperm excess to avoid polyspermy, resuspension of the eggs in clear UV-treated water, splitting of the fertilized eggs in technical replicates, and application of the treatments), it was suggested that the optimal moment for treatment could be missed by treating the eggs at 21 min post-fertilization. Therefore, it was decided to take a large estimate of the handling time and to remove it from the 21 min post-fertilization and instead to treat at 17 min post-fertilization. Thus, treatment at 27 °C was also performed at 17 min post-fertilization for 10 min. Cold-shocks were performed at 21 min post-fertilization for 10 min at 1 °C, at 2 °C, or at 5 °C. In this study, treating the eggs at 21 min post-fertilization was chosen as the starting point for determination of the optimal time to induce triploidy based on the study of Brake et al. (2004). Solutions of 6-DMAP (400 μ M) were prepared by dissolving 6-DMAP in filtered (1 μ m), ultraviolet (UV)-treated seawater to exposed fertilized eggs. Many studies have tested concentrations of 6-DMAP from 300–600 μ M (Brake et al. 2004, Desrosiers et al.

1993). In the present study, 400 μM of 6-DMAP was chosen because it seemed to be a good compromise between efficiency and survival. Treatments with 6-DMAP were first performed at 21 min post-fertilization for 10 min at 18 °C, at room temperature (RT) (20–22 °C), and 25 °C. As the 18 °C treatment (21 min post-fertilization) showed the highest efficiency, we added a treatment with 17 min post-fertilization for 10 min at 18 °C. Thus, treatment duration of 10 minutes was similar for all conditions and based on literature to optimize treatment efficiency in relation to the larval survival (Brake et al. 2002, Brake et al. 2004, Desrosiers et al. 1993, Gérard et al. 1999, Yamamoto and Sugawara 1988). Prior to the application of each treatment, fertilized eggs were filtered on 20 μm mesh and washed with filtered (1 μm), ultraviolet (UV)-treated seawater to remove the excess of sperm and avoid polyspermy. Then, the eggs were exposed to solution corresponding to the tested treatment. Each treatment was performed in technical triplicates with 3 groups originating from same parents for each treatment but also in treatment triplicates with eggs and sperm from different parents. Following the 10 min treatments, fertilized eggs were washed with filtered (1 μm), UV-treated seawater (18 °C) and then transferred to a 25-L flat bottom tank (250 egg ml^{-1}) filled with filtered (1 μm), UV-treated seawater (18 °C). The eggs were maintained under these post-fertilization conditions until they underwent metamorphosis into D-shaped larvae.

1.4.3 Ploidy measurements in larvae

Triploid validation was conducted on 5-days-old fresh larvae. Approximately 200 larvae for each treatment were gently homogenized in a 7-mL loose pestle Dounce tissue grinder (Wheaton, NJ, USA) in 1 mL ice-cold Galbraith's buffer (Galbraith et al. 1983). The homogenate was filtered through a 35- μm mesh into a tube containing 50 μL of 1 mg mL^{-1} propidium iodide (PI) solution (Sigma, MO, USA) and 1 μm fluorescing beads (Fluoresbrite, Polysciences) as an internal standard. Nuclei were stained for at least 15 min before being subjected to analysis by a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, IN, USA) for 120 s at a flow rate of 10 μL per min. A peristaltic pump controlled sample flow rate and its calibration was checked daily.

Doublets were identified on plots of PI fluorescence (610 nm / 20 nm band-pass) area versus PI fluorescence width, and these were excluded from analysis (da Silva et al. 2005). The position of the diploid nuclei peak in the PI fluorescence histogram was identified by using nuclei obtained from a commercial stock of mussels known to be diploid (Annexe I). The coefficient of variation for diploid and triploid nuclei peaks was always < 10%.

1.4.4 Larval survival and growth

After larval metamorphosis from trochophore to D-shaped larvae, survival was assessed every two days until settlement occurred. To measure survival, larval density was assessed by mixing the rearing beaker with a plunger and collecting triplicates of 1-mL water sample. Larvae present in the water sample were euthanized with an addition of 20 μ L formaldehyde and then counted with the aid of a microscope. In each 1-mL subsample triplicates survival rates were expressed as the total number of individuals less than the cumulative amount of empty shells and based on the first sampling timepoint. Larvae size was determined in each subsample on 50 larvae measured with the image analysis Image-Pro v5.1 (Image Pro-Plus version 5.0 software, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) and an Olympus BX41 microscope on 100X magnification. Larval growth was monitored until settlement occurred (before 28 days post-fertilization (dpf)).

1.4.5 Statistical analysis

To compare triploid levels between treatments, permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), designated ANOVA (Anderson et al. 2008), was applied by using PRIMER[®] version 7.0.13 with PERMANOVA+1 add-on (Clarke and Gorley 2015). The PERMANOVA approach was selected to provide analysis of variance in the presence of an unbalanced design and non normal distribution (Anderson and Walsh 2013). The performance of diploid versus triploid mussels was analyzed by using two-way PERMANOVAs (treatment \times date) and was performed on survival and growth. In the case of significant interactions, *post-hoc* tests (i.e., a pairwise multiple comparisons routine) were

conducted to identify differences among levels within factors. P-values were calculated with 9999 permutations, partial sums of squares (Type III), and Monte-Carlo random draw probability (hereafter “ $p_{(MC)}$ ”) under a reduced model to avoid issues of too few available permutations with small sample sizes (Anderson and Robinson 2003). Similarity of variance of response was tested by using a multidimensional dispersion routine (PERMDISP), in PRIMER, based on the deviation from centroids (Anderson et al. 2008).

1.5 RESULTS

1.5.1 Triploidy induction

Ploidy levels of larvae subjected to various treatments to induce triploidy were measured by flow cytometry at 5 dpf on sample of > 200 larvae (Figure 16). Treatments with 6-DMAP at 21 min post-fertilization at 20-22 °C, and at 17 min post-fertilization at 18 °C produced significantly higher percentages of triploid larvae than the other treatment groups (80% and 90% respectively). Meanwhile, treatment with 6-DMAP at 21 min at 18 °C post-fertilization induced triploidy in 55% of larvae, while heat-shock at 27 °C or 30 °C at 21 min post-fertilization resulted in 56% and 48% of larvae becoming triploids, respectively. All of these treatments achieved significantly higher triploidy levels than cold-shock or 6-DMAP treatments at 21 min at 25 °C post-fertilization (See Figure 16 for statistical results). For example, cold-shock treatments at 1 °C, 2 °C, and 5 °C produced triploidy in 30%, 18%, and 8% of larvae, respectively. Treatment with 6-DMAP at 21 min post-fertilization at 25 °C induced triploidy in 8% of larvae. The lowest levels of induced triploidy were observed following heat-shock at 17 min post-fertilization at 27 °C (7%). Meanwhile, the proportion of triploidy in control diploid larvae (untreated larvae) was < 4%, which was indistinct from cellular debris in flow cytometry analyses and thus was not attributed to triploid larvae.

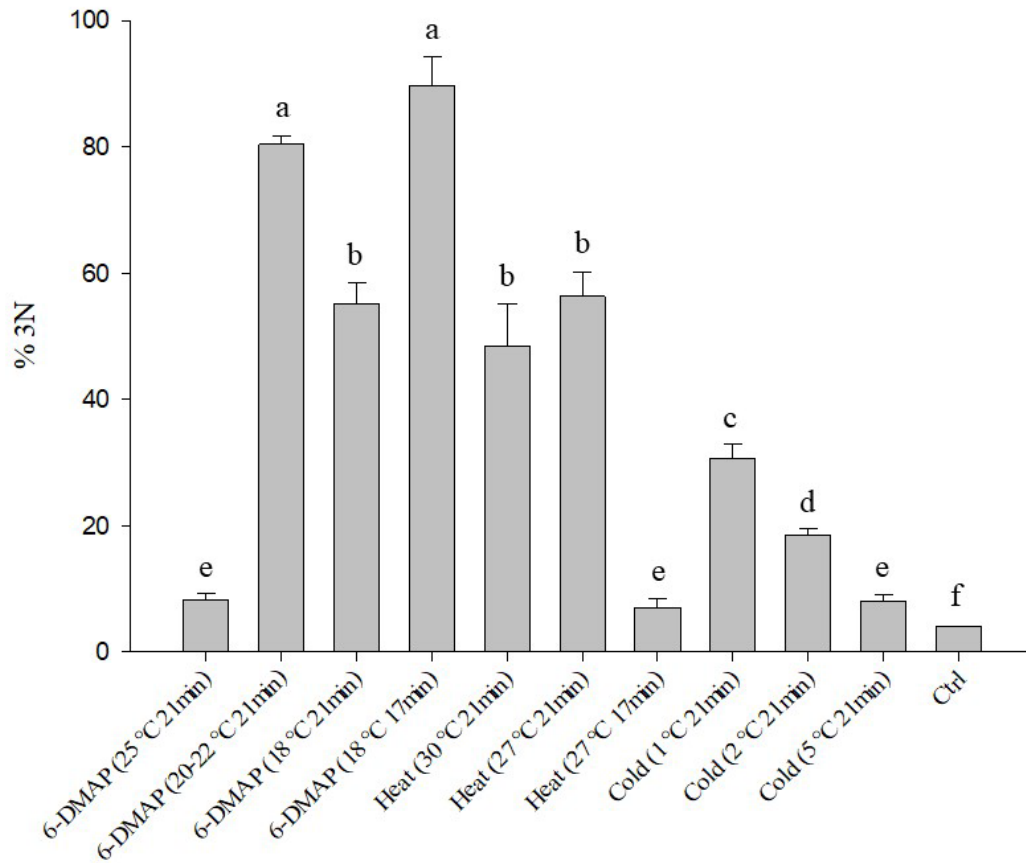


Figure 16. Successful induction of triploidy following various treatments of 5-day-old *M. edulis* larvae (mean proportion of triploid nuclei \pm standard error of means). All of the treatments were applied at 21 min post-fertilization for 10 min, except for 6-(dimethylamino)purine (6-DMAP) at 18° C (17 min) and heat shock at 27° C (17 min). PERMANOVA indicates significant differences between treatments (df 10 and 36, pseudo-F = 95.19, $p < .0001$). Different letters indicate significant difference ($p < .05$)

1.5.2 Larval survival

Following triploid induction treatments, larvae were maintained in triplicate tanks to estimate their survival, except for the heat-treated larvae. The latter exhibited 100% mortality within two weeks. After 5 dpf, larvae survival was remarkably high and similar between the control group and all treatments except the 2 and 5 °C, all with a mean survival over 87%. However, larvae which underwent cold-shock treatments at 2 °C and 5 °C had survival rates

of 60% and 55%, respectively (Figure 17). At 15 dpf, both the larvae treated with 6-DMAP at 20-22 °C and larvae treated with cold-shock treatment at 1 °C exhibited similar survival as the control group (64%, 61%, and 67%, respectively). Larvae treated with 6-DMAP at 18 °C at 17 min post-fertilization exhibited the highest survival of all the treatment groups at 15 dpf (77%). Meanwhile, treatment with 6-DMAP at 25 °C and the cold-shock treatments at 2 °C and 5 °C exhibited lower survival at the same time point (51%, 24 and 33%, respectively).

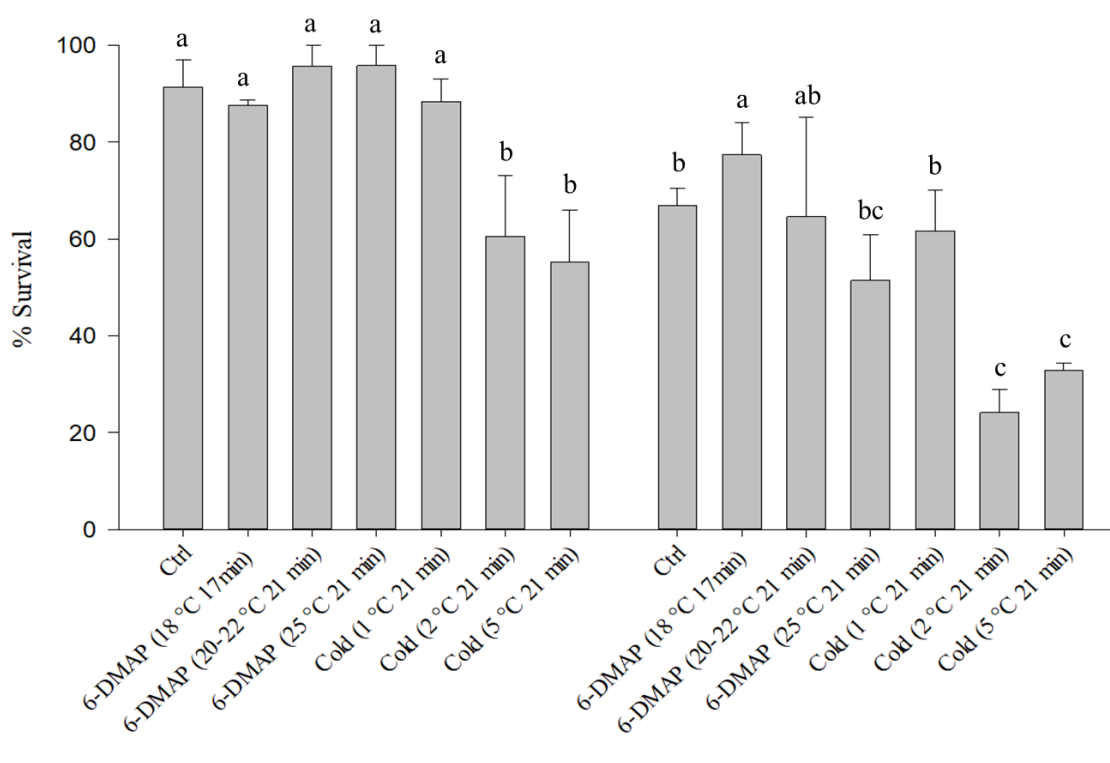


Figure 17. Survival rates (mean % living larvae \pm standard error of means) of larvae at 5- and 15-days post-fertilization (dpf) following 6-(dimethylamino)purine (6-DMAP) or cold-shock treatments to induce triploidy as presented in Figure 16. PERMANOVA performed at 5- and 15-days postfertilization indicate significant differences between treatment (respectively, df 6 and 16, pseudo-F = 2.8364, $p = .0481$; and df 6 and 16, pseudo-F = 5.4056, $p = .0017$). Different letters indicate significant difference ($p < .05$)

1.5.3 Larval Growth

Triploidy (90%) was induced with 6-DMAP treatment at 18 °C at 17 min post-fertilization. The growth of both diploid and triploid larvae was subsequently measured every

2–3 days until settlement was achieved. Both groups of larvae originated from gametes collected from the same parents. A significant increase in triploid larvae size (8.5%) was observed compared to diploid larvae growth starting 13 dpf ($p = 0.0015$; Figure 18) and continued to increase until settlement at 22 dpf

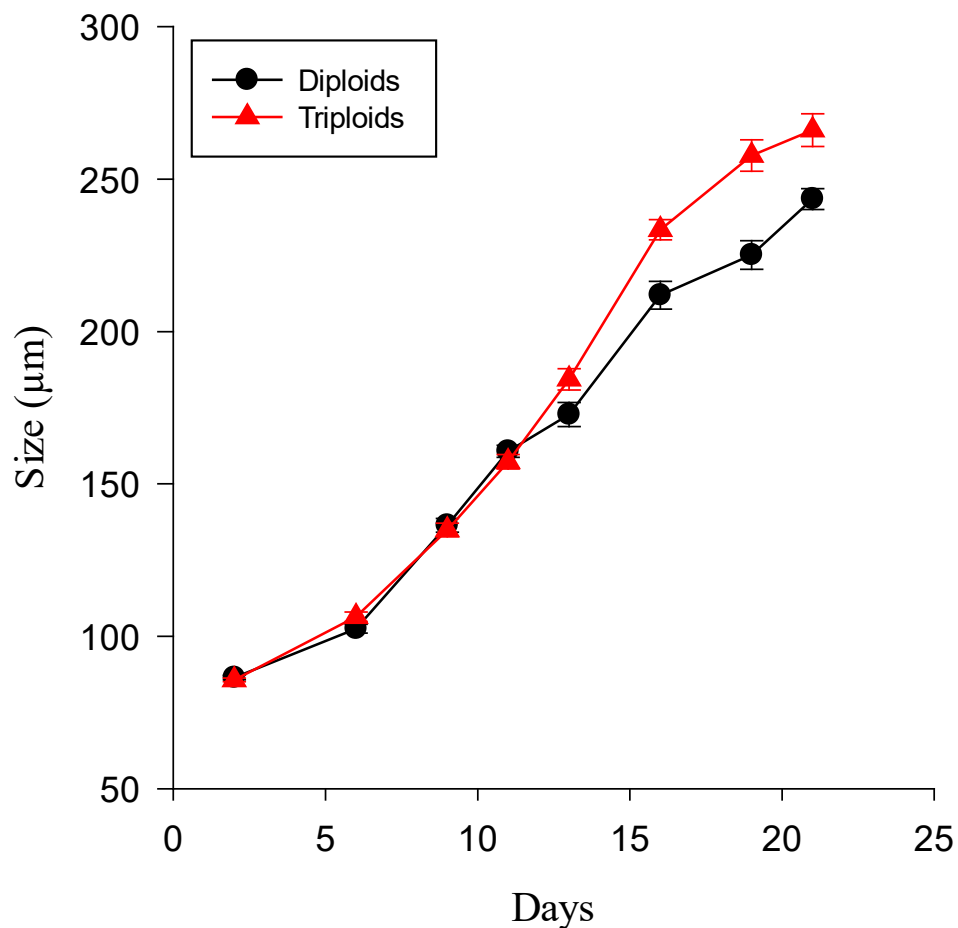


Figure 18. Larval growth of diploid and triploid mussels until settlement. Black dots indicate diploids, while red triangles indicate triploids. Triploidy was induced at 18°C with 6-(dimethylamino) purine at 17 min post-fertilization. PERMANOVA at the last day of measurement indicates a significant difference between triploid and diploid larvae (df 1 and 58, pseudo-F = 11.669, $p = 0.0015$)

1.6 DISCUSSION

The main objective was to test a variety of triploid induction techniques for *M. edulis* aquaculture production, evaluating the success of the treatment in addition to larval survival and growth. The induction of triploidy was performed to be easily reproducible for mussel farmers. The treatments tested in this study resulted in triploidization that ranged from 7–90%. Treatments with 6-DMAP achieved higher levels of triploidization, followed by heat-shock and cold-shock treatments (Figure 16). The efficiency of 6-DMAP treatment was also found to be affected by temperature. For example, treatments at 18 °C and 20–22 °C at 21 min post-fertilization produced triploidization induction of 56% and 80%, respectively. In contrast, the triploidization induction at 25 °C was only 8%. Such contrasting outcomes may be the result of elevated temperatures dampening 6-DMAP efficiency, which was previously suggested for oysters (Desrosiers et al. 1993). However, other studies performed on *Crassostrea gigas*, used 6-DMAP at 25 °C and observed a high percentage of triploidy induction (Gérard et al. 1999), suggesting that the reduced efficiency observed in this study could be due to other factors such as combined effects of 6-DMAP and treatment conditions exceeding the optimal temperature for *Mytilus edulis* development. Treatment with 6-DMAP at 17 min post-fertilization and 18 °C resulted in the highest level of triploid induction (90%). In comparison, treatment at the same temperature and duration yet at 21 min post-fertilization lowered the triploidization to 56%. Mussels from these two 6-DMAP treatments were maintained for further work in nursery condition and triploid levels measured after metamorphosis (35 dpf) and 8 months later showed no triploid reduction in their population. We suggest that 6-DMAP treatments could be used in commercial hatcheries, as this product is soluble in sea water, has low toxicity and requires mainly to have a good timing with eggs filtration prior and after the treatment.

Prior to treatment, monitoring of eggs' state under the microscope should normally be performed to determine the optimal moment to apply the treatment. However, such microscopic monitoring is largely time consuming and difficult to be applied in industrial aquaculture activities. This study demonstrates that taking into account the handling time

(i.e., cleaning of sperm access to avoid polyspermy, resuspension of the eggs in clear UV-treated water, splitting of the fertilized eggs in technical replicates, and application of the treatments) by treating the eggs at 17 min instead of 21 min post-fertilization largely increases the efficiency of the treatments. By treating earlier, we reduced the risk that too many eggs extruded their second polar body before the application of the treatment. By earlier treatment of the fertilized eggs, 6-DMAP interacted with a greater number of eggs which had not yet started to extrude their second polar body. Thus, greater retention of the polar body and higher induction of triploidy was observed. In addition, at 21 min post-fertilization, more eggs may have already started their second meiosis, and consequently would have already extruded their chromatid to produce diploids. It has been demonstrated that treatments need to be applied after the extrusion of the first polar body and before the extrusion of the second polar body to keep the chromatid inside the cell (Downing and Allen Jr 1987, Beaumont and Kelly 1989, Gosling and Nolan 1989). Therefore, treatment at 17 min post-fertilization appears to involve a greater number of cells which have already extruded their first polar body and still have their second polar body.

Heat-shock treatments (at 30 °C and 27 °C) at 21 min post-fertilization elicited similar triploidization efficiencies (average, ~50%). However, this was accompanied by 100% mortality, particularly 1-week after the 30 °C heat-shock treatment. These mortalities may be explained by the fact that temperatures of 27 °C and 30 °C exceed the thermal maximum of mussels from Prince Edward Island. It has been observed that over 25 °C, survival of mussels' larvae is significantly reduced (Brenko, and Calabrese 1969). In contrast, the cold-shock treatments had the lowest efficiency of triploid induction. However, small thermal variations led to significant shifts in triploidization. For example, treatment at 1 °C versus 2 °C resulted in triploidization of 30% and 18%, respectively; yet at 5 °C, the triploidization was 8%.

Monitoring larval survival revealed no differences between control larvae and larvae treated with 6-DMAP or cold-shock (1 °C). The survival ranged from 51–77%. In comparison, cold-shock treatments at 2 °C and 5 °C led to average survival < 33% (Figure

17). Taken together, these results suggest that short-term, abrupt temperature changes (from 18 °C to 2 °C or from 5 °C to 18 °C) can result in cell damage, or even cell death (i.e., apoptosis). However, this hypothesis should be considered with caution since treatment at 1 °C did not produce a difference in survival compared with the control group. Thus, it is possible that egg quality plays a key role in larvae survival as suggested by the studies of Utting and Doyou 1992 in *Tapes philippinarum* or by Taylor et al. 2011 in *Salmo salar*.

Survival differences observed between the larvae treated with 6-DMAP versus cold-shock could also be related to the mechanisms mediating inhibition of polar body extrusion. As an inhibitor of kinase protein phosphorylation, 6-DMAP enhances chromatin decondensation and affects the formation of microtubules and the metaphase spindle, as observed in mice oocytes (Neant and Guerrier 1988, Dufresne et al. 1991). Meanwhile, cold-shock experiments performed with tilapia (*Oreochromis niloticus*) have suggested that this treatment slows meiotic division (Hussain et al. 1991). In olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), cold-shock treatment induces disassembly of the metaphase spindle, as well as the daughter centrioles (Zhu et al. 2006). Interestingly, however, microtubules are regenerated once the cold-shock is removed. In the present study, no differences in survival were observed for D-shaped larvae in the control and 6-DMAP-treated groups.

Equivocal results have been reported regarding possible growth advantages of triploid bivalves at pre-gametogenesis developmental stages. Some reports indicate that triploid larvae and juveniles exhibit more rapid growth (Yamamoto and Sugawara 1988, Beaumont and Kelly 1989, Nell 2002, Gosling 2015), while other studies did not observe growth differences between diploid and triploid larvae or juveniles. Based on the latter, it has been postulated that growth advantages become evident only after bivalves start their sexual maturation. Correspondingly, greater growth of triploids could be attributed to a reallocation of energy from gametogenesis (Desrosiers et al. 1993, Jiang et al. 1993, Nell 2002, Brake et al. 2004). Growth rates have also been reported to vary between families of triploid juvenile salmon (*Salmo salar*) (Xu et al. 2013). Thus, the impact of triploidization may be family/genotype-specific. In the present study, triploid larvae produced following 6-DMAP

treatment were larger in size than diploid larvae approximately two weeks after fertilization (Figure 18).

Different hypotheses have been proposed to explain the increased growth rates exhibited by triploid larvae. For example, with triploids having 1.5 times more genetic material than diploids, they may have altered expression of specific genes involved in growth or food assimilation efficiencies (Zeng et al. 2019). It is also possible that triploids metabolize energetic reserves, which are mostly in the form of lipids at the larval stages, more efficiently than diploids to achieve better growth. For instance, Utting and Doyou (1992) reported that triploid D-shaped larvae of Manila clams (*Tapes philippinarum*) utilize relatively large amounts of their lipid reserves. Finally, it is possible that the large size of triploid mussels is mostly due to the augmented volume of triploid cells, and not to assimilation or metabolic processes related to growth (Gosling 2015).

1.7 CONCLUSION

In the present study, treatment of mussel eggs with 6-DMAP (400 μ M) induced the highest proportions of triploid larvae (up to 90%). Temperature and timing of treatment also influenced triploidization efficiencies, with the best 6-DMAP outcomes involving eggs treated during 10 min at 18 °C at 17 min post-fertilization. Survival of D-shaped larvae at 15 dpf was similar in both control (diploid) and 6-DMAP (triploid) groups, with the average survival rate ranging from 51–77%. Furthermore, prior to settlement, triploid larvae grew faster than diploid larvae. Based on these results, further study is warranted to determine the extent of the energetic investment of triploid mussels compared to diploid mussels. Specifically, measurement of reproductive efforts, triploid growth at later stages, and investments in protective tissues such as shell and byssal threads should be investigated.

1.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express gratitude and thanks to Nathalie Gauthier and Élodie Bouchard for invaluable assistance during the experiments and lab work. This study was

funded by Atlantic Aqua Farms in partnership with the Department of Fisheries and Oceans of Canada (Aquaculture Collaborative Research and Development Program, project 17-G-03) and by Ressources Aquatiques Québec Research Network (Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies, #2014-RS-171172).

CHAPITRE 2

LA TRIPLOÏDIE CHEZ *MYTILUS EDULIS* IMPACTE LES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES FIBRES DE BYSSUS

2.1 RESUME

Un problème majeur dans l'aquaculture de moules est la chute des moules des boudins d'élevage due à l'affaiblissement des fibres de byssus. Cet affaiblissement est particulièrement marqué pendant les événements de ponte. Durant la dernière décennie, des efforts importants ont été investis pour la production de bivalves triploïdes, qui ont un investissement réduit en reproduction. Dans cette étude, nous avons comparé les propriétés byssales et les taux énergétiques des moules diploïdes et triploïdes de moules de 1 an (< 30 mm). Pour déterminer les effets de la triploïdie sur les fibres de byssus, des moules diploïdes et triploïdes ont été placées dans un canal hydrodynamique en recirculation pour induire la production de fibres de byssus. Nos résultats ont montré que les moules triploïdes produisent jusqu'à 65% plus de fibres que les diploïdes. De plus, les mesures de tensiométrie ont montré que les fibres des moules triploïdes avaient des valeurs de module de Young supérieures (augmentation de 45%) avec la présence de seuils multiples. Les taux énergétiques et les investissements métaboliques ont été mesurés *via* l'assimilation de nourriture et la consommation d'oxygène. Les résultats ont montré que les moules triploïdes avaient des taux de filtration supérieurs (augmentation de 40%) et ainsi que de plus forts potentiels de croissance (augmentation de 260%) comparé aux diploïdes. Les comparaisons morphologiques ont montré des variations entre les deux groupes, les moules triploïdes ayant une coquille plus large et haute que les diploïdes à longueur équivalente.

Cet article, intitulé « *Triploidy in Mytilus edulis impacts the mechanical properties of byssal threads* », a été accepté avec corrections mineur dans la revue *Aquaculture*. En tant

que premier auteur, j'ai contribué à l'essentiel de la recherche sur l'état de la question, au développement de la méthode et à l'exécution des tests de performance. Les Professeurs Réjean Tremblay, José Babarro, ainsi que les Docteurs Luc Comeau, Tiago Hori, et le maître John Davidson ont fourni l'idée originale, ils ont aidé à la recherche sur l'état de la question, ainsi qu'au développement de la méthode et à la révision de l'article. Le Professeur Christian Pellerin a aidé à la recherche sur la question ainsi qu'au développement de la méthode et à la révision de l'article. La Professeure Isabelle Marcotte a aidé à la révision de l'article. Une version abrégée de l'article a été présentée à la réunion annuelle de *Ressources aquatiques Québec en 2020* ainsi que lors de la first *Student Virtual Event* organisée par *Aquaculture Association of Canada*. Certains résultats présents dans cet article ont également été présentés lors de la conférence virtuelle internationale organisée par *Physiomar* en 2021, ainsi que lors de la conférence de l'*ACFAS* en 2022, de la conférence de *Aquaculture Association of Canada* en 2022, et de la conférence internationale de l'*AMMR4* en Angleterre.

TRIPLOIDY IN *MYTILUS EDULIS* IMPACTS THE MECHANICAL PROPERTIES OF BYSSAL THREADS

Kevin Osterheld ^{a*}, John Davidson ^b, Luc A. Comeau ^c, Tiago Hori ^d, José M.F. Babarro ^e,
Isabelle Marcotte ^f, Christian Pellerin ^g and Réjean Tremblay ^a

^a Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada. Kevin.Osterheld01@uqar.ca; Rejean_Tremblay@uqar.ca

^b Fisheries and Oceans Canada, Gulf Region Sector Office, 165 John Yeo Drive, Charlottetown, PEI, C1E 3J3, Canada. John.Davidson2@dfo-mpo.gc.ca

^c Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, 343 University Avenue, Moncton, NB, E1C 9B6, Canada. Luc.Comeau@dfo-mpo.gc.ca

^d Atlantic Aqua Farms, 918 Brush Wharf Rd, Vernon Bridge, PEI C0A 2E0, Canada., tiago.hori@atlanticaquafarms.com

^e Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC, Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain. jbabarro@iim.csic.es

^f Département de chimie, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada, marcotte.isabelle@uqam.ca

^g Département de chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada. c.pellerin@umontreal.ca

2.2 ABSTRACT

A major problem in mussel farming is mussel fall-off from mussel socks due to weakened byssal threads. This weakening is particularly prevalent following spawning events. During the last decades, significant work has been devoted to the production of triploid bivalves, which have a lower reproductive investment. In this study, we compared the byssal properties and energetic rates of triploid and diploid 1-year-old mussels (<30-mm). To determine the effect of triploidy on byssal threads, diploid and triploid mussels were placed in a recirculating flume to induce the production of byssal filaments. Our results showed that triploid mussels produced up to 65% more threads than the diploids. Furthermore, tensile measurements showed that byssal threads from triploid mussels had higher Young's modulus values (45% increase) and had multiple yield points. Energetic rates and metabolic investments were measured through food assimilation and oxygen consumption. The results showed that triploid mussels had a higher clearance rate (40% increase) and scope for growth (260% increase) when compared to diploids. Morphological comparisons showed variations between the two groups, with triploid mussels having a larger shell height than diploids of the same length.

Keywords: Triploidy, *Mytilus edulis*, byssus, attachment, scope for growth, VO₂

Highlights:

- Triploid mussels produce more byssal threads than diploids.
- Byssal threads from triploid mussels have a higher Young's modulus than diploids.
- Byssal threads from triploid mussels have more yield points than diploids
- Triploid mussels have a higher scope for growth than diploids
- Triploid shells have a larger shell height than diploids of the same length

2.3 INTRODUCTION

In recent decades, intensive research has been conducted to produce triploid bivalves, which tend to invest more energy in somatic growth rather than in reproduction (Ruiz-Verdugo et al. 2001) and result in larger organisms in a shorter time frame (Allen Jr and Downing 1986b, 1990, Brake et al. 2002, Brake et al. 2004). This energetic profile is linked to a lower energetic investment in reproduction because triploid bivalves are either sterile or have reduced fertility (Allen Jr et al. 1982, Allen Jr and Downing 1986a,b, Komaru 1989, Allen Jr and Downing 1990, Komaru et al. 1995, Kiyomoto et al. 1996). Sterility in bivalves is often associated with incomplete synapsis of homologous chromosomes (Komaru 1989, Kiyomoto et al. 1996), but other factors may also play roles (Guo and Allen Jr 1994b, Kiyomoto et al. 1996). Depending on the species, gametogenesis suppression and fertility reduction can vary (Beaumont and Fairbrother 1991, Guo and Allen Jr 1994a, b, Kiyomoto et al. 1996). Some species, such as *Chlamys nobilis* and *Mya arenaria*, are sterile or produce non-mature gametes (Allen Jr and Downing 1986a, Komaru et al. 1988), whereas others, such as *Crassostrea gigas*, produce viable gametes (Guo and Allen Jr 1994a, Komaru and Wada 1994).

In Canada, culturing mussels represents a major part of bivalve aquaculture, and it plays a central role in the country's coastal economy. In 2019, mussels accounted for approximately 37% of shellfish aquaculture income, providing 43 million Canadian dollars of benefits (Statistics Canada 2019). Mussel culture is particularly important in Prince Edward Island (PEI), where an estimated 75% of Canadian mussel production occurs (Statistics Canada 2021). In PEI, *Mytilus edulis* is the predominant species that is cultured (Tremblay et al. 2011).

In general, mussel aquaculture involves the collection of wild post-larvae (i.e., seed or spat) obtained using artificial collectors (Mallet and Myrand 1995, Comeau et al. 2008a). The post-larvae attach to the artificial substrates by a collection of protein fibers called a byssus. These high-performance fibers, or byssal threads, combine extensibility and tensile

strength, and they contribute largely to the competitive dominance of mussels on many wave-swept shores (Carrington 2002a, b). Byssal threads are highly organized, collagen-based biopolymers coated with a self-healing cuticle (Byette et al. 2014, Arnold et al. 2013, Waite et al. 1998). When mussels reach a length of over 20 mm on artificial collectors, they are harvested, sleeved in socks, and resuspended in the water column until they reach a marketable size (>55-mm) (Comeau et al. 2017). Currently, growing efforts have been put into the development of commercial mussel hatcheries, particularly in Prince Edward Island. Indeed, the development of such hatcheries may allow a constant supply of mussels even during bad years when wild production is low.

During the grow-out phase, there is a significant loss of mussels from the socks (Bourque and Myrand 2006, Fréchette 2012). Most losses occur during the summertime, representing up to 30% of production (Bourque and Myrand 2006), and these losses accounts for 59% of the total input of organic matter to the sea bed under the farms (Fréchette 2012). One major reason for this loss of mussels is seasonal weakening of the byssus (Carrington 2002b, Moeser and Carrington 2006, Zardi et al. 2007, Lachance et al. 2008, Babarro and Reiriz 2010, Hennebicq et al. 2013). Significant weakening of byssal threads has been observed after spawning events (Lachance et al. 2008, Babarro and Reiriz 2010). Lachance and colleagues (2008) measured a 32% reduction in byssal thread attachment strength one week after spawning. Mussels with a weakened byssus tend to detach from the socks, particularly during windy storms when the water turbulence increases and during mechanical manipulation of the socks (Lachance et al. 2008).

Another reason for the seasonal loss of mussels during production is biofouling, which occurs when other organisms, particularly tunicates, accumulate on mussels and mussel socks (Davidson 2015, Comeau et al. 2015). Between 1998 and 2004, tunicates have dramatically invaded and established themselves in PEI's mussel farming sites (Ramsay et al. 2008, Davidson 2015). The presence of tunicates is deleterious because they attach to mussels and mussel socks and compete with mussels for food and growing space (Watson et al. 2009, Fittridge et al. 2012). Furthermore, biofouling of mussels by tunicates increases the

weight borne by mussels and increases the load on byssal threads. This strain contributes to a significant loss of mussels during the handling of the mussel socks when additional stress is applied to the byssal threads (Gittenberger 2009, Arens et al. 2011).

Byssal attachment strength depends on various characteristics, such as the number of byssal threads per individual, their diameter, as well as their quality (Smeathers and Vincent 1979, Bell and Gosline 1996, Bell and Gosline 1997). Furthermore, these characteristics can change during the mussel development. For instance, the number of byssal threads produced for the attachment as well as their strength vary during mussel development. For example, the number of byssal threads is higher in young/small mussels than in older/larger ones. However, larger mussels have a higher thread strength (thickness), which compensates for the lower number of threads (Babarro and Carrington 2013). Byssal attachment is a dynamic process that is impacted by the mussel's environment (Mooser and Carrington 2006, Lachance et al. 2008). Studies have demonstrated that byssal thread production increases as water temperature increases from 0 to 25 °C. However, beyond 25 °C, byssal production decreases with increasing temperature (Young 1985, Rupp and Parsons 2004, Selin and Vekhova 2004). This trend has been confirmed in field trials with *M. edulis* (Price 1982, Carrington 2002b, Mooser and Carrington 2006, Lachance et al. 2008). In addition, water velocity, turbulence, and wave action positively affect byssal attachment and lead to an increased number of threads (Lachance et al. 2008, Babarro and Carrington 2013). Lachance and colleagues (2008) observed that attachment strength was greater for mussels harvested in autumn than for those harvested in the summer. Biological conditions, such as food availability, also influence byssal condition. Higher food availability allows for more energy accumulation and potentially more investment in byssal production (Clarke 1999, Babarro et al. 2008). A similar pattern was observed for food assimilation because higher assimilation allows for more energy to be invested in byssogenesis (Babarro et al. 2008).

Roberts et al. (2021) observed that the energetic costs of byssal threads production could increase from six to 11 times the energy budget allocated toward their production in mussels that were induced to produce threads compared to the control group. Moreover, the

cost of byssus production represented a greater percentage of the non-reproductive costs reaching up to 66% of the non-reproductive costs, compared to up to 24% in the control group. Furthermore, they observed a negative correlation between thread production and tissue growth supporting the hypothesis of prioritized energy allocation for byssal threads production over growth. Thus, when a greater production of threads occurs, the cost of byssus can increase up to values equal to the energy surplus (scope for growth), limiting growth and reproduction. This energy limitation and prioritization of allocation toward byssogenesis could in turn reduce the mussels' fitness (Sebens et al. 2018, Roberts et al. 2021).

To the best of our knowledge, the impact of differential energetic investments towards growth and reproduction on byssogenesis remains unknown. Therefore, the aim of this study was to determine if triploid mussels' have a higher metabolic performance and more energy to invest in soft tissue growth and byssogenesis. These traits would result in higher production yields in mussel farms. Thus, we tested the hypothesis that <30-mm triploid mussels produced in the laboratory have greater growth, byssus production, and thread quality than the diploids currently used in commercial farms.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Experimental design

Two-year-old cultured *M. edulis* with shell lengths of 50–60 mm were collected at the end of May 2018 in Saint Peter's Bay (46° 26' 30.7" N, 62° 44' 51.3" W) in PEI, Canada. The mussels were transferred on ice to the wet laboratory of the Université du Québec à Rimouski (UQAR) in Rimouski in less than 24 h. The mussels were maintained at a temperature below 12 °C to avoid spontaneous spawning, and they were fed continuously with a mixed suspension of microalgae to maintain gamete production. The microalgae suspension contained *Tisochrysis lutea* (CCMP 1324), *Chaetoceros neogracilis* (CCMP 1317), *Pavlova lutheri* (CCMP 459), and *Nannochloropsis occulata* (CCMP 525) at a ratio

of 5% dry biomass of tissues per day (Fabioux et al. 2005). Algal strains were obtained from the Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (Maine, USA).

Spawning was induced by thermal shock as described by Osterheld and colleagues (2021) in individual 500-mL flasks to control the fertilization process. Eggs from three females and sperm from three males were pooled separately. The pooled sperm and eggs were then mixed together at a ratio of 10 spermatozooids/oocyte. Fertilization was continuously monitored because the induction of triploidy occurs by inhibiting the extrusion of the polar bodies at a specific time. Non-treated diploid mussels were used as controls. Triploidy was validated by flow cytometry (Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) on mussel larvae that were a few days old, as described below. Each group of mussel larvae (diploid and triploid) was reared in triplicate 60-L conic tanks at 18 °C. The seawater (20 °C) was filtered at 1 µm, treated with U.V., stirred by aeration, renewed every two or three days and food added with 30 µl ml⁻¹ *Tisochrysis lutea*, *Chaetoceros neogracilis*, *Pavlova lutheri*, and *Nannochloropsis oculata* at 1:1:1:1 (~1.1 ng µl⁻¹ dry weight, dw). Once > 50% of the larvae reached the pediveliger stage, evidenced by the appearance of eyespot and presence of foot, the post-larvae were collected on a 130 µm mesh screen and transferred at the experimental nursery. Post-larvae were maintained in downwellers with 130 µm mesh screen at a density of 100 000 individuals downweller⁻¹. Each downweller had mussels from one larval tank to follow the same stock through ontogeny and was in a raceway tank of 120 L (2 m×0.5 m×0.12 m). The seawater was pre-filtered at 10 µm at a flow-rate of 100 L h⁻¹, temperature controlled at 18 °C and post-larvae fed continuously with the same nutritional treatment added of *Skeletonema costatum* (1:1:1:1:1) at 10 X 10⁹ cell day⁻¹ until they reached a length of >2-cm (1 year old) (Rayssac et al. 2010, Bassim et al. 2014). The ploidy of each group (triploid and diploid) was measured in triplicate. For each category (diploid and triploid), 20 individuals were tested to estimate their ploidy levels. Subsequently, their physiological and byssal characteristics were measured.

2.4.2 Induction and measurement of triploidy

Triploidy induction and determination of ploidy levels by flow cytometry were performed as described by Osterheld and colleagues (2021). Briefly, fertilized eggs were treated with 400 μM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) at 21 minutes post-fertilization for 10 minutes at 18 °C. Following the treatment, the fertilized eggs were washed with 1- μm filtered and UV-treated seawater (20 °C) and transferred to 25-L flat bottom tanks (250 eggs/mL). Once the fertilized eggs reached their D-shape larval stage in 2–5 days, a sample of approximately 100 larvae was gently homogenized in a 7-mL loose pestle Dounce tissue grinder (Wheaton, NJ, USA) in 1 mL of ice-cold Galbraith buffer (Galbraith et al. 1983). The homogenate was filtered through a 35 μm mesh into a tube containing 50 μL of a 1 mg/mL solution of propidium iodide (PI, Sigma, MO, USA) and 1 μm fluorescing beads (Fluoresbrite; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) as an internal standard. For >20-mm mussels, approximately 100 μL of hemolymph was extracted individually and stained with 50 μL of a 1 mg/mL PI solution and using 1 μm fluorescing beads as an internal standard in 700 μL of Galbraith buffer. Nuclei were stained for at least 15 minutes and then analyzed with a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, IN, USA) for 120 s at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{minute}$. Doublets were identified by plotting PI fluorescence (610 nm/20 nm band pass) area vs. PI fluorescence width and were excluded from the analysis (da Silva et al. 2005). The diploid nuclei peak position was identified in the PI fluorescence histogram by using mussel nuclei from a commercial stock known to be diploid. The coefficient of variation of diploid and triploid nuclei peaks was always <10%.

2.4.3 Byssal thread production

Byssus production and strength were compared between diploid and triploid individuals maintained under standardized conditions of water flow speed, temperature, salinity, light, and feeding regime. Experiments were carried out in a racetrack recirculating flume with an experimental section measuring 0.91 m in length and 0.45 m in width. In the flume, the spatial variability of the shear stress was low and always less than 10% for currents

less than 15 cm/s (Redjah et al. 2010). The flume was filled with 10 μm of filtered seawater with controlled salinity (27.0 ± 0.5 PSU) and temperature (18.0 ± 0.7 °C) and exposed to light/dark cycle of 14/10. Mussels were fed with one pulse-dose per day of phytoplankton ration equivalent of 5% of mussel dry mass (Fabioux et al. 2005). The phytoplankton species were previously described (CCMP 1324, CCMP 1317, CCMP 459, and CCMP 525).

In the experimental section of the flume, individual mussels were fixed using cyanoacrylate glue (Loctite Gel Control Super Glue, Henkel Consumer Adhesives, Avon, NY, USA) to vertical sides of an L-shaped glass and suspended 5 to 10 mm over the horizontal glass with the posterior end facing upstream (Figure 19). The 20 diploids and 19 triploids mussels were haphazardly placed in the middle of the experimental area. The mussels were placed in parallel and separated 5 cm from one another so that they all faced the incoming flow. The unidirectional current velocity was increased with a maximal acceleration lesser of 1 cm/s to avoid burst effects, until it reached a maximal of 10 cm/s, which was maintained for 72 h. Byssal threads from each mussel were counted. The byssal threads were cut as close as possible to the mussel's shell and were up to 20 mm long. To preserve the byssal threads until their use for the measurement of tensile properties (Seguin-Heine et al. 2014, Hennebicq et al. 2013), the distal parts were carefully collected and then dehydrated by air exposure in an open plastic bag stored at 4 °C for up to 6 months. Mechanical and biochemical measurements were carried out on each specimen.

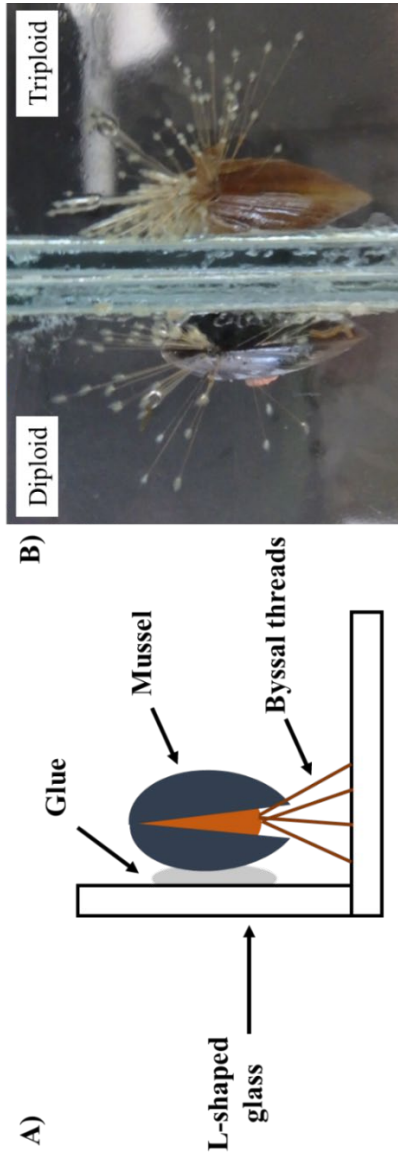


Figure 19 : Representation of mussel's setup on L-shaped glass for the induction of byssal thread production. A) Schematic representation of a mussel glued to a L-shaped glass. Key components are labeled and pointed by arrows. B) Picture of the production of byssal threads by a diploid and a triploid mussel glued to a L-shaped glass

2.4.4 Mechanical properties

The mussels needed to be kept alive for further physiological measurements. Therefore, only the distal section of the byssal threads was studied because it was not possible to sample the proximal section without opening the mussels. The previously dehydrated and preserved threads were rehydrated overnight before their analysis, to retrieve their natural properties (Hennebick et al. 2013, Bouhlel et al. 2017). The distal section was carefully isolated under a stereomicroscope (Zeiss Stemi 2000-C) from the rest of the thread (plaque and possible proximal section). The average diameter of each filament was measured using an optical microscope (Olympus BX41, Japan, with magnification of 200×) with Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Canada). The diameter was measured on four sections of the fiber, which were randomly selected, and four measurements were made per section. Measurements were made on five filaments per mussels.

Next, tensile characteristics were measured using a mechanical analyzer (Instron 5465, Norwood, MA, USA) equipped with a BioPuls bath filled with artificial seawater (pH 7.9). These tensile characteristics included the breaking force, stress-at-break, strain-at-break, and initial Young's modulus (Bouhlel et al. 2017). The extensibility of the thread was determined as the maximum tensile strain reached at the breaking point. It is reported as the ultimate strain. For each mussel, 10 threads were collected. From those threads, 200 and 190 of these threads were haphazardly prepared for tensile analyses for diploids and triploids, respectively. The ends of the threads were glued with cyanoacrylate between small sheets (5 × 5 mm) of cellulose acetate, placed between the grips of the mechanical testing frame, and extended at a rate of 5 mm/minute until rupture (Figure 20A). Only threads that broke in the middle section were considered valid, and threads that slipped or broke near the jaws were discarded from the data sets, leaving 74 diploid threads and 72 triploid threads for data analysis. From those threads, threads belonging to the same individual were pooled together and the mean values were calculated for each mussel, resulting in an “n” of 19 diploids and 19 triploids. Stress-strain curves were measured for individual threads. The stress (σ , in Pa) was calculated by dividing the force (F, in N) by the initial cross-sectional area (m^2) obtained

from the mean diameter of each thread, and it represents the resistance against the applied load. The strain (ϵ , %) is the relative elongation of the material under the load and was measured as the change in length divided by the initial length multiplied by 100. The ultimate force (F_{\max}), ultimate strength (σ_{\max}), and ultimate strain (ϵ_{\max}) were determined as the maximum values at the rupture point of each byssal thread. Finally, the thread's initial stiffness, expressed as the Young's modulus (E , in Pa) was measured as the slope of the stress-strain curve in the 5–10% strain range (Bouhleb et al. 2017) and is calculated as the stress divided by the strain.

2.4.5 Food assimilation rate

Following the experiments in the flume, the food assimilation rate was measured for each of the 39 mussels. Each mussel was fully immersed in a beaker filled with 0.02 μm filtered and UV-treated seawater at 18 °C and continuously fed microalgae at an amount equaling approximately 3% of its dry tissue biomass. After 48 h, feces were harvested in triplicate (without pseudo-feces) using precombusted (2 h at 450 °C) and preweighed 25-mm GFC filters and rinsed with isotonic ammonium formate (3.2%). The filters were dried at 70 °C for 48 h, then cooled to room temperature in a desiccator, and reweighed to measure the dried weight. Next, the filtered samples were combusted for 6 h at 450 °C, cooled in a desiccator, and weighed again to measure the burned weight. The mixed suspension of live microalgae used for feeding was filtered in triplicate as already described for feces. This procedure provided estimates of the organic and inorganic fractions contained in the feces and the food, which were entered into the following equation:

$$Abs (\%) = \left(\frac{f-e}{(1-e)*f} \right) * 100 \quad (1)$$

where e represents the amount of organic content present in the feces and was calculated as:

$$e = \frac{\text{dried feces weight (mg)} - \text{burned feces weight (mg)}}{\text{dried feces weight (mg)}} \quad (2)$$

and f represents the amount of organic matter present in the microalgae:

$$f = \frac{\text{dried algal weight (mg)} - \text{burned algal weight (mg)}}{\text{dried algal weight (mg)}} \quad (3)$$

2.4.6 Standardized clearance rate

Clearance rates (CRs) representing the volume of water completely cleared of particles per unit of time were measured for each mussel in 763.4-mL metabolic chambers filled with 0.02 μm filtered and UV-treated filtered seawater at 18 °C. The water in the chamber was constantly stirred by bubbling around the entire wall of the chamber to minimize algal sedimentation during the experiment. Measurements were performed simultaneously on eight individuals at a time and a blank (empty shell). After 1 h of acclimation, 60,000 cells/mL of *Chaetoceros neogracilis* (CCMP 1317) were added to the metabolic chamber. Next, the particle concentration was measured every 20 minutes for 1 h using a Multisizer M4e Coulter Counter fitted with a 100 μm aperture tube (Beckman, Mississauga, ON, Canada). The counter was set to measure particles ranging in size between 4 and 8 μm . CR values correspond to the 20-minute interval exhibiting the greatest depletion of particles (Gilek et al. 1992) to avoid potential underestimation of CR due to particle levels falling below a critical threshold for the valve opening (Newell et al. 2001; Riisgård et al. 2003). CR was calculated according to the following formula: (Comeau et al. 2008b)

$$CR = [(\ln C_1 - \ln C_2) - S] \cdot V \cdot T^{-1} \quad (4)$$

where CR is the clearance rate ($\text{l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), and C_1 and C_2 are the concentrations of algae at the two samplings during a 20-minute interval, S is the sedimentation constant estimated with the blank (coefficient of variation for S was < 5%); V is the volume (770 mL) of water in chambers; and T is the time elapsed between measurements. The individual dry mass was standardized for a 1 g mussel using allometric correction of 0.4 (Tremblay et al. 1998).

2.4.7 Oxygen consumption (VO_2)

Oxygen consumption (VO_2) measurements were performed using Q-Box Aqua respirometry chambers (Qubit System Inc, Kingston, ON, Canada). The night before the

analyses, the mussels were glued on an L-shaped glass and left in 0.02 µm filtered and UV-treated filtered seawater at 18 °C overnight. This period allowed for acclimation and production of byssus and aimed to reduce the production of feces and bacterial oxygen consumption in metabolic chamber. The Q-box was set so that the water flux was cycled for 8 h, and a 15-minute oxygen consumption measurement was performed every 30 minutes. During each measurement, water flow was stopped in the metabolic chamber. Before the analyses, a blank was performed by running the Q-Box with an empty mussel shell for 90 minutes. To calculate VO₂, the measurements were adjusted using the mussel dry weight and standardized for a 1 g mussel using allometric correction of 0.65 (Tremblay et al. 1998). VO₂ was estimated twice for each individual. For each mussel, the maximal VO₂ (VO_{2max}) was measured after it was fed approximately 3% of its dry biomass of tissue for several days, and the standard VO₂ (VO_{2min}) was measured after 7 days of starvation (Tremblay et al. 1998).

2.4.8 Mussel size and condition index

Following the physiological measurements, each mussel was dissected to measure the shell and total tissue dry mass (dried at 72 °C for 72 h). The shell length, shell height, and shell width were measured, and the thickness was measured on the left valves with a micrometer (342-371-30 Mitutoyo, Takatsu Ward, Japan) at the highest part of the shell. The condition index was calculated as described by Comeau et al. (2008a), and the shell thickness index was calculated as described by Fitzer and colleagues (2015).

2.4.9 Scope for growth (SFG)

The SFG was calculated as described previously (Winberg 1956, Warren and Davis 1967) using the following formula:

$$SFG = A - R \quad (5)$$

where SFG is the scope for growth of dry mussel's mass (J h⁻¹ g⁻¹), R is the energy expended through respiration, and A is the assimilation rate. A is determined as follows:

$$A = C * abs \quad (6)$$

where C is the CR of the individual multiplied by the particulate organic matter times a constant (here 23.5), and abs is the absorption efficiency. R is calculated as follows:

$$R = VO2max \times 20.33 \quad (7)$$

$$VO2 \max = DOSlope * (Vr - Va) * 3600/m \quad (8)$$

where $VO_{2\max}$ is the oxygen consumption ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), DOSlope is the rate of the decrease in dissolved oxygen ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Vr is the volume of the respirometer (L), Va the volume of the animal (L), and m is the wet mass of the animal (g) according to the Q-Box AQUA protocol. As excretion represents <5% of the energy budget in most bivalves, it was ignored (Pernet et al. 2008). The constants were determined based on the study of Tremblay et al. (1998).

2.4.10 Statistical analysis

Means \pm standard error of means were calculated for all experiments to compare the diploid and triploid groups. Sigmaplot V12 software was used to verify normality and equality of variance using the Shapiro-Wilk test. Following verification, Student's *t*-tests were performed to compare the numbers of byssal threads, mechanical thread properties, and shell ratios of length, height, and width. Log conversion was applied to raw Young's modulus data to validate the conditions for the Shapiro-Wilk test. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) (Anderson et al. 2008) was applied using PRIMER[®] version 7.0.13 with the PERMANOVA+1 add-on (Clarke and Gorley 2015) to examine SFG, VO_2 , absorbance, and clearance rate data. The PERMANOVA approach was selected to provide analysis of variance in the presence of an unbalanced design and non-normal distribution (Anderson and Walsh 2013).

When significant interactions were detected, post hoc tests (i.e., pairwise multiple comparisons) were conducted to identify differences among levels within factors. *P*-values

were calculated with 9,999 permutations, partial sums of squares (Type III), and Monte Carlo random draw probability under a reduced model to avoid issues of too few available permutations with small sample sizes (Anderson and Robinson 2003). Similarity of variance of response was tested by using a multidimensional dispersion routine (PERMDISP) in PRIMER, based on the deviation from centroids (Anderson et al. 2008). Analyses of byssal thread production and the mechanical performance of byssal threads were performed on 39 mussels (20 for diploids and 19 for triploids) ($n = 10$ threads/mussel). However, due to technical difficulties, data from eight diploids and seven triploids were statistically analyzed for SFG, VO_2 , absorbance, and clearance rate. As, SFG determination requires previous measurement of VO_2 , absorbance, and clearance rates, it was not possible to determine SFG for mussels that remained closed for any of these physiological measurements.

2.5 RESULTS

2.5.1 Induction of triploidy

Triploid induction was verified for the individuals used in our study (Osterheld et al. 2021). The triploid level reached 80% in the <30-mm mussels and was over 92% in the rearing population. No triploid specimens were observed in the control group. Only confirmed diploid and triploid individuals were used to measure byssal production and physiological characteristics.

2.5.2 Byssogenesis and mechanical characteristics

Byssogenesis and the mechanical properties of diploid and triploid mussels were compared. Figure 20B shows that under standardized flume conditions, triploid mussels with < 30 mm shell length produced 65% more byssal threads than diploid mussels of similar size. However, no difference in byssal thread diameter was observed between diploid and triploid mussels, which had mean diameters of $48 \pm 2 \mu\text{m}$ and $48 \pm 2 \mu\text{m}$, respectively.

The effect of triploidy on the tensile mechanical properties of byssal threads was also examined. Statistical analyses of the data showed differences only for the Young's modulus (Figure 20C), which represents the stiffness of the thread under tension before it reaches its yield point. The yield point indicates the onset of new mechanisms of mechanical energy dissipation that result in partial plastic deformation. As shown in Figure 20C, the Young's modulus values were 45% higher in the byssal threads of triploid mussel than in diploid mussels ($t = -2.741$; $df = 36$; $p = 0.009$). The higher Young's modulus values indicate that triploid byssal threads have a higher stiffness than those in diploids. No significant differences were observed for the ultimate strain (%), the ultimate stress (MPa), and the ultimate load (N) between diploids and triploids (Table 2).

Table 2. Mechanical measurements performed on diploid and triploid byssal threads, $n = 19$ diploid and 19 triploid mussels

Mechanical test	Diploid	Triploid	<i>P</i>-value
Ultimate strain (%)	97 (± 6)	88 (± 6)	0.294
Ultimate stress (MPa)	58 (± 5)	75 (± 8)	0.136
Ultimate load (N)	0.10 (± 0.01)	0.10 (± 0.01)	0.586

Data are shown as mean (\pm standard error of means).

The stress-strain curve results indicated that there were multiple yield points in some thread samples after the 24 h hydration. Although both diploid and triploid mussel showed multiple yield points, more yield points were observed in the triploid group (19%) than in the diploid group (7%). An example of a stress-strain curve for a triploid byssal thread is shown in Figure 20D.

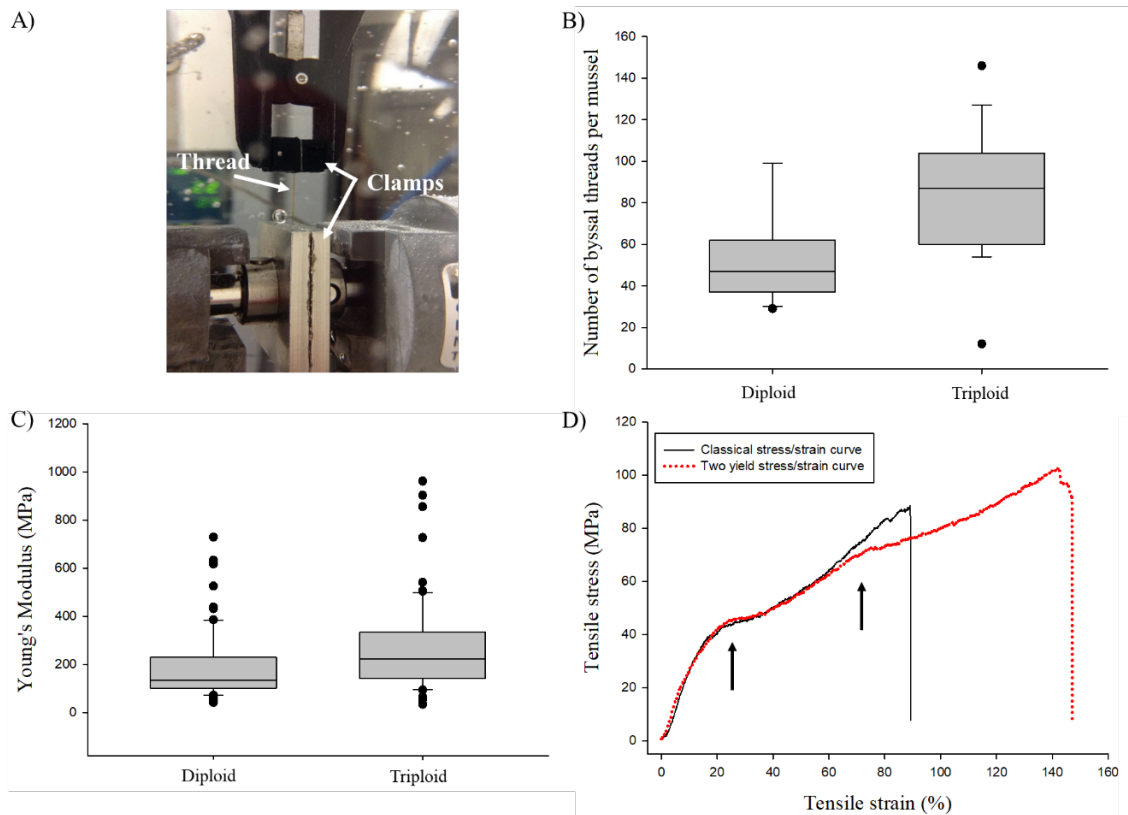


Figure 20 : Comparison of byssal threads' production and mechanical properties. A) Byssal thread clamped for tensile testing. The key components are labeled and pointed by arrows. B) Comparison of the number of byssal threads produced by diploid and triploid mussels over three days under hydrodynamic flume conditions of 10 cm/s; $n = 20$ diploid and 19 triploid mussels; $t = -3.856$, $df = 36$, $p = 0.00046$. C) Comparison of Young's modulus for diploid and triploid byssal threads; $n = 19$ diploid and 19 triploid mussels; $t = -2.741$, $df = 36$; $p = 0.0095$. D) Typical stress-strain curve in black and a stress-strain curve of a triploid thread with multiple yields in red. Yield points are shown by the arrows

2.5.3 Mussel size and condition index

Mussel dimensions were measured, and the ratios between shell length and width, height and length, and height and width were compared between the diploid and triploid groups. Although no difference in shell length or width was observed, triploid shells had significantly greater heights than the diploids. Furthermore, the triploid mussels had a lower

shell length/width ratio, a higher height/length ratio, and a higher height/width ratio than diploid mussels, revealing morphological differences between the two groups (Figure 21). However, as shown in Table 3, no differences were observed in shell weight, the shell thickness index, or the condition index between diploid and triploid mussels.

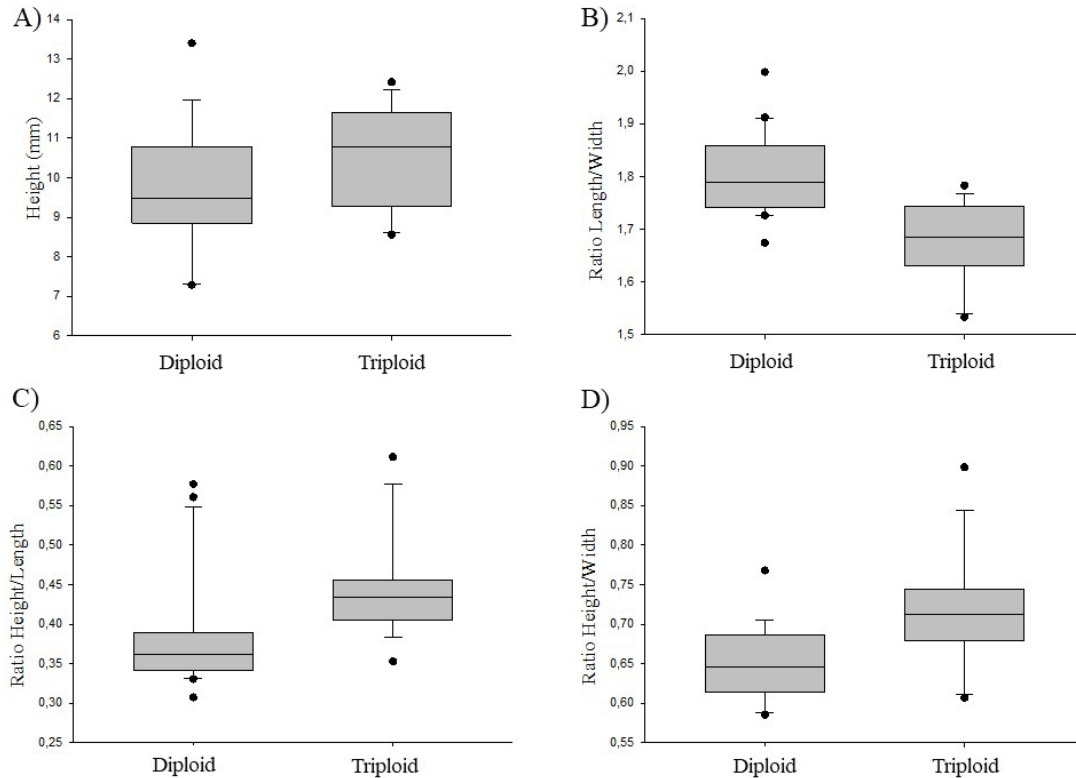


Figure 21 : Morphological differences between diploid and triploid mussel shells. N = 20 diploid and 17 triploid mussels. A) Comparison of height between the diploid and triploid mussels ($p = 0.049$). B) Comparison of the shell length/width ratio between diploid and triploid mussels ($p < 0.0001$). C) Comparison of the shell height/length ratio between diploid and triploid mussels ($p < 0.001$). D) Comparison of the shell height/width ratio between diploid and triploid mussels ($p < 0.01$).

Table 3. Shell properties of juvenile diploid and triploid mussels; n = 20 diploid and 17 triploid mussels

Shell Properties	Diploid	Triploid	<i>P</i>-value
Length (mm)	26.87 (\pm 0.61)	25.35 (\pm 0.59)	0.085
Width (mm)	14.72 (\pm 0.35)	15.00 (\pm 0.31)	0.561
Shell weight (g)	0.36 (\pm 0.03)	0.38 (\pm 0.02)	0.626
Shell thickness index	0.46 (\pm 0.01)	0.50 (\pm 0.02)	0.081
Condition index	25.86 (\pm 1.20)	26.36 (\pm 0.87)	0.746

Data are shown as mean (\pm standard error of means).

2.5.4 Physiological parameters

Multiple physiological measurements were compared between the diploid and triploid specimens, including the SFG, maximal and standard VO_2 , absorption efficiency, and CR. Significantly higher CR (Figure 22A) and SFG (Figure 22B) values were observed in triploid mussels than in diploid mussels. No statistical differences were observed between diploid and triploid mussels for VO_{2max} , VO_{2min} , and absorption efficiency (Table 4).

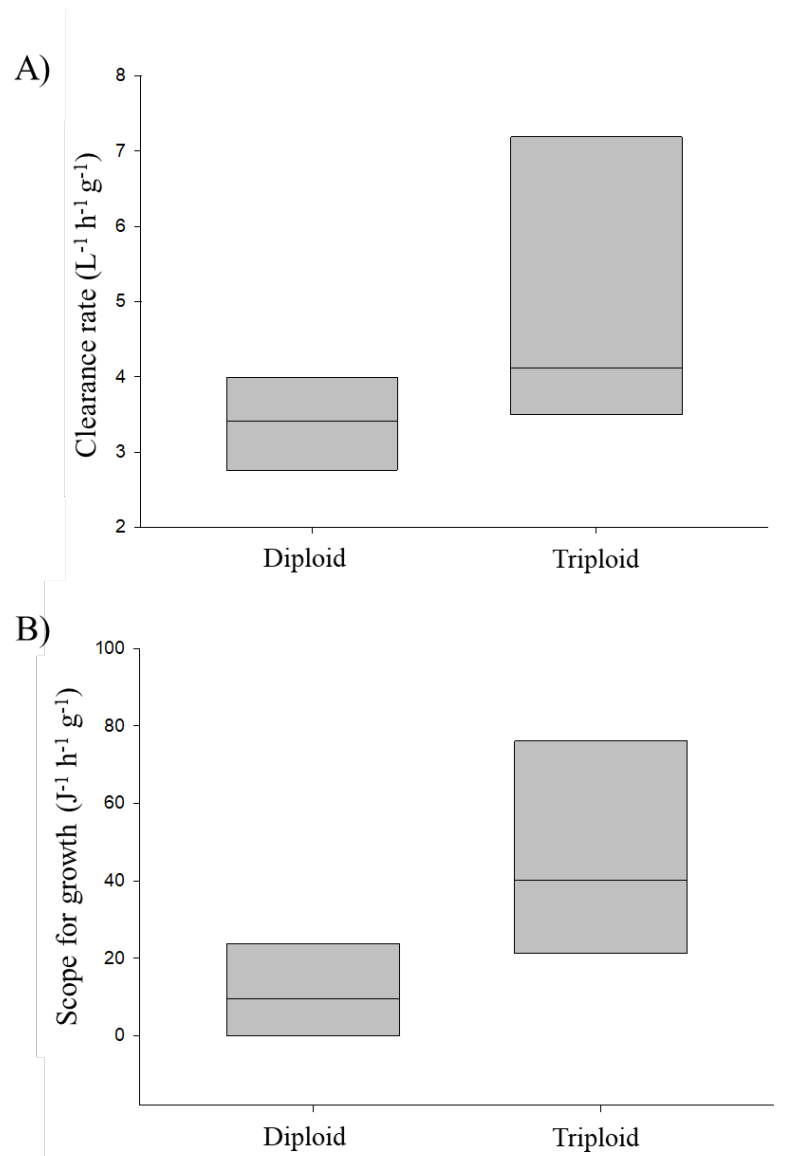


Figure 22 : Metabolic measurements in diploid and triploid mussels. A) Significant difference in clearance rates between diploid and triploid mussels; $n = 8$ diploid and 7 triploid mussels; $t = -2.02$; $df = 13$; one-tail $p = 0.032$). B) Significant difference in scope for growth values between diploid and triploid mussels; $n = 8$ diploid and 7 triploid mussels; $t = -2.37$; $df = 13$; two-tail $p = 0.03$

Table 4. Physiological characteristics of diploid and triploid mussels; n = 8 diploid and 7 triploid mussels

Analyses	Diploid	Triploid	df	t	P-value
Scope for growth (J h ⁻¹ g ⁻¹)	11.93 (± 2.0)	43.5 (± 29.72)	1 + 13	-2.37	0.03
VO ₂ max (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	2.2 (± 0.3)	1.87 (± 0.5)	1 + 13	1.56	0.14
VO ₂ min (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	1.97 (± 0.4)	1.38 (± 0.3)	1 + 13	1.51	0.15
Clearance rate (L h ⁻¹ g ⁻¹)	3.4 (± 0.2)	4.8 (± 0.7)	1 + 13	-2.02	0.03*
Absorption efficiency (%)	86.8 (± 1.4)	86.0 (± 2.4)	1 + 13	0.30	0.76

Data are shown as mean (± standard error of means). *Clearance rate *P*-value is expressed as the one-tail *P*-value

2.6 DISCUSSION

2.6.1 Byssogenesis and thread characteristics

Our results clearly demonstrate that triploid mussels produced a higher number of byssal threads (approximately 65% more) than diploid mussels under controlled and standardized conditions. With higher threads production, the probability that multiple threads are solicited during stress exposition is increased. With more threads recruited, the load will

be divided between all threads, thus reducing the risk of failure and improving the attachment (Bell and Gosline 1996). Previous researches have shown that the number of threads plays an important role in mussel attachment strength (Moeser and Carrington 2006, Lachance et al. 2011), and that thread diameter plays a similar role (Hennebicq et al. 2013). For instance, Seguin-Heine et al. (2014) compared the attachment of *Mytilus edulis* from open sea to a protected area (lagoon). Their results showed that although individual mussels' threads in open sea were stronger with larger diameter, their attachment was weaker than mussels from the lagoon, suggesting that the attachment strength was dependent of the number of threads produced. In our study, we observed no differences in diameter between triploid and diploid mussel threads. Our results suggest that the attachment strength of spats of triploid mussels will likely be stronger than that of diploids because the triploids produced more byssal threads than diploid mussels.

Byssal threads can be compared to human tendons because they are stiff and able to sustain substantial tension, but byssal threads are six times stronger than tendons (Bell and Gosline 1996, Waite et al. 1998, Troncoso et al. 2008) and have the capacity to self-repair (Allen et al. 1976, Vaccaro and Waite 2001, Carrington and Gosline 2004, Harrington and Waite 2007, Harrington et al. 2009, Reinecke et al. 2016, Bouhleb et al. 2017). The byssus allows mussels to hold onto their substrate even under water and in dynamic conditions. Indeed, once attached, the byssus is able to resist a current velocity of 10 m/s and an acceleration of 400 m/s² (Troncoso et al. 2008). Thus, higher production of byssal threads may increase mussel farming efficiency by allowing for better attachment, which would result in lower losses due to dislodgements during mussel growth.

Our data indicate that the byssal threads of triploid mussels have different mechanical characteristics than diploids. The Young's modulus of the distal region of byssal threads was 45% higher in triploid mussels than in diploids. In our study, the Young's modulus for diploid mussels was 187 ± 20 MPa. In a previous report, Lucas et al. (2002) measured a higher value for Young's modulus in adult *M. edulis* (532 ± 39 MPa) than that observed in this study. Such variation could be, at least partially, explained by differences in mussel size. Indeed,

contrary to Lucas and colleagues (2002), we investigated <30 mm mussels in our study because they represent the size used when sleeving in mussel culture. Small mussels generally produce more threads than adult mussels, but their threads tend to be thinner and weaker than those of adults (Babarro et al. 2008). However, Bouhleb and colleagues (2017) measured a Young's modulus value in adult *M. edulis* (146 ± 29 MPa) that is comparable to the one measured for diploid mussels in this study. This result suggests that the differences in Young's modulus values for diploid mussels between this study and that of Lucas and colleagues (2002) may be due to factors other than the mussel size and byssal thread diameter. These factors may include food quality and other environmental or genomic factors.

Young's modulus is used to describe a thread's stiffness before it reaches a yield point (Bouhleb et al. 2017). The higher modulus measured in triploid mussels fibers indicates better resistance against deformation. Lucas et al. (2002) compared the byssal strength of *M. galloprovincialis* and *M. edulis* and found higher modulus values in *M. galloprovincialis*. They postulated that this higher value might be due to a more highly cross-linked or crystalline protein structure. Similarly, our results suggest that different structural properties could be responsible for the mechanical behavior of triploid mussel threads.

Our results show the presence of multiple yield points in 19% of triploid mussel threads and in 7% of diploid mussel threads. The yield point represents the onset of a new mechanism to dissipate mechanical energy during material deformation (Bouhleb et al. 2017). One factor that may affect the yield point is a difference in the number or strength of metal ion-protein coordination complexes, which may influence stress-induced dissociation (Byette et al. 2016) and contribute to the different mechanical behaviors of diploid and triploid byssal threads. Indeed, Bouhleb and colleagues (2017) compared the mechanical properties of byssal threads from various bivalve species and demonstrated that metal ions play a major role in the mechanical behavior of the threads. Their work confirms that of other studies that demonstrated the importance of metal ions in the sacrificial bonds of byssal threads due to the production of non-covalent cross-links between metals and organic compounds, such as

histidine and dihydroxy-l-phenylalanine residues (Reinecke et al. 2016; Waite et al. 1998; Babarro and Reiriz 2010; Bouhleb et al. 2017). Thus, changes in the metal composition of the fibers could result in modified mechanical behaviors and changes in the structural composition of the cross-links, ultimately leading to other mechanisms to dissipate mechanical energy that is applied to the threads. Furthermore, Brazee and Carrington (2006) observed the presence of double yields in *Modiolus modiolus* byssal threads. They postulated that the double-yielding could enhance the toughness of the threads at low strength, thus increasing the attachment strength of the byssus complex. They suggested that the additional yield may be due to alternative molecular structures of the distal region.

The presence of multiple yield points could also be explained by the difficulty in rehydrating dehydrated triploid mussel threads. A study on hydrated and dehydrated byssal threads in *M. edulis* showed that old, dehydrated threads had multiple yield points, but these yield points were not observed in hydrated threads (Aldred et al. 2007). The authors suggested that multiple yield points could represent progressive failure of different thread components. When hydrated, the water present in the fiber may act as a lubricant between the fiber constituents. In dehydrated fibers, cohesion between the thread components may be less efficient, resulting in multiple deformations/failures due to the successive breaking of the thread constituents. In our study, the dehydrated threads were preserved at 4 °C and rehydrated overnight before mechanical analysis. The diploid and triploid mussel threads were rehydrated under identical conditions, but it is possible that the structure of triploid mussel threads is less hydratable or more hydrophobic. Such behavior could be due to an alteration in the ratio of α -helices and β -sheets present in the thread proteins. Hagenau and colleagues (2011) observed that the stiffness of dehydrated threads was 4–5 times higher than that of hydrated threads, which were more ductile and elastic. However, the strength needed to break the threads was similar in hydrated and dehydrated threads. Another study by Aldred and colleagues (2007) also observed increased stiffness in dehydrated threads.

2.6.2 Bioenergetics

SFG is a metabolic and energetic model describing an organism's total production (somatic growth rate and gamete production), and it is commonly used to study bivalves (Bayne 2017). In our work, triploid mussels demonstrated a significantly higher SFG compared to diploids. A higher SFG was related to a lower standard metabolism in *C. virginica*, which induced faster growth (Pernet et al. 2008). Standard metabolism is the basal metabolism of an organism at which minimal energy is used to maintain life. It is positively correlated with protein turnover and growth in mussels, such as *M. edulis* (Hawkins 1985, Hawkins et al. 1989, Bayne and Hawkins 1997, Bayne 2017). Furthermore, in mussels, standard metabolism has been shown to be affected by genotype. Indeed, mussels with higher multilocus heterozygosity (MLH) had a lower standard metabolism (Tremblay and Landry 2016; Tremblay et al. 1998) and higher SFG (Hawkins et al. 1989, Tremblay et al. 2011). In this study, although differences in mean VO_2 max and VO_2 min were measured, due to high inter-individual variability, no significant differences were observed in the standard metabolic rate between triploids and diploids. These results diverge from other studies that suggested that triploid bivalves have a growth advantage due to their higher MLH (Allendorf and Leary 1984, Stanley et al. 1984, Beaumont and Kelly 1989, Guo and Allen 1994). Other hypotheses may explain the higher SFG in triploid mussels.

Triploid bivalves invest less energy in reproduction than diploids (Normand et al. 2008). This reduced investment in reproduction could allow more energy to be available for other metabolic functions. Reports have estimated that mussels that do not engage in reproductive efforts may increase their growth by approximately 64% (Honkoop 2003, Bayne 2017). *M. edulis* generally attain reproductive maturity when they reach a length of approximately 50 mm (Rodhouse et al. 1986), but the presence of some reproductive investments has been observed in cultured mussels of <30 mm (Myrand et al. 2000). In our study, which was performed on mussels that were 20 to 30 mm in length, spontaneous spawning was observed in a few diploid mussels during the metabolic measurements, but spontaneous spawning was not observed in triploid mussels. Thus, this observation suggests

that diploid mussels had started to invest energy in reproduction. Coupled with a lower SFG, it is not surprising that diploid mussels had less energy to invest in byssogenesis.

Byssogenesis is essential to the survival of mussels, but it is an expensive metabolic process, costing up to 15% of the mussel's energy expenditure (Griffiths and King 1979, Babarro and Reiriz 2010). With more energy available, triploid mussels can produce more threads of better quality, which may result in better attachment and survival during suspension-culture operations. Sebens et al. (2018) showed that byssal production could affect the fitness of mussels. When little energy is allocated to byssal production, the fitness is reduced due to high risks of dislodgment and predation, thus increasing the mortality. Furthermore, when high amounts of energy are allocated to byssal production, the fitness decreases as less energy is available for growth and reproduction. This phenomenon explains the negative correlation observed between growth and byssal production, with less energy invested for growth when byssal threads production was induced (Sebens et al. 2018, Roberts et al. 2021). Byssal production is also prioritized over growth considering that it is essential for the mussels' survival and occurs even under starvation (Roberts 2019). In contrast, several studies reported a negative correlation between spawning and attachment strength of mussels, with weakening of byssal strength during reproductive investment (Lachance et al. 2008, Seguin-Heine et al. 2014, Babarro and Reiriz 2010). These results seem to suggest a prioritization of energy allocation to reproduction. However, triploid mussels are expected to have reduced fertility which may increase the energy available to produce more byssal threads. Thus, with more energy to allocate to byssus production, mussels are expected to be less easily dislodged and have better survival compared to diploid mussels. Roberts et al. (2021) estimated to ~ 1 J/thread the energetic costs associated to the production of one byssal thread, independently of the season. Therefore, the greater byssal threads production of triploid mussels should theoretically induce higher energetic costs and reduce their growth. However, triploid mussels also demonstrated an increased scope for growth, which could compensate for this increased energetic demand associated to more important byssal production and allow better growth of triploids.

It is possible that the byssal threads produced by triploid mussels have different compositions in term of amino acids or metal content. This could result in altered molecular binding inside the threads, particularly considering the sacrificial network, which may affect the mechanical properties of the threads (Reinecke et al. 2016, Bouhleb et al. 2017). For instance, Babarro and Reiriz (2010) observed that mussels which were forced to spawned produced byssal threads with higher histidine and lysine content which are known to play a role in the sacrificial networks of byssal threads and have an impact on metal chelation.

Self-thinning has been observed on mussel socks, which is mainly due to space competition that reduces production rates (Fréchette et al. 2010, Fréchette 2012, Guíñez 2005a). During self-thinning, mussels keep growing and their density decreases to reach an equilibrium state between growth and space available on the mussel socks (Comeau et al. 2015). As triploid mussels produce more byssal threads with a higher Young's modulus, they were suggested to impacts their attachment compared to diploids and be less likely to fall off. Bell and Gosline (1996) found that the failure of the byssal threads occurs more often at the plaque or in the proximal region. This could suggest that improved mechanical properties of the distal part of the threads would not necessarily result in a better resistance and better attachment. Later, Carrington and Gosline (2004), showed that a stress applied on the distal region beyond the yield point could deform the distal region and reduce its stiffness. The recovery of the distal region could take minutes during which the distal part is weakened. Therefore, they suggested that since the distal region has a rather long recovery time, it could be a sensitive part of the threads when exposed to rapid and successive stress beyond the yield point. The higher mechanical properties of the distal region of triploid mussels could allow a better reorientation of the threads in the direction of the applied stress as well as the recruitment of more threads during the deformation of the distal region. The recruitment of more threads could reduce the stress on individual threads as the load would be distributed upon more threads and could reduce mussels' fall-off (Bell and Gosline 1996). Therefore, to maintain the same amount of commercial mussels, we hypothesized that farmers would need to place fewer triploid mussels on the mussel socks, which would lead to less competition for space and reduced self-thinning. Moreover, if triploid mussels have better attachment in

the wild, this could provide them with higher resistance against fall-off due to biofouling, particularly by tunicates, which are a problematic, invasive species in PEI (Davidson 2015, Comeau et al. 2015, Gittenberger 2009, Ramsay et al. 2008).

Finally, we observed morphological differences between diploid and triploid mussel. Comparison of diploid and triploid mussels of similar length indicated that triploids had lower length-to-width and higher height-to-length ratios than diploids. The triploid mussels had a larger shell height than diploid mussels of the same length. The reasons behind these morphological differences are not clear. However, similar morphological variations have been observed in other bivalves previously. Stanley et al. (1984) observed in triploid oysters (*C. virginica*) an increase of height over 12% in comparison to diploids during their first 2 years of life. Triploid scallops also displayed an increase in shell size compared to diploids (Tabarini 1984). Normand et al. (2008) observed that although no difference in flesh weight was observed, triploid oysters shells were significantly heavier than those of diploids, suggesting more energy allocation for shell growth. Babarro and Carrington (2013) observed that for a given shell length, *M. galloprovincialis* produced shells that were thicker with a smaller height than diploids when exposed to wave conditions. They suggested that this type of morphological adaptation may reduce the risk of dislodgment at the expense of growth and reproduction. Furthermore, they observed no large individuals (≥ 8 cm), suggesting that waves could induce a size limit on mussel attachment. In our experiment, both diploid and triploid mussels were exposed to a small current of seawater inflow. It is possible that triploid mussels responded to the water flux in a stronger manner than the diploids, producing shells with larger widths and heights. Moreover, the triploids produced more byssal fibers with a higher Young's modulus allowing them to have better attachment. These features may allow them to avoid size limitations in wave-exposed areas.

2.7 CONCLUSION

This study showed that triploid mussels produce more byssal threads than diploids. Furthermore, the threads from triploid mussels had a higher Young's modulus and had more

yield points than diploids, suggesting that the triploid and diploid fibers had different mechanical properties. In addition, the triploid mussels had a higher clearance rate and SFG, suggesting that triploid mussels have a improved growth potential. This hypothesis is supported by the higher height/length and smaller length/width ratios measured in the triploid mussels, and indicates that when length is the same, triploid mussels tend to have a larger shell height than diploids. Thus, our study suggests a significant attachment advantage for triploid mussels over diploid mussels, which may result in decreased losses for mussel farmers and better farming yields. Further work should be performed to compare the production of byssal threads by adult mussels and their mechanical properties to validate that this advantage is maintained up to the harvest. Moreover, future studies should investigate the byssal thread composition of diploid and triploid mussels in terms of amino acids and metal ion content.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ressource Aquatiques Québec Research Network [Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies, no. 2014-RS-171172] and Atlantic Aqua Farms in partnership with the Department of Fisheries and Oceans of Canada (Aquaculture Collaborative Research and Development Program) [Project 17-G-03]. The authors wish to thank Dr. Z. Bouhlel and N. Gauthier for technical support. K.O, R.T. and I.M. are members of Ressources Aquatiques Québec, and C.P. is a member of the Québec Centre for Advanced Materials.

CHAPITRE 3

INVESTISSEMENT EN REPRODUCTION ET DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MOULES TRIPLOÏDES *MYTILUS EDULIS*

3.1 RESUME

Un intérêt massif a été porté à la production de bivalves triploïdes qui sont connus pour avoir un investissement reproductif altéré comparé aux diploïdes. Il est attendu que cette réduction de l'investissement reproductif améliore la survie et la croissance des bivalves triploïdes comparé aux diploïdes, car leur énergie n'est pas investie dans la reproduction et peut donc être utilisée pour d'autres besoins métaboliques. Cependant, la réduction de la fertilité des triploïdes varie entre les espèces et par conséquent impacte leur croissance et survie. Dans cette étude, nous avons comparé l'investissement reproductif des moules diploïdes et triploïdes entre deux groupes de tailles différentes (< 30 mm et > 50 mm). L'index gonadosomatique (GSI), le volume des gonades, la maturation des gonades, ainsi que le sexe-ratio ont été mesurés. Les résultats ont montré que bien que les moules triploïdes investissent une partie de leur énergie dans la reproduction, elles avaient un GSI et un volume de gonades inférieur aux diploïdes. Aussi, dans tous les groupes testés, les gonades des triploïdes étaient moins matures que celles des diploïdes, et leur sexe-ratio était significativement altéré avec une absence de femelles triploïdes. De plus, les gonades des moules triploïdes ont montré des signes de résorption des gamètes, suggérant que les moules triploïdes pourraient utiliser les réserves énergétiques stockées dans leurs gamètes. Cette étude a montré que les moules triploïdes investissent moins d'énergie dans la reproduction et suggère que l'énergie ainsi épargnée pourrait être utilisée pour améliorer la production de byssus et en modifier les propriétés mécaniques. En conclusion, les moules triploïdes pourraient être d'un grand intérêt pour l'aquaculture puisqu'elles pourraient avoir une

meilleure résistance contre l'affaiblissement post-ponde et avoir une meilleure récupération grâce à la résorption des gamètes.

Cet article, intitulé « *Reproduction investment and gonad development in triploid mussels, Mytilus edulis* », est prévu pour une soumission dans le journal *Aquaculture*. En tant que premier auteur, j'ai contribué à l'essentiel de la recherche sur l'état de la question, au développement de la méthode et à l'exécution des tests de performance. Le Professeur Réjean Tremblay, les Docteurs Luc Comeau, Tiago Hori, ainsi que le maître John Davidson ont fourni l'idée originale, ont aidé à la recherche sur l'état de la question, au développement de la méthode ainsi qu'à la révision de l'article. La Professeure Céline Audet a également contribué au développement de la méthode ainsi qu'à la révision de l'article. Une version abrégée de l'article a été présentée lors de la réunion annuelle de Ressources Aquatiques Québec en 2021 et 2022 à Québec, ainsi que lors de la conférence de l'*ACFAS* en 2022, de la conférence de *Aquaculture Association of Canada* en 2022, et de la conférence internationale de l'*AMMR4* en Angleterre.

**REPRODUCTION INVESTMENT AND GONAD
DEVELOPMENT IN TRIPLOID MUSSELS, *MYTILUS EDULIS***

Kevin Osterheld ^a, John Davidson ^b, Luc A. Comeau ^c, Céline Audet ^a, Tiago Hori ^d,
Réjean Tremblay ^a

^a Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada. Kevin.Osterheld01@uqar.ca; Rejean_Tremblay@uqar.ca; celine_audet@uqar.ca

^b Fisheries and Oceans Canada, Gulf Region Sector Office, 165 John Yeo Drive, Charlottetown, PEI, C1E 3J3, Canada. John.Davidson2@dfo-mpo.gc.ca

^c Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, 343 University Avenue, Moncton, NB, E1C 9B6, Canada. Luc.Comeau@dfo-mpo.gc.ca

^d Atlantic Aqua Farms, 918 Brush Wharf Rd, Vernon Bridge, PEI C0A 2E0, Canada., tiago.hori@atlanticaquafarms.com

3.2 ABSTRACT

Massive interest has been given to the production of triploid bivalves as they are known to have altered reproductive investment compared to diploids. This reduced reproductive investment is expected to improve the survival and growth of triploid bivalves compared to diploids as the energy spared from reproduction could be used for other metabolic needs. However, the reduction of triploid fertility varies between species and consequently its impacts on survival and growth. In this study, we compared the reproductive investment of diploid and triploid mussels between two size groups (< 30 mm and > 50 mm). The gonadosomatic index (GSI), gonads volume, gonads maturation, and sex ratio were measured. Results showed that while triploid mussels do invest a part of their energy in reproduction, they had lower GSI and gonad volume than diploids. Also, in all tested groups, triploid gonads were less mature than those of diploids, and their sex ratio was significantly altered with the absence of females in triploids. Furthermore, triploid gonads showed signs of gamete resorptions, suggesting that triploid mussels could use energy reserves stored in gametes. This study shows that triploid mussels invest less energy in reproduction and suggest that spared energy could be used to enhance byssal production with modified mechanical properties. In conclusion, triploid mussels could be of great interest for aquaculture as they may have better resistance against post-spawning weakening and have better recovery due to gametes' resorption.

Keywords: Bivalve, Triploidy, *Mytilus edulis*, Gonad volume, Gonadosomatic index, Sex ratio, Gametes

Highlights:

- Triploid mussels invest less in reproduction than diploids
- Triploid mussels have reduced gonadosomatic index and gonad volume
- Gametes of triploid mussels do not show sign of full maturation

- Triploid mussels have altered sex ratio with an absence of females
- Triploid mussels can produce fertilizing gametes

3.3 INTRODUCTION

During the last decades, important work has been realized to develop triploid bivalves, like the mussels *Mytilus edulis* in the east coast of Canada (Brake et al. 2002, 2004, Osterheld et al, 2021). Triploid bivalves tend to have reduced fertility compared to diploid and depending on the species, they can even be fully sterile (Kiyomoto et al. 1996, Brake et al. 2004, Qin et al. 2020). However, other factors could also be involved in their sterility (Kiyomoto et al. 1996, Komaru 1989). Some species are sterile or produce non-mature/abnormal gametes such as the *Chlamys nobilis* or *Mya arenaria* (Allen Jr and Downing 1986a, Komaru et al. 1988), while others like the Japanese, Pacific and Chinese oysters still produce fertilisable gametes (Guo and Allen Jr 1994a, Komaru and Wada 1994, Wu et al. 2019). Kiyomoto et al (1996) showed that the gametogenesis and the gametes' morphology were altered in triploid *M. galloprovincialis* and Brake et al. (2004) observed no histological evidence of spawning in triploid mussels, *M. edulis* after 11 months in the field conditions. With lower fertility, triploid bivalves invest less energy in reproduction and this energy is available for relocation to other metabolic needs, such as growth or byssal threads production (Ruiz-Verdugo et al. 2001, Osterheld et al. 2022 submitted). Several studies measured faster growth and production of larger individuals in triploid bivalves (Allen Jr and Downing 1986b, Allen Jr and Downing 1990, Brake et al. 2002, Brake et al. 2004) associated to different accumulation patterns and use of energetic reserves between diploids and triploids. Racotta et al. (2008) observed lower accumulation of energetic reserves, such as acylglycerides and carbohydrates in the gonads of the triploid lion-paw scallops *Nodipecten subnodosus* comparatively to diploids. These results are in accordance with other studies showing lower transfer of energetic reserves to the gonads of triploids and their use to increase growth (Allen Jr and Downing 1986b, Jiang et al. 1993, Hand et al. 1999, Ruiz-Verdugo et al. 2001, Brake et al. 2004). Consequently, triploid bivalves preserve their glycogen during summer for their physiological needs, contrary to their consumption by diploids to support gametogenesis (Allen Jr and Downing 1986b, Allen Jr and Downing 1990, Nell 2002, Duchemin et al. 2007).

Previous study on *M. edulis* spat mussels (< 30 mm) from east Canadian coast showed higher scope for growth in triploids than in diploids resulting in higher available energy to invest in growth and byssogenesis, resulting to over 40% more byssal threads production (Osterheld et al., 2022 submitted). However, this experiment was realised in juvenile mussels, too small to invest their energy in reproduction, so the trade-off between growth and reproduction has not been estimated. The objective of this study was to define in adult mussels the impact of gametogenesis investment on growth of triploids comparatively to diploids. We tested the hypothesis that adult triploid mussels have higher growth rate, as less energy is invested in reproduction evaluating growth, condition index (CI), gonadosomatic investment (GSI), gonad development stage, and gonad volume fraction (GVF).

3.4 MATERIALS AND METHODS

Two groups of triploid and diploid mussels were produced in June 2019 in laboratory. The first group, called laboratory < 30 mm cohort was produced in our wet laboratory facilities at the Station aquicole of Université du Québec à Rimouski (Rimouski, Canada). Diploids and triploids originated from the same parents and were produced as described in Osterheld et al. (2021). Briefly, 50 mm *M. edulis* from St. Peters Bay in Prince Edward Island (PEI, Canada) were individually induced to spawn by 10 °C thermal shock. Ratio of 10 spermatozooids per egg was used for fertilization and triploidy was induced using 400 µM of 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) (Sigma-Aldrich, MO, USA) in UV ultra-filtered seawater at 17 min post-fertilization for 10 min at 18 °C. Then, the eggs were washed with UV ultra-filtered seawater and maintained at 18 °C until they reached their larval D-shaped stage. Diploid and triploid larvae were fed each two days with 30 cells µl⁻¹ of a mixed suspension of microalgae containing *Pavlova lutheri* (CCMP 459), *Nannochloropsis oculata* (CCMP525), *Chaetoceros neogracilis* (CCMP1317), and *Tisochrysis lutea* (CCMP 1324) at a ratio of 1:1:1:1 equivalent biomass according to culture algal dry weight. Water was renewed every two days with UV ultrafiltered (1µm) seawater. Once over 50% of the larvae reached their pediveliger stage, they were transferred to flow-through downwellers supplied with 18–20 °C seawater and fed continuously at 30 cells µl⁻¹ with a mixture of algae

containing *Pavlova lutheri* (CCMP 459), *Nannochloropsis oculata* (CCMP525), *Chaetoceros neogracilis* (CCMP1317), *Tisochrysis lutea* (CCMP 1324) and *Tetraselmis suecica* (CCMP 904) at a ratio of 1:1:1:1:1 equivalent biomass according to culture algal dry weight (Rayssac et al. 2010). Once mussels were > 20 mm, the ploidy of each mussel was determined through flow cytometry as described by Osterheld et al. (2021) and 80 diploids and 80 triploids were identified and transferred and maintained in recirculatory aquaria at 20 ± 0.1 °C from June to December 2020 (total duration of 6 months) at constant photoperiod of 14L:10D in a Multi-stressor unit (Aquabiotech inc., Coaticook, Qc, Canada). The length, width, and height of the mussels' shell were measured at the beginning of the experiment and once mussels were collected for measurement of their reproductive performance, prior to the measurement of their gonadosomatic index. Every day from Monday to Friday, the mussels were fed at 3% of their dry mass with the mixture of algae already previously described. Every month, 6 diploid and 6 triploid mussels were harvested and sacrificed for GSI and CI measurements and histological analyses.

The other group of diploid and triploid mussels, called > 50 mm cohort, was produced at the Bideford Shellfish Hatchery (Bideford, PEI, Canada), following the same protocol of triploidy induction and larval rearing. At the pediveliger stage, water temperature was lowered by 2 °C every 48h until the temperature reached 10 °C, the temperature of the Georgetown harbor water at the moment of transfer. The mussels were transferred in a Portable Aquatic Laboratory pumping water from Georgetown harbor without treatment to estimate their growth under a flow through water system preventing losses that could have been associated to predation or hydrodynamic conditions. From May to September 2021, every two weeks, 20 mussels near 50 mm were sent to Rimouski for ploidy determination by flow cytometry, GSI and CI measurements, and histological analyses. At the end of the experiment, 20 diploid and triploid mussels were used for SFG measurements as previously described for the laboratory cohort.

3.4.1 Growth and reproduction

For the laboratory < 30 mm cohort only, the maximal growth in mm of diploid and triploid mussels was determined from length, height, and width at the time of sampling minus the initial experimental measure obtained in June 2020. At each sampling, for laboratory < 30 mm cohort and > 50 mm cohort, soft tissues were dissected to estimate condition (CI) and gonadosomatic index (GS) measured on dry mass obtained at 72 °C for 72h:

$$\text{Condition index (CI)} = \frac{\text{Dry total meat mass (g)}}{\text{Dry shell mass (g)}} * 100$$

$$\text{Gonadosomatic index (GSI)} = \frac{\text{Dry gonad mass (g)}}{\text{Dry total mass (g)}} * 100$$

Both mantle tissue sections (from each valve) were collected separately with the rest of their tissues and mass measured as well as their shell. One mantle section was preserved in a fixative solution of Davidson containing 30% of 95% ethanol (Sigma-Aldrich, MO, USA marque), 20% of 40% formaldehyde (VWR, PA, USA), 30% of distilled water, 10% of sterile and filtered (1 µm filtered and UV treated) seawater, and 10% of acetic acid (ACROS ORGANICS, NJ, USA) (Shaw and Battle 1957), for further histological analyses. The fixative was renewed after 24h to get rid of water that was present in the mantle. The second section of the mantle and the rest of the tissues were dried at 72 °C for 72h and mass was measured (g). The dry/wet mass ratio of the second section of the mantle allowed to estimate the dry weight of the first section and total dry mass of mantle. Mantles preserved in the fixative solution were dehydrated in an ascending series of ethanol solutions and embedded in methyl acrylate resin (JB-4 embedding kit protocol, Polysciences, Inc., Warrington Pa. 1982) (Sigma-Aldrich, MO, USA). For each mantle, 3 µm (thickness) sections were cut at different levels of embedded tissue E (microtome Supercut Reichert-Jung Model 2050,

Cambridge Instrument 6MbH, Germany). Sections were mounted on glass slides and stained with toluidine blue. The gonad volume as well as the developmental stage of gametes were estimated in August and December samples from the < 30 mm laboratory cohort. The gonad volume and developmental stage of gametes were estimated for each sampling time (May to September) in the > 50 mm cohort. Sections were examined and photographed under 400x magnification with Rebel microscope integrating image analyse system (Echo, San Diego, Ca, USA). Three pictures were obtained for each section for a total of 9 pictures per mussel. The reproductive conditions were assessed on each picture using stereological analysis. Sex and gametogenic stage were determined according to the reproductive scale reported by Steele and Mulcahy (1999). Comparison of the gametes developmental stage between diploids and triploids from each cohort was performed by calculating the percentage of each maturation stage at each sampling period. Finally, the proportion of gametes (gamete volume fraction, GVF) was estimated by the volume of the gametes on the total volume of the gonad measured by the Echo image analyse system (Lowe et al. 1982, Myrand et al. 2000).

3.4.2 Spawning induction

On > 50 mm cohort, we tried to induce the spawning using thermic shocks, as already described. Supplementary mussels were sampled on 20 May 2021 on Prince Edward Island. Ploidy level was rapidly determined by flow cytometry and 15 diploids and 15 triploids were selected and immediately induced to spawn using several 10 °C thermal shocks.

3.4.3 Statistics

All statistical tests were realized with Sigmaplot V12 software. Normality and homoscedasticity were validated using the Shapiro-Wilk procedure and two ways ANOVA with ploidy level and time as factors were performed to compare growth (in length, height, and width), GSI, CI for each cohort (Anderson et al. 2008). GVF were compared between triploids and diploids by Student t-test for the laboratory < 30 mm cohort at each of the two

dates analysed. For > 50 mm cohort, GVF was analysed using two ways ANOVA with ploidy level and time as factors.

3.5 RESULTS

3.5.1 < 30 mm mussels' cohort

Maximal growth of < 30 mm mussels was measured over the six months of the experiment. The cohort of < 30 mm mussel showed no significant difference in maximal growth between diploids and triploids (Table 5).

Table 5. Maximal mean growth of < 30 mm laboratory cohort for diploid and triploid mussels (mm) from the beginning of the experimentation (June) until their sampling for condition and gonadosomatic index estimation. Length, height, and width were measured, and errors are shown as standard error of means

Shell properties	Maximal Growth		
	Diploid	Triploid	<i>P</i> -value
Length (mm)	3.88 ± 1.14	5.82 ± 1.58	0.34
Height (mm)	1.46 ± 0.48	2.36 ± 0.38	0.17
Width (mm)	2.13 ± 0.61	3.36 ± 0.96	0.30

Data are shown as mean (± standard error of means).

Except on July, and only on CI results, no difference between diploid and triploid mussels was observed for both indexes based on dry mass (CI and GSI, Figure 23). Absence of interaction between ploidy level and time was also noted for each index, but time effects were observed with 30% decrease of CI in September followed by stable values and high temporal variability (until over 50% decrease in September for diploids) between sampling times for GSI (Figure 23).

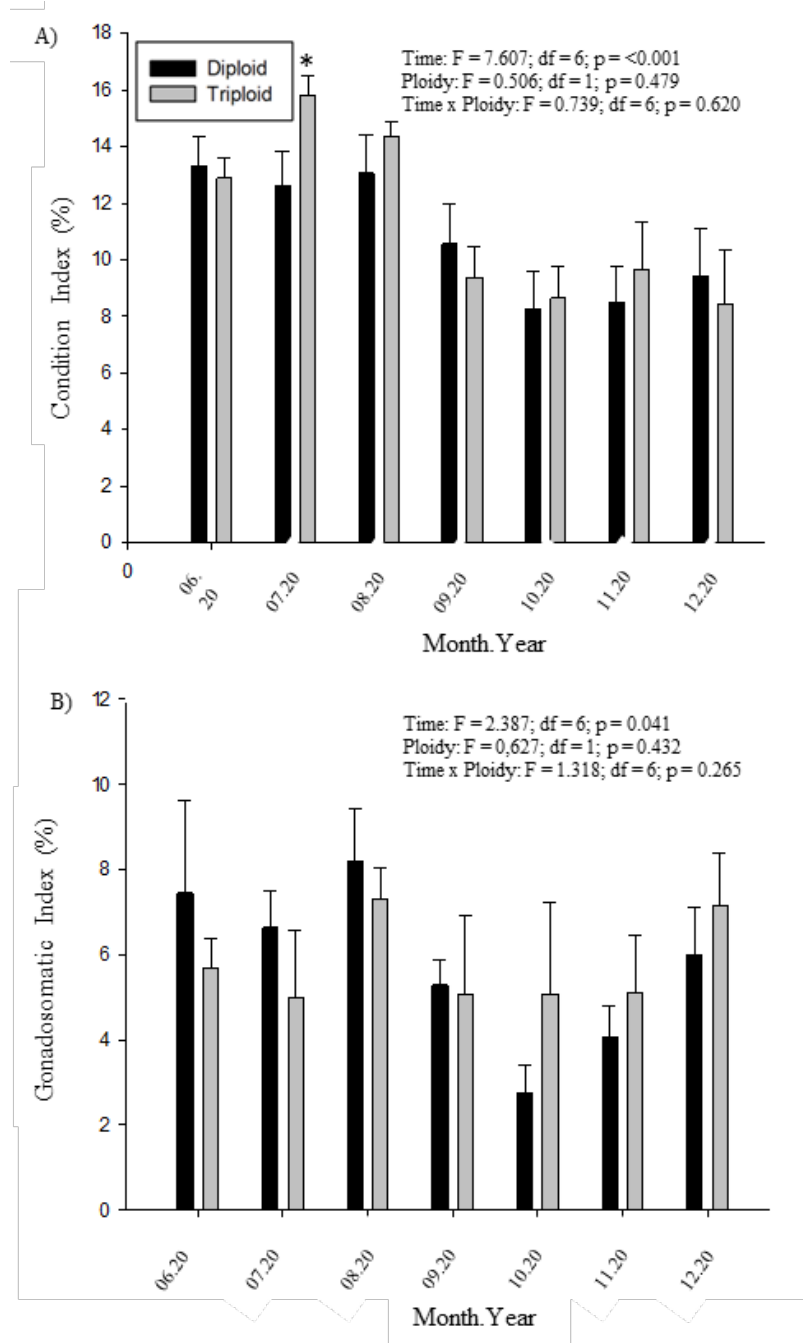


Figure 23 : Condition and gonadosomatic indexes of < 30 mm diploid and triploid mussels conditioned for investment into gametes production over 6 months. A) Condition index. B) Gonadosomatic index. Mean \pm standard error of means

In August and December, few mussels were characterized by differentiated gametes, but only at early developmental stage. Majority of gametes in both diploid and triploid mussels were at the undifferentiated developmental stage (Annexe II) and sex could not be determined. No GVF differences were observed between diploids and triploids in August ($t = -0.904$; $df = 8$; $p = 0.392$) and December ($t = 0.504$; $df = 5$; $p = 0.636$). The maximal mean gonad volume was observed in mussels sampled in August with a gonad volume of $30 \pm 4\%$ of the total gonad volume. A reduction of the gonad volume was measured in December in both groups with a mean gonad volume of $14.5 \pm 4\%$.

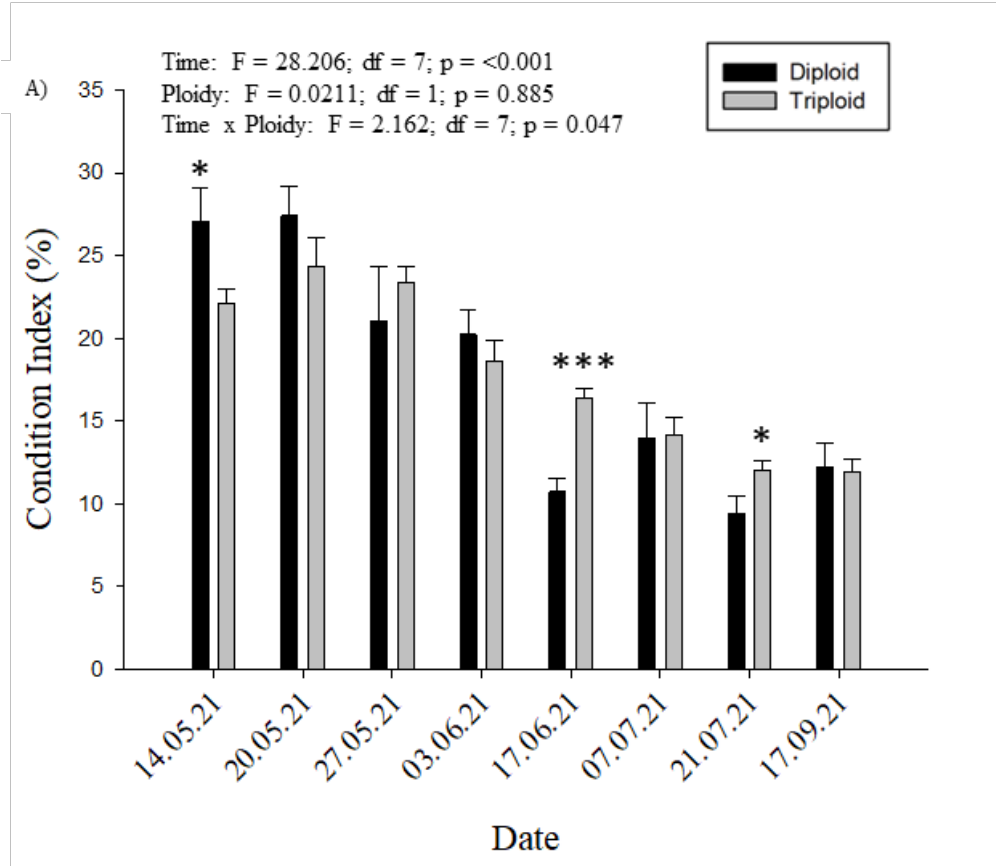
3.5.2 > 50 mm mussels' cohort

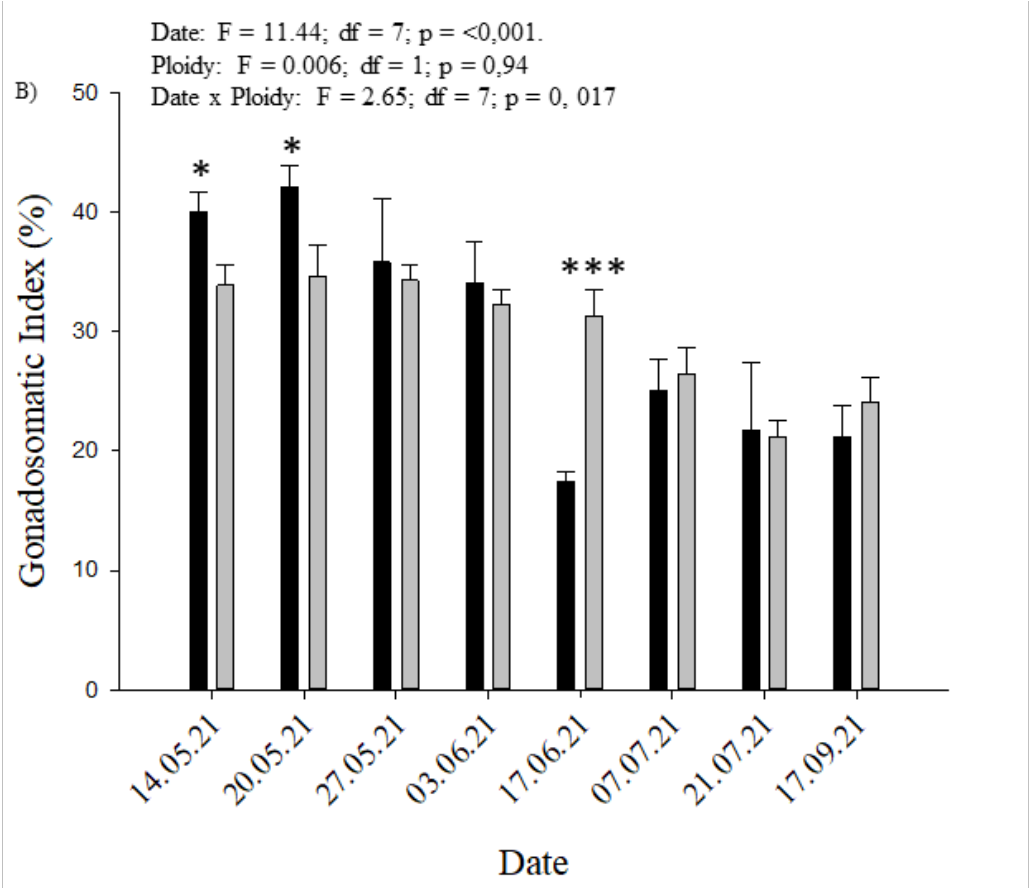
CI results were characterized by interactions between ploidy level and time (Figure 24A). Differences between triploids and diploids were observed for 3 dates, (mid-May, mid-June and mid-July). In mid-May, diploid mussels showed higher condition index than triploids, while results were inverted in mid-June and mid-July with higher values for triploid mussels (Figure 24A). Furthermore, while the condition index of diploid mussels fluctuated during the sampling period, the CI of triploid mussels only showed a slight but regular decrease through the experiment.

GSI index results showed an interaction between ploidy level and time (Figure 24B). In these > 50 mm mussels, diploids showed higher GSI than triploids, but only at two dates in May (Figure 24B). Also, on the 17th of June, a significant drop of the GSI was observed, but only in diploid mussels. From this date, a slight increase occurred in the GSI of diploids, while GSI of triploids slowly decreased. In this experiment, GSI of diploid mussels ranged from 17% to 42%, while GSI of triploid mussels ranged from 21% to 35%.

GVF differed according to ploidy level and sampling time, without interaction between both factors (Figure 24C). Tissues collected on 20 May and 17 June, with the highest and lowest GSI values respectively, showed higher gonad volume in diploid mussels compared to the triploids in June, with gametes occupying 75% of the volume of the gonads (GVF, Figure 24C and Annexe II). On 20 May, gametes from diploid mussels were at a full maturity

stage while triploid gametes showed a medium/advanced developmental stage (Figure 25). Moreover, from 14th of May to the 17th of June, the GVF of diploids was significantly reduced from 88% to 40%, respectively (Figure 24C) and the gonads were almost empty (Annexe III), showing evidence of recent spawning events (Figure 25). Triploid mussels showed slight GVF reduction with values decreasing from 68% to 52% for the same period. No evidence of spawning was observed in triploids (Figure 25) and gonads showed signs of atresia (Annexe III). The higher GVF in diploids at mid-May was visually observable during the dissection, as diploid mussels showed full and colorful gametes, while triploid mussels were characterized by poorly developed gonads and paler gametes (Figure 26). Following the spawning event observed in diploid mussels in mid-June, GVF increased rapidly (7 July) and considerably to reach values over 75% resulting in higher GVF than in triploid mussels. This increase was followed by continuous GVF decreases in diploid mussels until the end of the experiment. Triploid mussels showed only a constant and slow GVF reduction all along the experiment and were characterized by lower inter-individual variability compared to diploids.





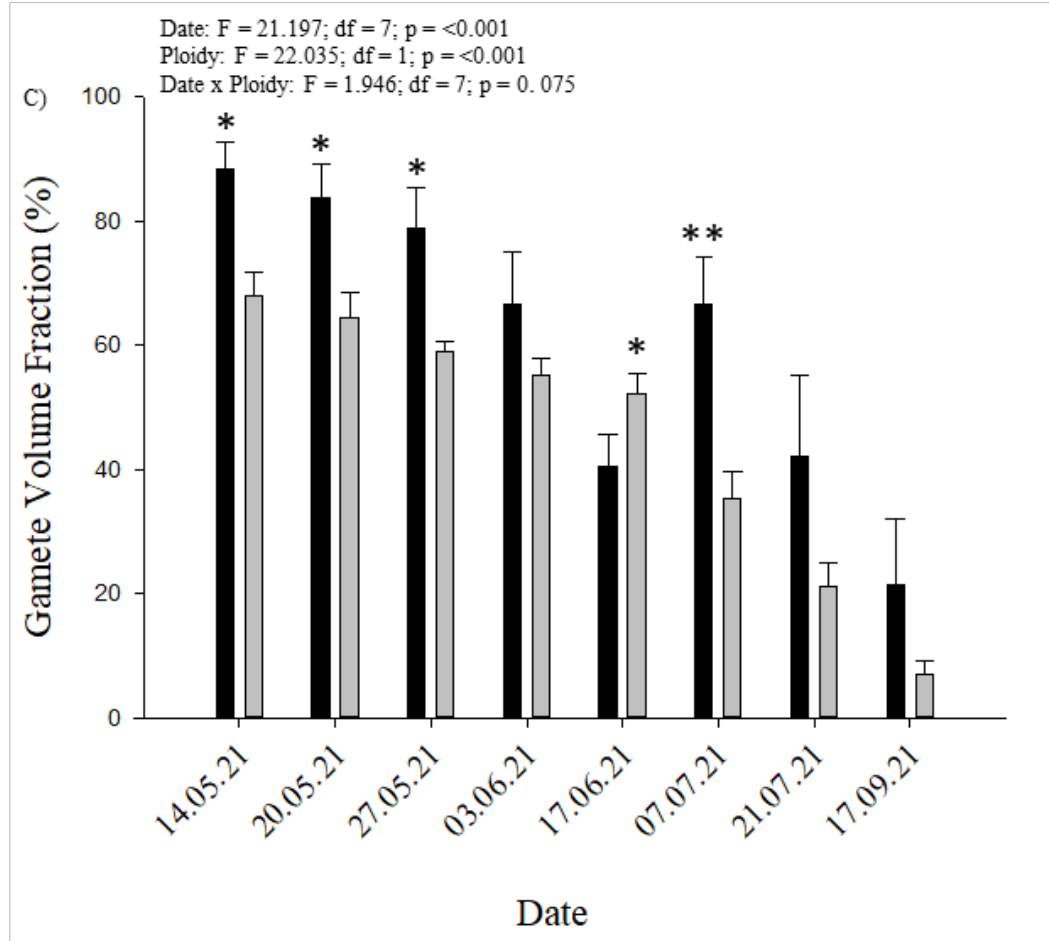


Figure 24 : Reproductive investment and condition index of > 50 mm diploid and triploid mussel from Prince Edward Island at multiple time points from May 2021 until end of September. A) Condition index of > 50 mm cohort. B) Gonadosomatic index of > 50 mm cohort. C) Gonad volume fraction of > 50 mm cohort. Black bars represent the GSI mean of diploids, while grey bars are the GSI mean of triploid. Mean \pm standard error of means

Histological analyses of gonads development clearly indicated the absence of gametes maturity in triploid mussels. Stage of development in diploid gametes was always more advanced than in triploids (Figure 25). Also, while evidence of spawning events was observed in diploid mussels at multiple dates through the experiment, no spawning event was observed in triploid mussels. In this experiment, the highest level of gamete maturation in triploid mussels was the advanced stage with, in some rare cases (around 10% of triploid

mussels), signs of beginning of spawning without full spawn. As for GVF results, diploid mussels showed higher interindividual variability in terms of developmental stage at the same sampling date compared to triploids. Thus, within a same sample, individual diploid mussels could be at different developmental stages with some mussels having spawned, others being at restoration or at a less advanced stage of development. Such variations were not observed in triploid mussels which seemed to be more coordinated in terms of developmental stage (Figure 25). Finally, the sex ratio was compared between diploid and triploid mussels. Overall, 48% of diploids used in this experiment were males and 52% females, respecting the 1:1 sex ratio. However, all triploid mussels were males indicating a strongly biased sex ratio.

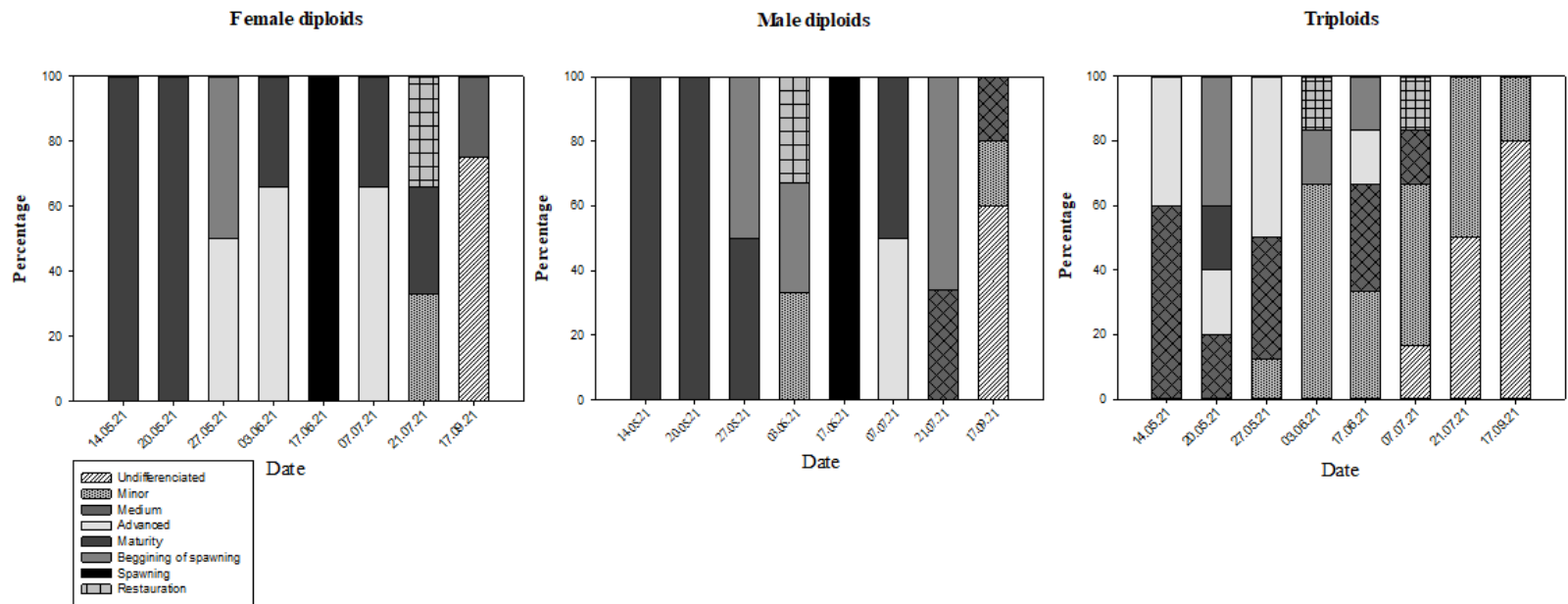


Figure 25 : Comparison of gametes developmental stages in > 50 mm cohort of diploid and triploid mussels sampled at multiple timepoints during their spawning season from May 2021 until end of September 2021 in Prince Edward Island



Figure 26 : Dissection of a diploid and a triploid mussel harvested on 20.05.21 on Prince Edward Island. Left: diploid mussel with a mantle full of gametes with bright orange colors. Right: triploid mussel with an emptier mantle and showing paler and browner colors

In diploid mussels in which spawning was induced by thermal shock, 30% of the mussels spawned with half of the spawning mussels being females and half being males. In triploid mussels, only 15% of males spawned. The sperm of the triploid males had low motility and low spermatozoid concentrations with mean values of 10^5 cells mL^{-1} , comparatively to 10^7 cells mL^{-1} in diploid mussels. The sperm of triploid males was then used to fertilize eggs of diploid females and despite its low motility and spermatozoid concentration, sperm of triploid mussels was still able to fertilize eggs. Fertilized eggs were treated with 6-DMAP to inhibit the extrusion of their second polar body to produce tetraploid mussels. Although viable first stage larvae were obtained, all D-shaped larvae died within one-week post-transformation from trochophore to D-shaped larvae.

3.6 DISCUSSION

The main objective of this study was to compare the reproductive investment of diploid and triploid mussels, using different metrics in < 30 mm and > 50 mm mussels. For both

ploidy groups, no important investment in gamete development was observed in < 30 mm mussels without difference between triploids and diploids, with maximum GSI values of 8% obtained in August. Histological analyses in diploid and triploid juveniles confirmed the GSI results observed previously, as gametes from most mussels of both groups were still at an undifferentiated stage and only few were at early developmental stage. This confirmed that through the whole laboratory experiment, neither < 30 mm diploid nor triploid mussels invested massively into gametogenesis.

However, results were completely different for the > 50 mm mussels, as diploid invested largely in reproduction. At the beginning of the experiment in May 2021, diploid mussels had significantly higher GSI than triploids, suggesting higher reproductive investment. On 17 June, GSI of diploid mussels dropped considerably suggesting the occurrence of a massive spawning event confirmed by histological results. GSI results on triploid mussels indicated that no spawning event occurred in this mussel group and reproduction investment was lower, GVF remaining lower in triploids than in diploids. These patterns were also confirmed by the CI results, the higher dry meat weight/shell weight ratio observed in diploid mussels in May was probably related to a higher content of gametes compared to triploids. The massive drop of CI observed in mid-June seems related the spawning of the diploid mussels (Cartier et al 2004, Duinker et al. 2008). Furthermore, the CI of triploid mussels did not show drastic reduction but instead a slight but regular decrease through the experiment. This regular reduction could be due to two phenomena. First, triploid mussels resorbed their gametes from May to September, thus decreasing their mantle weight, reducing their CI. Krampah et al. (2016), observed a correlation between low CI and gametes' resorption/redevelopment in the brown mussel *Perna perna*. Second, the reduction of the CI could be linked to regular growth of triploid mussels.

Contrary to what would be expected, results showed that both diploid and triploid mussels had relatively high GSI (> 30% in both groups) until June. This suggests that triploid mussels invested energy into the production of gametes. Gametes' production has been observed in other triploid bivalve species and Jouaux et al. (2010) observed that triploid

oysters *Crassostrea gigas* could be divided into two major gametogenic paths based on their gonadal development. Alpha (α) pattern was attributed to triploid oysters that were able to produce a significant number of gametes and that did not show locking events such as clear cytoplasmic areas, condensed chromosomes, or retracted nuclei. Beta (β) pattern was attributed to oysters producing only few gametes with condensed chromosomes. They suggested that gametogenesis was locked in oysters from β pattern, rather than delayed. We suggest that *Mytilus edulis*, triploid mussels could tend to show an α pattern, as their gonad volume at the beginning of the experiment can reach up to more than 60% of the total volume. However, gametes of triploid mussels never reached the stage of full maturity, being blocked or ‘‘locked’’ at inferior stages. This locking of gametes development seems to be attributable to a β pattern. The developmental stage of gametes was also delayed compared to diploid, supporting evidence of a β pattern. Similar observations have been made by Brake et al. (2004) with triploid mussels producing many spermatocytes in their gonads but no mature spermatozoa. It was suggested that triploid gametes could not complete their meiosis and were somewhat blocked in the middle of it (Brake et al. 2004, Kiyomoto et al. 1996, Jouaux et al. 2010). Dheilily et al. (2014) compared the gonad transcriptome of diploid and triploid oysters (*Crassostrea gigas*) and suggested the existence of epigenetic mechanisms involved in reduction of cell division in triploid gonads in oysters.

With the absence of spawning in triploid mussels, we observed GVF reduction that seems to be related to gamete resorption as suggested by signs of atresia that were observed on histological slides. Contrary to GSI and GVF in diploid mussels characterised by important intensity of variations during the reproductive season, triploid mussels showed constant slight temporal GSI and GVF reduction until the end of the experiment with GVF values below 10%. Triploids never showed evidence of massive spawning as observed in diploids. Such results confirm the hypothesis of gametes resorption by triploid mussels. Jeung et al. (2016) observed similar resorption with triploid *Crassostrea gigas*. The resorption of gonads observed in this study tends to suggest that although triploid mussels produce gametes during the spawning season, they would have more energy available at the end of the season as they recover a part of their energetic expenses through the resorption of

the gametes. Thus, the production of gametes could serve as energy storage in triploid mussels. Resorption of gametes has already been observed in bivalves and occurs when the conditions are unfavorable, like during starvation (Lubet et al. 1987 cited in Steele and Mulcahy 1999). The gamete resorption can then be used to fulfil the basal metabolic needs of the organism (Pipe 1987, Chung et al. 2007, Steele and Mulcahy 1999). As most of the energy involved for gametogenesis should be recovered, triploid mussels should also avoid the post-spawning metabolic weakening observed in mussel cultures (Tremblay et al. 1998, Myrand et al 2000, Lachance et al. 2008). Therefore, we hypothesised that triploid mussels would have higher post-spawning survival than diploids, resulting in less loss for mussel farmers. Also, triploid mussels should resume their growth sooner as they could use the energy store and resorbed their gametes, giving them a growing advantage compared to diploids. Both aspects would result in higher production efficiency for triploid mussels after the first spawning season. Furthermore, the lower interindividual variability observed in CI, GSI and GVF index in triploid mussels suggest more stable productivity for mussel farmers and possibility to realize better predictions regarding their production.

Studies have shown that triploidy in bivalves can result in altered sex ratio (Brake et al. 2004, Kiyomoto et al. 1996, Qin et al 2020). Alteration of the sex ratio was species dependent. Brake et al. (2004) observed a strong biased sex ratio in favor of males with only males being present in triploids of *Mytilus edulis*, except for one putative female. Studies on *Mytilus galloprovincialis* also showed strong bias in favor of males (Kiyomoto et al. 1996). Allen et al. (1986a) showed that the sex ratio of triploid *Mya Arenaria* was strongly biased in favor of females counting for 77% of triploids with presence of oocytes and another 16% being female-like. However, other species such as *Agropecten purpuratus* (Lohrmann and Brand 2005), *Crassostrea gigas* (Allen Jr and Dowing 1990, Normand et al. 2008) and *Haliotis rubra* (Liu et al. 2009) did not elicit biased sex ratio. In this study, 100% of triploid *Mytilus edulis* were males, confirming Brake et al. (2004) study. Sexual determination in bivalves seems to be determined not only by genetic factors, but also by environmental factors (Breton et al. 2018, Coe 1943, Chávez-Villalba et al. 2011). Exogenous steroids (Wang and Croll 2004, Croll and Wang 2007), pollution (Park et al.2015, Gagné et al 2003),

temperature (Teaniniuraitemoana et al. 2016), and food availability (Stenyakina et al. 2010, Teaniniuraitemoana et al. 2016, Chávez-Villalba et al. 2011) can alter the sex ratio in bivalves. Thus, it may be suggested that alteration of the sex ratio could be, at least partially, due to the conditions used for the induction of triploidy, as exogenous steroids, temperature and pollutants are able to change the sex ratio in bivalves. In this study, as well as in Brake et al. (2004), 6-DMAP was used to induce triploidy in *Mytilus edulis* and in both this resulted in a 100% production of males. However, the use of 6-DMAP to produce triploid *Agropecten purpuratus* (Lohrmann and Brand 2005) and *Haliotis laevigata* (Dunstan et al. 2007) showed no alteration of the sex ratio compared to diploids, suggesting that some intra-specific factors are involved in sex determination in triploids. Food availability is a major factor that can affect the determination of sex ratio. It has been observed that when bivalves are in low food availability conditions, there is a shift in the sex ratio in favor of males, and the energetic deficit could be the cause of female-to-male sex change (Teaniniuraitemoana et al. 2016, Stenyakina et al. 2010). It is known that production of males' gametes is less energetically costly than the production of eggs (Russell-Hunter 1979 cited in Breton et al. 2018 and in Teaniniuraitemoana et al. 2016), therefore triploid mussels could spare some energy by shifting their sex ratio toward males. In this regard, we previously observed that triploid juvenile mussels tend to have higher scope for growth as well as higher clearance rate (Osterheld et al. 2022, submitted), thus, it could be possible that the energetic needs of triploids are higher during their first live stages, resulting in the selection for male genotype. However, we cannot exclude the fact that genetic factors could play a significant role in the determination and alteration of the sex ratio in triploids. Some studies have suggested the presence of sexual determination alleles (Hedrick and Hedgecock 2010, Guo et al. 1998), with the possibility of a male dominant allele (Guo et al. 1998). Thus, this sex determining alleles could play a role in the biased sex ratio observed in certain bivalve species.

Although no massive spawning was observed in triploid mussels, a few triploids showed signs of beginning of spawning. Artificial induction of spawning of mussels sampled in mid-May showed that triploid sperm was of low quality, with low motility and low concentration compared to diploids. Similar observations were made by Suquet et al. (2016)

on *Crassostrea gigas*, as their results showed that the percentage of motile and swimming sperm was higher in diploids than in triploids. Their study also demonstrated that triploid sperm was 100 times less concentrated than diploid sperm with 5×10^9 spermatozoa and 344×10^9 spermatozoa, respectively. One reason to explain the lower spermatozooids motility and concentration in triploid mussels could be the lower developmental stage of the gonads. Indeed, gonads were never fully matured in triploids. Komaru et al. (1994) compared the sperm of diploid and triploid oysters (*Crassostrea gigas*) and they observed that spermatozoa were similar in diploids and triploids, except that spermatozoa of triploids were bigger, with larger size of the head, acrosome and length of flagella. However, the size of mitochondria in triploids was not altered. Mitochondria play a major role in sperm motility (Mita and Nakamura 1998, Boulais et al. 2019), thus, Komaru et al. (1994) suggested that triploid sperm could have reduced motility compared to diploids due to their bigger size. It is probable that spermatozooids of triploid mussels are also bigger which could, at least partially, explain their reduced motility. We have demonstrated the possibility to fertilize diploid eggs with the sperm collected from triploid mussels despite low spermatozooids motility and concentration. However, larvae produce using triploid spermatozoa died within a few days post-fertilisation.

3.7 CONCLUSION

This study showed that while triploid mussels do invest a part of their energy in the production of gametes, their fertility was significantly reduced compared to diploid mussels. Furthermore, triploids showed signs of gametes atresia suggesting a possible resorption of the gametes and, thus possible energy recovery. Therefore, triploid mussels may be less weakened by spawning activities leading to lower post-spawning losses. Sex ratio of triploid mussels was strongly altered with only male being present in progeny which is of great interest and could open new horizons for mussel farming. Further work should be performed to compare the post-spawning recovery of triploid and diploid mussels, as well as the potential energetic recovery through gametes' resorption in triploids. Also, future studies should investigate the potential use of all male triploid mussels' production.

3.8 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ressources Aquatiques Québec Research Network [Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies, no. 2014-RS-171172] and Atlantic Aqua Farms in partnership with the Department of Fisheries and Oceans of Canada (Aquaculture Collaborative Research and Development Program) [Project 17-G-03]. The authors wish to thank N. Gauthier, C. Lagarrigue, and F. Perron for their technical support. K.O., R.T., and C.A. are members of Ressources Aquatiques Québec.

CHAPITRE 4

COMPARAISON DE LA PRODUCTION, DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE ET DE LA COMPOSITION DES FIBRES DE BYSSUS DE DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES DE *MYTILUS EDULIS*

4.1 RÉSUMÉ

La production ainsi que les performances mécaniques des fibres de byssus peuvent varier entre les moules de petite taille et celles de taille commercialisable, ce qui peut affecter leur force d'attachement ainsi que leur résistance au détachement. Une étude précédente a démontré des différences significatives dans la production et les performances mécaniques des fibres de byssus chez les diploïdes et triploïdes de *Mytilus edulis* <30 mm (Osterheld et al. 2022 soumis). Cependant, cette étude n'a pas analysé la composition en acides aminés et métaux des fibres de byssus. Dans la présente étude, nous avons comparé la production de fibres de byssus, leur performances mécaniques, et leur composition et structure chez des moules de taille commerciale (>50 mm). Les taux métaboliques, de filtration, ainsi que le potentiel de croissance ont aussi été calculés. Nos résultats ont montré une augmentation de la production de fibres de byssus de 25% avec des propriétés mécaniques augmentées chez les moules triploïdes. La composition et la structure en acides aminés ne diffère pas entre les deux groupes. La composition en métaux différait significativement entre les deux groupes pour le B, Cu, Sr, Os, W, Ag, Nb, Bi, et Tl, qui étaient tous significativement plus abondant chez les diploïdes. Les moules triploïdes conditionnées à 20 °C ont montré de plus forts taux de filtration, de potentiel de croissance, et de force de brisure des valves que les diploïdes avec une augmentation de respectivement, 48%, 57%, et 40%.

Cet article, intitulé « *Comparison of byssal threads production, mechanical behavior, and composition in commercial size diploids and triploids of Mytilus edulis* », est prévu pour une soumission dans le journal *Aquaculture*, mais n'a pas encore été validé par l'ensemble des co-auteurs. En tant que premier auteur, j'ai contribué à l'essentiel de la recherche sur l'état de la question, au développement de la méthode et à l'exécution des tests de performance. Les

Professeurs Réjean Tremblay, José Babarro, ainsi que les Docteurs Luc Comeau, Tiago Hori, et le maître John Davidson ont fourni l'idée originale, ils ont aidé à la recherche sur l'état de la question, ainsi qu'au développement de la méthode et à la révision de l'article. Le Professeur Réjean Tremblay a également fait les mesures de potentiel de croissance. Le Professeur Alexandre Arnold a fait les analyses RMN et a également aidé à la recherche sur la question et la révision de l'article. Le Professeur Christian Pellerin a aidé à la recherche sur la question ainsi qu'au développement de la méthode et à la révision de l'article. La Professeure Isabelle Marcotte a aidé à la révision de l'article. Une version abrégée de l'article a été présentée à la réunion annuelle de *Ressources Aquatiques Québec en 2022*. Certains résultats présents dans cet article ont également été présentés lors de la conférence de l'*ACFAS* en 2022, de la conférence de *Aquaculture Association of Canada* en 2022, et de la conférence internationale de l'*AMMR4* en Angleterre.

COMPARISON OF BYSSAL THREADS PRODUCTION, MECHANICAL BEHAVIOR, AND COMPOSITION IN COMMERCIAL SIZE DIPLOIDS AND TRIPLOIDS OF *MYTILUS EDULIS*

Kevin Osterheld ^{a*}, John Davidson ^b, Luc A. Comeau ^c, Tiago Hori ^d, José M.F. Babarro ^e,
Isabelle Marcotte ^f, Alexandre Arnold^f, Christian Pellerin ^g and Réjean Tremblay ^a

^a Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada. Kevin.Osterheld01@uqar.ca; Rejean_Tremblay@uqar.ca

^b Fisheries and Oceans Canada, Gulf Region Sector Office, 165 John Yeo Drive, Charlottetown, PEI, C1E 3J3, Canada. John.Davidson2@dfo-mpo.gc.ca

^c Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, 343 University Avenue, Moncton, NB, E1C 9B6, Canada. Luc.Comeau@dfo-mpo.gc.ca

^d Atlantic Aqua Farms, 918 Brush Wharf Rd, Vernon Bridge, PEI C0A 2E0, Canada., tiago.hori@atlanticaquafarms.com

^e Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC, Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain. jbabarro@iim.csic.es

^f Département de chimie, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada, marcotte.isabelle@uqam.ca, arnold.alexandre@uqam.ca

^g Département de chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada. c.pellerin@umontreal.ca

4.2 ABSTRACT

Byssal production as well as the mechanical performances of byssal threads can vary between small and commercial size mussels, therefore affecting their attachment strength and resistance against fall-off. A previous study demonstrated significant differences in byssal production and mechanical performances between diploids and triploids in <30 mm *Mytilus edulis* (Osterheld et al. 2022, submitted). However, this study did not look at the byssal compositions in amino acids and metals. In the present study, we compared the production of byssal threads, their mechanical performances and the composition and structure of commercial size mussels (>50 mm). The metabolic rate, filtration rate and scope for growth were also calculated. Our results showed an increase of byssal threads production of 25% with significantly improved mechanical properties in triploid mussels. The amino acids composition and structure of byssal threads did not differ between both groups. The metal composition was significantly different between both groups for B, Cu, Sr, Os, W, Ag, Nb, Bi, and Tl, which were all significantly more abundant in diploid threads. Triploid mussels conditioned at 20 °C showed higher clearance rate, scope for growth and valve breaking strength than diploids with an increase of respectively, 48%, 57%, 40%.

Keywords: Mytilus edulis, byssus, metal, scope for growth, VO₂

4.3 INTRODUCTION

Since 1990, mussel (*Mytilus edulis*) aquaculture is flourishing and represent important economic incomes for coastal populations. In 2019, Canada produced more than 26'000 tons of *Mytilus edulis* worth of 43 million Canadian dollars (Statistics Canada 2019). However, important quantities of mussels are lost due to fall-off during their production, as demonstrated in Magdalen Island with up to 30% of losses (Bourque and Myrand 2006). More recently, Comeau et al. (2017) showed that up to 45.8% of mussels growing on socks can be lost between the moment they were socked until their harvest. Their study also indicated that mussels' juvenile stages are extremely sensitive to fall-off as 74.6% of mussels' seed were lost from collectors between their settlement until reaching their socking size (20 mm). These results supported their previous study showing 89% loss of mussel seed over 2 years (Comeau et al. 2015). Fall-off of mussels represents important economic losses for mussel farmers, as well as poor valorisation of environmental resources in term of phytoplankton consumption.

While multiple factors can result in fall-off, such as environmental conditions, wave effects and turbulence, predation, handling of mussel lines, self-thinning, decay of byssal threads due to elevated water temperatures, biofouling, reproductive status of mussels (Lachance et al. 2008, Alfaro 2006, Dolmer and Svane 1994, Calderwood et al. 2014, Fréchette 2012, South et al. 2022, Comeau et al. 2015, Young 1985, Rupp and Parsons 2004, Selin and Vekhova 2004, Seguin-Heine et al. 2014, Babarro and Reiriz 2010, Babarro and Carrington 2013); mussels' fall-off globally occurs once the attachment strength, procured by byssal threads, is exceeded by the stress applied on the mussel resulting in threads breaking and mussels' detachment (Gagnon 2019, Carrington et al. 2015). The attachment strength is itself dependent on multiple intrinsic factors such as the number and quality of the threads (Smeathers and Vincent 1979, Bell and Gosline 1996, Bell and Gosline 1997), the threads diameter (Bouhleb et al. 2017, Hennebicq et al. 2013), and the amino acids and metal threads' composition (Hedlund et al. 2009, Seguin-Heine et al. 2014). Mussel spawning can result in lower byssogenesis and reduced byssal threads production (Babarro and Reiriz 2010) or byssus diameter (Hennebicq et al. 2013) decreasing the attachment strength between up to 40% (Lachance et al. 2008, Seguin-Heine et al. 2014).

Triploidy in bivalve has been widely studied to produce enhanced stocks with reduced reproductive investment resulting in faster growth (Allen Jr and Downing 1986a, b, Allen Jr and Downing 1990, Brake et al. 2002, Brake et al. 2004) or in better immune system (Nell 2002, Duchemin et al. 2007). However, to our knowledge, no study has measured the impact of triploidy on the attachment strength of bivalves, except our previous study on small (<30 mm) mussels (Osterheld et al. submitted 2022). In this study we demonstrated that < 30 mm triploids of *Mytilus edulis* produced up to 65% more byssal threads compared to diploids of the same size range. Although the diameter of both diploid and triploid threads was similar, our study showed that byssal threads of triploid elicited 43% higher young modulus compared to diploid suggesting that triploid threads would have better resistance against deformation.

It is known that bivalves' size and developmental stage can alter the byssal production and byssal threads properties. Babarro and Carrington (2013) showed that mussel size was correlated with the thickness and byssogenesis of byssal threads with smaller mussels producing thinner and higher number of threads than bigger ones. Therefore, attachment strength as well as threads' production might be highly variable between mussels of different size ranges. Also, mussels from our previous study (<30 mm) had low reproductive investment, while diploid mussels > 50 mm are expected to be sexually mature and invest massively in reproduction (chapter 3). With triploid mussels having reduced fertility, it would be expected that the different reproductive investment between both groups would affect their byssal production and properties.

Furthermore, studies on triploid bivalves already showed the possibility that size, age, or developmental stage could alter their metabolic needs and scope for growth. For instance, the study of Kesarcodi-Watson et al. (2001) on oysters (*Saccostrea commercialis*) showed that the clearance rate of diploid and triploid juveniles decreased with increasing concentrations of food, while in adults, the clearance rate decreased significantly only for triploid oysters, suggesting less energy spent for respiration in adult triploid compared to diploids. Moreover, their result of scope for growth (SFG), showed that adult triploid oysters had 79% more energy available for growth and reproduction than the diploids.

All together, these studies suggest that adult triploids *Mytilus edulis* could have different byssal production with different threads properties than their juvenile counterpart compared to diploid mussels. This byssal threads difference could result from different metabolic needs and

efficiency of their energetic uses. We test the hypothesis that adult triploid *M.edulis* mussels had more energy to invest in byssogenesis than diploids producing byssal threads with different mechanical and composition properties estimation by their diameter, amino acids, metals and molecular composition. The objectives were to compare the respiration rates, clearance rate, absorbance efficiency and scope for growth of adult diploids and triploids, in relation with byssogenesis and byssal threads characteristics.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Experimental design

In end of May 2019 in Saint Peters Bay (46° 26' 30.7'' N, 62° 44' 51.3'' W) in Prince Edward Island, Canada, two-year old culture mussels *Mytilus edulis* (shell length 50-60 mm) were harvested for spawning and production of triploid mussels as described in Osterheld et al. (2021). Briefly, fertilization of oocyte/spermatozoids was performed at a ratio of 1:10 and the fertilization was continuously monitored. At 17 minutes post fertilization, when most of the eggs had extruded their first polar body, larvae were treated for triploidy induction by bathing fertilized eggs in a bath of 6-dimethylaminopurine at 400 µM in UV ultra-filtered seawater (0.2 µm) for 10 min at 18 °C. Then, eggs were washed with UV ultra-filtered seawater and reared in static tanks at 18 °C until reaching D-shaped stage. Then, treated larvae were reared in 60-L conic tanks at 18°C in UV ultra-filtered water with upwelling flow-through system and fed continuously at 30'000 cells/minute with a mixture of algae containing *Pavlova lutheri* (CCMP 459), *Nannochloropsis oculata* (CCMP525), *Chaetoceros neogracilis* (CCMP1317), *Tisochrysis lutea* (CCMP 1324) and *Tetraselmis suecica* (CCMP 904) at a ratio of 1:1:1:1 equivalent biomass according to culture algal dry weight, as described by Bassim et al. (2014). At pediveliger stage, mussels were transferred in downweller system with similar condition until juvenile stage over 5 mm. Every 48h water temperature was lowered by 2°C until it reached 10 °C, which was the temperature in Georgetown harbors. At this point, mussels were transferred in a Portable Aquatic Laboratory at Georgetown harbor, PEI. There, the mussels were in natural water conditions thanks to flow through water system, while avoiding weather (wave, wind) and predators (crab, ducks, starfish) risks.

At the end of summer 2021 after spawning events, once they reached < 50 mm, mussels were sent to the aquicole station at Pointe-au-Père near Rimouski, Québec, Canada. There, mussels' ploidy was tested through flow cytometry with CytoFLEX (Beckman Coulter, IN, USA) as described in Osterheld et al. (2021, 2022). Mussels that were confirmed as diploids were used as control mussels.

4.4.2 Byssal production

13 diploid and 11 triploid mussels were used for the production and harvest of byssal threads. The production of byssal threads and their strength were compared under standardized conditions of feeding regime, temperature light, flow speed, and salinity. The induction of the production was carried out as described in Osterheld et al. (2022) in a racetrack recirculating flume with an experimental section of 0.91 m in length and 0.45 m in width. The flume was filled with seawater filtered at 10 µm with a controlled temperature of 18 ± 0.7 °C and salinity of 27 ± 0.5 PSU. Every day mussels were fed with one pulse-dose of 60'000 phytoplankton cells/mL with the previously described species (CCMP 1324, CCMP1317, CCMP 459, CCMP 525). The mussels were fixed individually to the vertical side of an L-shaped glass, using cyanoacrylate glue (Locite Gel Control Super Glue, Henkel Consumer Adhesive, Avon, NY, USA). The mussels were fixed 5 to 10 mm above the horizontal glass with their posterior end facing upstream. The mussels were then randomly placed, parallel to each other but separated by 5 cm, in the middle of the experimental area, facing the incoming flow. For 72h, mussels were facing unidirectional current that was increase with a maximal acceleration of 1 cm s^{-1} and maintained at 10 cm s^{-1} . After the 72h exposure, the L-shaped glasses were collected with mussels on them and byssal threads were counted and their distal parts were harvested. The byssal distal parts were then stored at 4 °C in open plastic bags. The byssal threads were split for individual mechanical analyses as well as for byssal composition comparison.

4.4.3 Mechanical properties

As mussels had to be kept alive, only the distal part of the byssal threads was used for mechanical properties analyses. Prior to mechanical measurements, byssal threads were rehydrated overnight in artificial seawater at 27 PSU using Instant Ocean salts (Aquarium Systems, Inc • OH

44060 USA) at 4 °C. 110 diploid and 105 triploid distal threads (5 to 6 threads per mussel) were used for the determination of mechanical properties.

As described in Osterheld et al. (2022), the diameter of distal section of each individual thread was measured under an optical microscope (Olympus BX41, Japan, with magnification of 200x) with the software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Canada). Measurement of each thread was randomly performed on four sections of each distal threads. Mean of the sum of all diploid and triploid distal threads diameter were calculated and compared between the two groups. Furthermore, the diameter of the cuticle of the distal section of each thread was measure using an electronic microscope (Keyence VHX-2000, Digital Microscope, Mississauga, ON, Canada).

A mechanical analyzer (Instron 5465, Norwood, MA, USA) was used to measure the tensile characteristics of distal byssal threads; including the initial Young's modulus, the stress-at-break, breaking force, and strain-at-break, as described in Osterheld et al. (2022). Briefly, the ends of each thread were glued between small sheets of cellulose acetate (5 x 5 mm) using cyanoacrylate gel (Locite Gel Control Super Glue, Henkel Consumer Adhesive, Avon, NY, USA). The glued ends of distal threads were placed between the grips of the mechanical analyzer and extended, until rupture, at a rate of 5 mm/minute. Only threads that broke at their middle or close to the middle were considered valid, while threads breaking at the jaws of the clamps or the ones who slipped, were discarded. The calculation of stress, strain, ultimate force, and Young's modulus were performed as described in Bouhleb et al. (2017) and Osterheld et al. (2022).

The stress (σ) represents the resistance of the thread against an applied load and is calculated as follow:

$$\sigma = F/A \quad (1)$$

where σ is the stress in Pascals, F is the strength in Newtons applied on the thread and A is the cross-sectional area of thread in m^2 .

The relative elongation of the threads under a load is expressed as the strain (ϵ , %) and is calculated:

$$\epsilon = \left(\frac{\Delta L}{L}\right) * 100 \quad (2)$$

where ϵ is the strain (%), ΔL is the length changes under the load, and L is the initial length of the thread.

The initial stiffness of the thread, defined as the Young modulus (E , Pa) was calculated as the slope of the stress-strain curve in the 5-10 % strain range (Bouhleb et al. 2017).

4.4.4 Byssal threads composition

Pools of 100 mg of diploid distal threads and 100 mg of triploid distal threads were grounded separately (Retsch Mixer Mill MM400; Retsch GmbH, Haan, Germany) for 5 min at 30Hz until obtention of a fine powder. The byssal threads powders were then analyzed in triplicates by SPARC BioCentre (SickKids Proteomics, Analytics, Robotics & Chemical Biology Centre, Toronto, Canada) to determine the amino acid composition. The samples were dehydrated in pyrolyzed borosilicate tubes under a vacuum centrifugal concentrator. Then they were exposed to a vapour phase hydrolysis at 110 °C with 6N HCl with 1% phenol for 24h under pre-purified nitrogen atmosphere. After hydrolysis and removal of excess HCl by vacuum, the hydrolyzates were washed with redrying solution. Then the samples were derivatized with phenylisothiocyanate (PITC) at room temperature to produce phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids. The derivatized amino acids were then redissolved in a phosphate buffer and loaded into an autosampler for injection as described by the protocol of SPARC BioCentre (sickkids.ca).

4.4.5 Nuclear Magnetic Resonance

Comparison of the amino acid structural composition of the byssal threads was performed by nuclear magnetic resonance (NMR). All spectra were recorded on a Bruker Avance-III HD spectrometer (Bruker Biospin, Canada) operating at frequencies of 150.86 and 599.90 MHz for ^{13}C and ^1H respectively. The probe used was a 4 mm Magic-Angle Spinning double resonance probe and the spinning frequency was 10 kHz. The ^{13}C spectra were initiated using either a 2 s-long low power irradiation of ^1H followed by a single 90° pulse on ^{13}C , or a 1.5 ms-long cross polarisation from ^1H to ^{13}C . The ^{13}C signal was detected under ^1H TPPM decoupling. The applied radiofrequency fields were always 75 kHz for both ^1H and ^{13}C except during the 2 s long low power irradiation of ^1H (RF=180 Hz) or cross-polarisation during which the ^{13}C radiofrequency field was 65 kHz. The one-dimensional spectra were acquired with a total recycle delay of 5 s (3 s plus 2 s

low power ^1H irradiation for the single pulse spectra or 5 s for the cross-polarisation spectra), an acquisition time of 15 ms, a spectral width of ca. 45 kHz (300 ppm) while 1024 scans were accumulated. The same spectral windows were used for the two-dimensional spectra and the mixing time was 50 ms during which dipolar-assisted rotary resonance (DARR) was established by applying a 10 kHz radio-frequency field on the ^1H channel. 96 transients were accumulated for each of the 256 increments acquired in the indirect dimension. To reduce the total experimental time, the two-dimensional spectra were recorded with a recycle delay of 3 s. All spectra were recorded at room temperature and processed using the MNova software (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain).

4.4.6 Metal composition

The metal composition of byssal thread was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) at the *centre de recherche sur les biotechnologies marines* at Rimouski (CRBM). Prior to the analyses, triplicates of 10 mg of byssal threads were digested in 0.5 mL of HNO_3 (Aristar Plus BDH 87003-261 2,5L lot: 1116100) and 0.5 mL of H_2O_2 (solution sigma aldrich 16911-250mL lot BCBT9332). The samples were heated at 60 °C for 1h. The samples were collected, and the volume was adjusted to 10 mL by addition of Milli-Q water. The samples were then sent to the *Centre de recherche sur les biotechnologies Marines*, at Rimouski, Canada, for ICP-MS analyses.

4.4.7 Physiological and metabolic analyses

Physiological and metabolic analyses were performed on diploid and triploid mussels conditioned at 10 ± 0.1 °C and 20 ± 0.1 °C. Determination of the scope for growth (SFG), oxygen consumption (VO_2), and clearance rate were performed as described in Osterheld et al. (2022). Briefly, food assimilation rate, respiration rate expressed as VO_2 , and clearance rate were measured and used to calculate the scope for growth of diploid and triploid mussels. The scope for growth was calculated as follow:

$$\text{SFG} = A - R$$

where SFG is the scope for growth of dry mussel's mass ($\text{J h}^{-1} \text{g}^{-1}$), R is the energy expended through respiration, and A is the assimilation rate. A is determined as follows:

$$A = C * abs$$

where C is the CR of the individual multiplied by the particulate organic matter times a constant (here 23.5), and abs is the absorption efficiency. R is calculated as follows:

$$R = VO2max \times 20.33$$

$$VO2 \max = DOSlope * (Vr - Va) * 3600/m$$

where $VO_{2\max}$ is the oxygen consumption ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), DOSlope is the rate of the decrease in dissolved oxygen ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Vr is the volume of the respirometer (L), Va the volume of the animal (L), and m is the wet mass of the animal (g) according to the Q-Box AQUA protocol. As excretion represents <5% of the energy budget in most bivalves, it was ignored (Pernet et al. 2008).

4.4.8 Mussel size and shell thickness

Following the physiological measurements, each mussel was dissected to measure the shell and total tissue dry mass (dried at 72 °C for 72 h). The shell length, shell height, and shell width were measured, and the thickness was measured on the left valves with a micrometer (342-371-30 Mitutoyo, Takatsu Ward, Japan) at the highest part of the shell. Valve resistance was measured using a dynamometer and applying strength until the shells break.

4.4.9 Statistical analysis

To compared diploid and triploid mussels, the means \pm standard error of means of every experiment were calculated. The normality and equality of variance were verified by Sigmaplot V12 using Shapiro-Wilk test. When the conditions required for Shapiro-Wilk test could not be obtained, Mann-Whitney Rank sum test was used instead. Following the verification, Student's *t*-tests were applied.

Byssal production was tested on 13 diploid mussels and 11 triploids. Log conversion was performed to pass Shapiro-Wilk's test conditions. Mechanical analyses of byssal threads were performed on 99 diploids and 91 triploids. Log conversion was performed for Young's modulus while square root correction was applied for local peak maximum. Both groups were tested by Student *t*-test. The comparison of amino acids composition and structure in the byssal threads was

performed on duplicates of diploid and triploid mussels, while the measurement of the metal composition was performed on triplicates. Amino acids and metal compositions were compared by permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), designated ANOVA (Anderson et al. 2008), and applied by using PRIMER[®] version 7.0.13 with PERMANOVA+1 add-on (Clarke and Gorley 2015). The PERMANOVA approach was selected to provide analysis of variance in the presence of an unbalanced design and non normal distribution (Anderson and Walsh 2013). In the case of significant interactions, *post-hoc* tests (i.e., a pairwise multiple comparisons routine) were conducted to identify differences among levels within factors. P-values were calculated with 9999 permutations, partial sums of squares (Type III), and Monte-Carlo random draw probability (hereafter “ $p_{(MC)}$ ”) under a reduced model to avoid issues of too few available permutations with small sample sizes (Anderson and Robinson 2003). The difference in concentration of each amino acid and each metal was compared between both groups by Student *t*-test. Analyses of scope for growth, clearance rate, VO_2 , absorbance, valve breaking strength, shell thickness, and size comparison were performed on 15 and 16 diploid and triploid mussels, respectively. Student *t*-test were applied to compare the metabolic and physiological performances of both groups.

4.5 RESULTS

4.5.1 Byssogenesis and mechanical properties

The byssal production of > 50 mm shell length mussels showed that triploid mussels produced 25% more byssal threads than diploids (Figure 27). No difference in byssal diameter was observed between the two groups with diameters of $63.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$. The diameter of the cuticle of diploid and triploid threads were compared and no difference was observed with mean diameters of 8.0 ± 0.3 respectively.

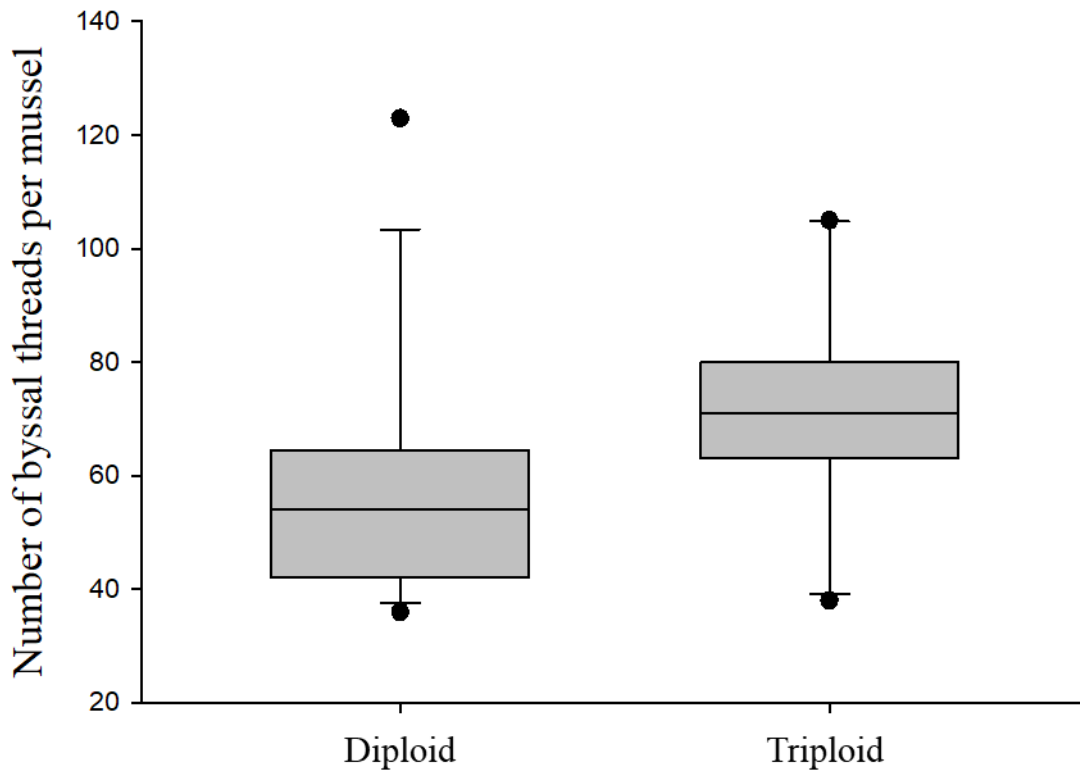


Figure 27. Production of byssal threads by diploid and triploid mussels over three days under hydrodynamic flume conditions of 10 cm s⁻¹; n = 13 diploids and 11 triploids, $t = -1.811$, $df = 22$, one-tail $P = 0.0419$

Tensile mechanical analyses were performed on the byssal threads of diploid and triploid mussels. Results showed that triploid mussel had higher tenacity at yield (N/tex), tensile stress at yield (mm/mm), tensile stress at local peak maximum (Mpa), Young modulus (Mpa), load at yield (N), and local peak maximum (N) (Table 6). The presence of multiple yield points was observed in both groups on 20 and 22% of diploid and triploid byssal threads, respectively.

Table 6. Tensile mechanical measurements of diploid and triploid mussels. T-tests were performed. When Shapiro-Wilk test could not pass, Mann-Whitney Rank sum test was performed instead. Standard errors of means are added next to means of each treatment. Statistical significances are determined through P value, values with * are expressed as one-tail P-value. N = 99 diploid and 91 triploid mussels

Mechanical test	diploid	triploid	P value
Young modulus (Mpa)	229.11 ± 18.89	274.78 ± 25.90	0.0383*
Load at yield (N)	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.033*
Tenacity at yield (N/tex)	0.00095 ± 4.64e-5	0.0011 ± 6.04e-5	0.035
Tensile stress at yield (Mpa)	65.14 ± 4.22	89.37 ± 7.61	0.011
Local peak maximum (N)	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.04*
Tensile stress at local peak maximum (Mpa)	73.05 ± 4.59	95.64 ± 7.81	0.027
Energy at yield (J)	0.0007 ± 7.6e-5	0,0006 ± 4.5e-5	0.887
Tensile strain at yield (mm/mm)	0.72 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.552
Tensile strain at local peak maximum (Mpa)	75.98 ± 3.30	71.81 ± 2.61	0.795

4.5.2 Byssal threads composition

The amino acid composition of byssal threads from diploid and triploid mussels showed, no difference in their composition (Figure 28). Glycine was the most abundant amino acid present in byssal threads and represented 15% of their amino acid content, followed by the aspartic acid and asparagine (Asx) counting together for more than 9% and glutamine and glutamic acid (Glx) with a global value of 8%. Arginine, alanine, and proline content were respectively 8%, 7% and 7% of the amino acids. Together, these amino acids counted for 54% of the total of the amino acid content of the byssal threads. The content of each other amino acid was always lower than 6% of the total amino acids' concentration, such as histidine being 4% of the total amino acids. Unfortunately, L-DOPA and tryptophane content could not be estimated due to lack of byssal material. Furthermore, NMR analyses also demonstrated no difference in peak intensity between both treatments nor did it showed specific peak shifts (As shown in Figure 29).

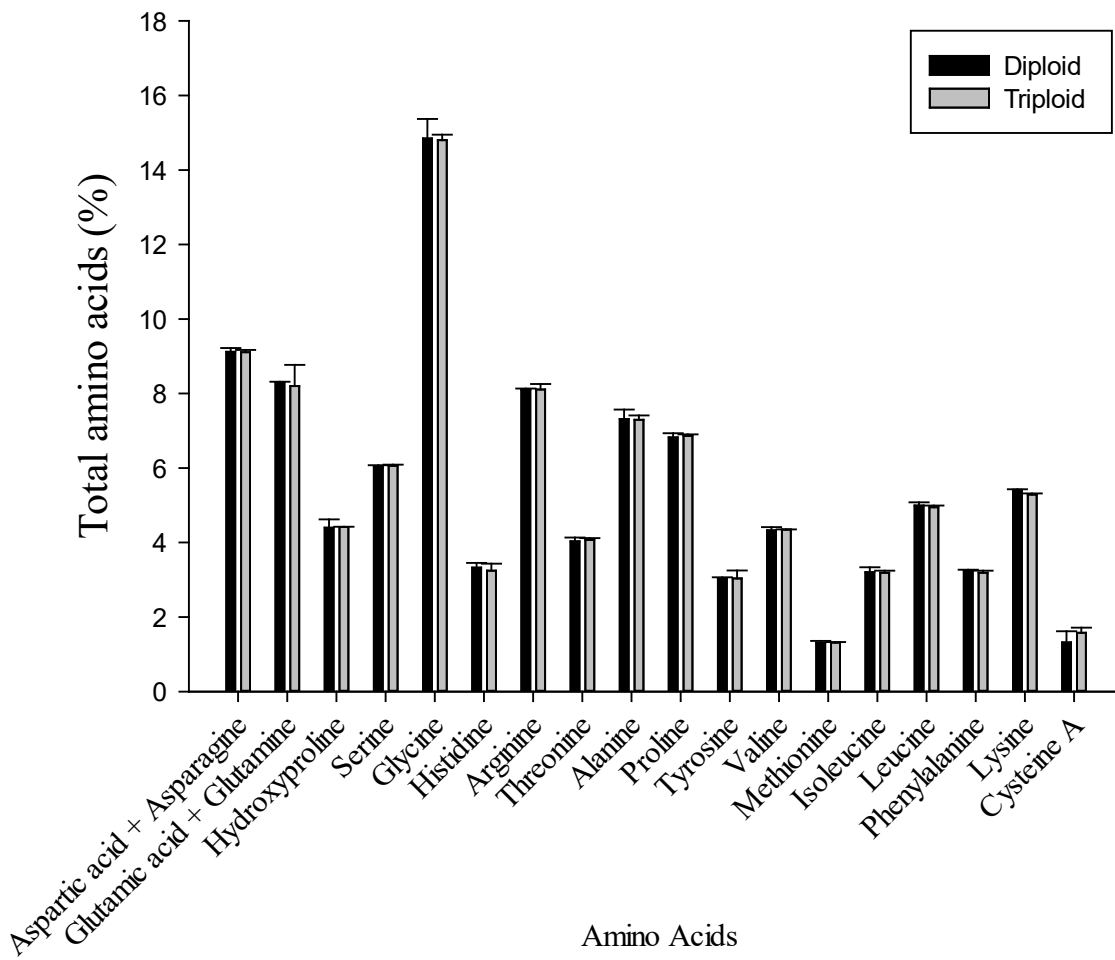


Figure 28. Composition of amino acids in term of percentage between diploid and triploid byssal threads. DF = 1 + 3, Pseudo-F = 0.11509, p = 0.9164

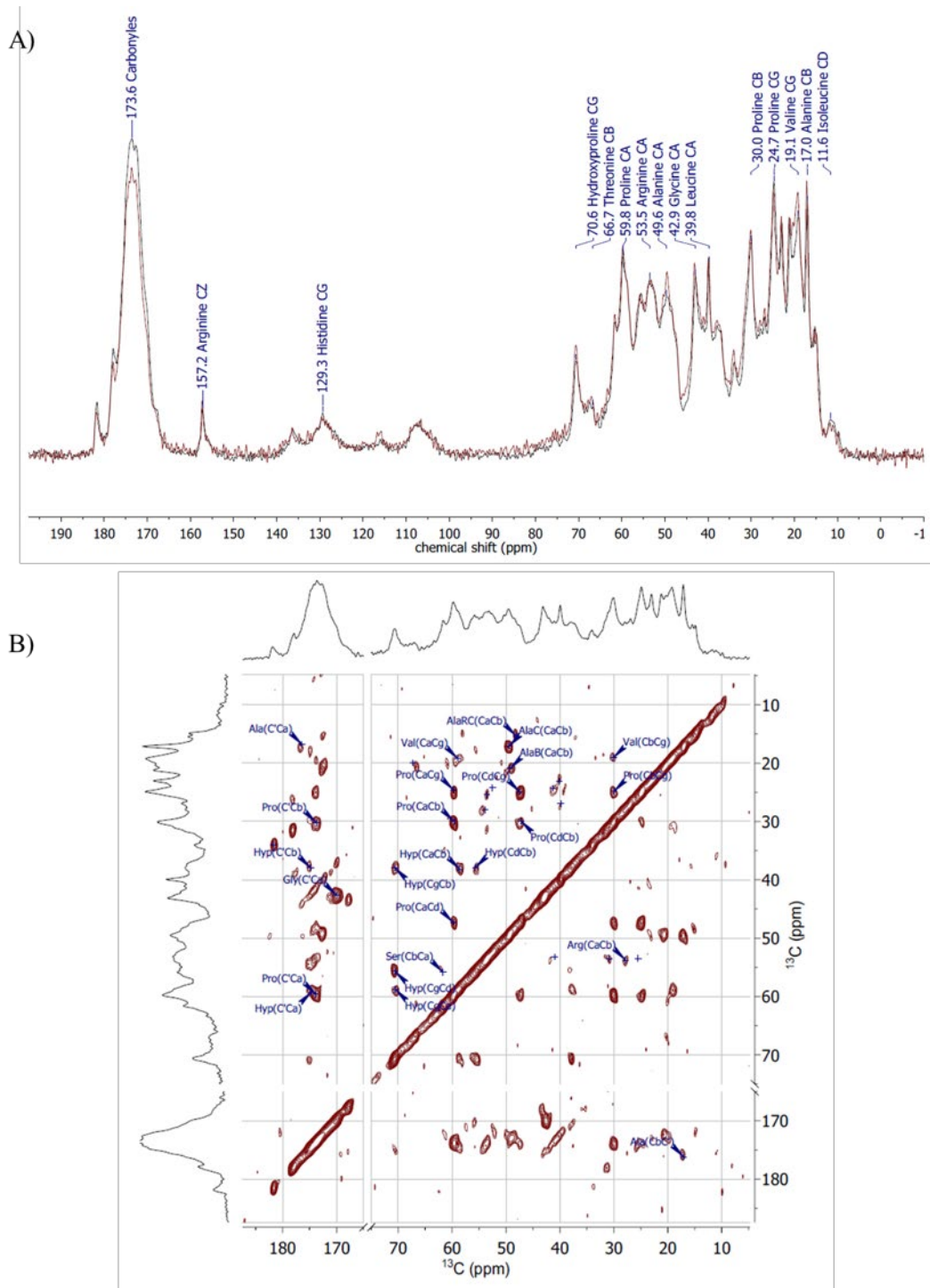


Figure 29. NMR spectrum of diploid and triploid byssal threads. A) Two-dimensional spectrum. B) Tridimensional spectrum. Diploid spectrum is represented by the black line, while triploid spectrum is shown by the red line. Amino acids belonging to each peak are described over each corresponding peak

4.5.3 Metal composition of byssal threads

The percentage of different elements and metals present in byssal threads and analysed through ICP-MS was calculated. The results showed that for both diploid and triploid byssal threads, Na, Ca, Mg, B, and Fe were respectively the most abundant. The metal concentrations of B, Cu, Sr, Os, W, Ag, Nb, Bi, and Tl were all significantly more present in diploid threads than in triploids. No metal was significantly more expressed in triploids. Nevertheless, the ratios of the different metals seems to be different between diploid and triploid mussels as shown in Figure 30.

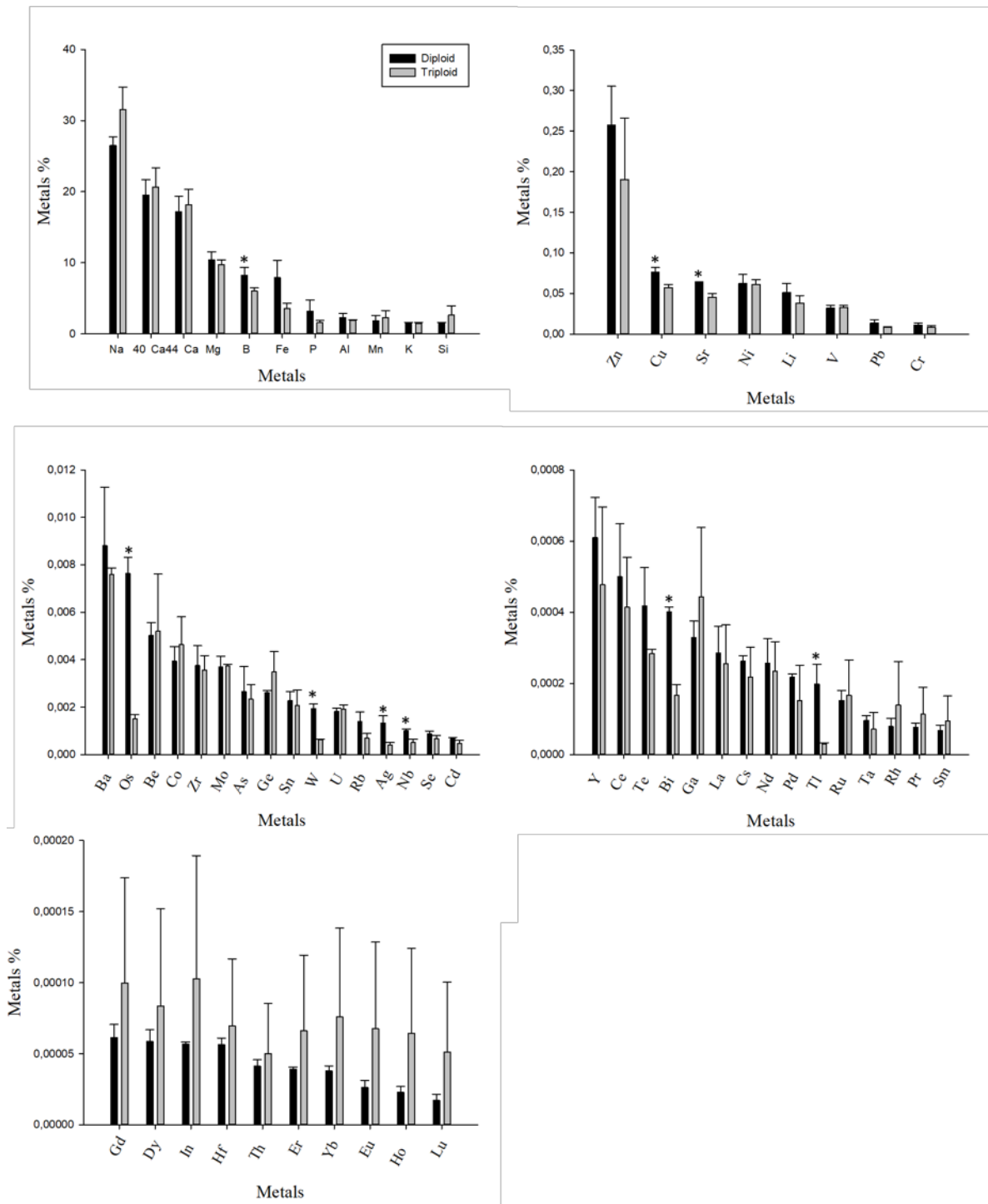


Figure 30. Metal concentrations in diploid and triploid byssal threads. The concentrations are expressed as relative percentage of each metal in the byssal thread. Significant differences are highlighted by a star. Df = 5 + 378, Pseudo-F = 1.8122, p = 0.1879

4.5.4 Physiological analyses control of scope for growth

Measurement of physiological properties of diploid and triploid mussels at 10 and 20°C are summarized in Table 7. No differences in food assimilation between both groups either at 10°C or at 20°C were observed. The VO_2 of triploid mussels at 10°C was 19% higher than diploid. However, no difference in the VO_2 at 20°C was observed between both groups. The clearance rate was higher in triploid than in diploid for the two temperature conditions with 55% and 48% increase at 10 and 20°C, respectively. The scope for growth was strongly higher in triploid than in diploid for both temperature conditions (58% at 10°C; 57% at 20°C).

Interestingly, while triploids had higher scope for growth and clearance rate than diploids at 10°C; their levels at this temperature were all similar to the levels of diploids at 20°C, while the scope for growth and clearance rate of triploids at 20°C increased compared to 10°C. Finally, for both temperature conditions, triploid mussels showed bigger shell thickness and their valves elicited stronger resistance against breaking (Table 7).

Table 7. Metabolic analyses of diploid and triploid mussels performed at 10 and 20°C. T-tests were performed. When Shapiro-Wilk test could not pass, Mann-Whitney Rank sum test was performed instead. Errors are shown as standard error of means. Statistical significances are determined through P value

Measurements	Statistical test	10°C		P value	Statistical test	20°C		P value
		Diploid	Triploid			Diploid	Triploid	
Scope for Growth (J h ⁻¹ g ⁻¹)	Shapiro-Wilk	184.21 ± 19.42	291.22 ± 15.42	0.00016	Mann-Whitney	285.18 ± 14.42	446.63 ± 28.91	< 0.001
VO ₂ (mgO ₂ h ⁻¹ g ⁻¹)	Shapiro-Wilk	1.16 ± 0.06	1.38 ± 0.07	0.024	Shapiro-Wilk	2.06 ± 0.05	2.04 ± 0.07	0.827
Clearance Rate (l h ⁻¹ g ⁻¹)	Shapiro-Wilk	1.45 ± 0.13	2.25 ± 0.11	0.00006	Mann-Whitney	2.28 ± 0.11	3.38 ± 0.23	< 0.001
Absorbance (%)	Shapiro-Wilk	81.65 ± 0.90	80.95 ± 1.06	0.63	Shapiro-Wilk	82.05 ± 1.11	82.81 ± 0.93	0.603
Shell Thickness (mm)	Shapiro-Wilk	0.86 ± 0.02	0.96 ± 0.02	0.0014	Mann-Whitney	0.85 ± 0.047	0.93 ± 0.03	0.048
Valve breaking strength (N)	Shapiro-Wilk	129.86 ± 19.68	185.34 ± 20.08	0.026	Mann-Whitney	122.39 ± 16.25	171.19 ± 14.00	0.038

Shell size properties of diploid and triploid mussels showed that although the increase was small and only represented 1 to 2 mm in two years, both length and height of triploid mussels were respectively 3 and 5% higher in triploid mussels compared to diploids mussels. However, no difference in shell width was observed between the two groups. Triploid shells showed higher length/width, height/length, and height/width ratios than diploids (Table 8).

Table 8. Shell size T-tests were performed. When Shapiro-Wilk test could not pass, Mann-Whitney Rank sum test was performed instead. Errors are shown as standard error of means. Statistical significances are determined through two-tail P value

Shell Properties	Diploid	Triploid	P-value
Length (mm)	59.25 ± 0.44	60.77 ± 0.46	0.018
Height (mm)	22.41 ± 0.17	23.58 ± 0.20	< 0.001
Width (mm)	31.57 ± 0.23	31.73 ± 0.25	0.642
Length/Width	1.88 ± 0.01	1.92 ± 0.008	0.004
Height/Length	0.38 ± 0.004	0.39 ± 0.002	0.018
Height/Width	0.71 ± 0.007	0.74 ± 0.004	< 0.001

4.6 DISCUSSION

This study showed that adult triploid mussels produced significantly more byssal threads than diploids and confirm our previous work on <30 mm triploids' of *Mytilus edulis* (Osterheld et al. 2022). Moreover, in our previous study we demonstrated that the byssal diameter of juvenile diploid and triploid mussels did not vary between both groups. This tendency was maintained in adult mussels although we observed an increase in byssal diameter in adult mussels compared to juvenile with a mean diameter of $63.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$, while

both juvenile groups had a thread diameter of $48 \pm 2 \mu\text{m}$. This difference of thinner byssal threads in small mussels has been already noticed in literature (Babarro and Carrington 2013, Garner and Litvaitis 2013) Interestingly, the diameter observed in our study was smaller than what has been described in literature with mean diameter of the distal region of *Mytilus edulis* ranging between <80 to $190 \mu\text{m}$ (Bouhleb et al 2017, Hennebicq et al. 2013, Seguin-Heine et al. 2014). However, in this study mussels originated from Prince Edward Island's stocks, while in the studies of Bouhleb et al. (2017), Seguin-Heine et al. (2014), and Hennebicq et al (2013), the mussels came from Magdalen Island. Seguin-Heine et al. (2014) observed significant differences in threads diameter between mussels harvested in the open sea of Magdalen Island compared to mussels from the lagoon, thus differences between studies could be related to differential environmental conditions. Also, it was suggested that production of byssal threads can be different between size range of mussels (Babarro and Carrington 2013, Garner and Litvaitis 2013).

Although we observed bigger diameter in adult mussels ($>50 \text{ mm}$) compared to the small mussels ($<30 \text{ mm}$) from our previous study (Osterheld et al. 2022), no significant difference in threads number production was noted between both sizes. Moreover, the production of byssal threads by diploid mussels was in accordance with the study of Arens et al. (2011) on mussels also from Saint Peters Bay, PEI (Canada). Indeed, they found that untreated wild mussels produced around 57 ± 13 threads which is highly similar to what we observed in our study with a mean production of 58 ± 6 threads per diploid mussel.

Mechanical properties of byssal threads measured in size commercial mussels indicated higher Young modulus in triploid byssal threads compared to diploids, as already observed in young mussels (Osterheld et al. 2022). Young modulus determines the stiffness of the threads before reaching the yield point and can suggest a better resistance against deformation for triploid mussels (Bouhleb et al. 2017, Osterheld et al. 2022). Thus, the advantage of byssal threads in triploid mussels with better resistance is preserved during their growth from spat to commercial size. Furthermore, Young modulus of diploid mussels were

closed to the result the study of Bouhlef et al. (2017) that measure Young modulus of 146 ± 29 Mpa.

Interestingly, as in Osterheld et al. (2022) similar difference between diploid and triploid mussels were observed, with higher load at yield, tensile stress at yield, local peak maximum, and tensile stress at local peak maximum in triploids. Such results tend to confirm the improved mechanical properties of triploid mussels and suggest better attachment properties with better resistance against stress. However, no significant difference was observed on strain between diploid and triploid threads. These results suggest that threads from triploid mussels can bear higher load prior undergoing deformation to dissipate the energy applied on them. This higher resistance against stress provides an advantage for triploid mussels in frequently turbulent environment subjected to important wave effects. Indeed, it was shown that byssal threads can self-heal when their threads are damaged and can gradually recover their mechanical properties (Carrington and Gosling 2004, Harrington et al. 2009, Harrington and Waite 2007, Krauss et al. 2013). However, this recovery can take a few minutes during which the byssal threads are weakened (Carrington and Gosline 2004). It was demonstrated that when a byssal thread was subjected to quick repeated load cycles, with extension followed by relaxation, the thread has no time to heal (Reinecke et al. 2016, Carrington and Gosline 2004, Harrington and Waite 2007, Vaccaro and Waite 2001). Carrington and Gosline (2004) have suggested that due to the quite long recovery time of the distal region, the exposure to rapid and successive beyond yield stresses could represent a risk for the mussel attachment. Further, Harrington and Waite (2007) showed that for each successive yield stress, there is a reduction in the thread's modulus compared to the previous cycle. They also observed relation between the stiffness reduction of the thread and the strain value. Stress softening principally occurred once the threads reached their yield point at around 16% strain. When the strain cycle is of 20% then, a large reduction of the stiffness occurs, reaching a reduction of almost 40% of the initial modulus. Therefore, triploid threads with higher ultimate stress could be subjected to stronger load before reaching their yield point and deformation behavior, thus could have better resistance in turbulent environments resulting in successive stresses.

On the other side, Troncoso et al. (2008) observed that higher stress was needed to deform dry byssal threads of *Aulacomya ater* compared to hydrated ones. They postulated that hydrated threads had a more elastomer-like tensile behavior compared to dry threads. Thus, it is possible that triploid threads which elicits higher tensile stress may have lower elastomer like behavior and be more rigid against deformation. This potential behavior may on the contrary of previous hypotheses reduce the global attachment strength of triploid mussels.

Finally, it has been suggested that deformation of byssal threads due to reaching yield point could result in 1) the reorientation of the threads in the direction of the load, 2) allow the recruitment of more byssal threads (Bell and Gosline 1996). The recruitment of more threads might therefore reduce the load on single threads as the load would be distributed on more threads, improving the overall attachment. Thus, it is possible that the improved stress resistance of triploid threads may lead to the recruitment of more threads, which can in turn reduce the load and improve the attachment of triploid mussel threads.

Many structural factors could explain the difference in mechanical behavior of diploid and triploid threads. For instance, the diameter of byssal threads is often cited as an important factor that rules the attachment strength (Bouhleb et al. 2017, Hennebicq et al. 2013), but as for young mussels (Osterheld et al. 2022) no differences were observed between threads of triploid and diploids adult mussels. The composition of the byssal threads is also known to be involved in the attachment and mechanical properties of the threads (Harrington and Waite 2007, Waite et al. 2002). The protein gradients in byssal threads can improve the modulus and decrease the stress on byssal threads (Waite et al. 2002). Moreover, the flanking domains of preCols are also expected to be of importance for the threads' mechanical properties (Harrington and Waite 2007, Waite et al. 2002). Harrington and Waite (2007) suggested that changes in the sequence of the flanking domains could affect the stiffness of the byssal threads. The content of specific residues such as histidine and DOPA are also expected to play a major role in the mechanical behavior of the threads (Harrington and Waite 2007, Waite et al. 1998, Sun and Waite 2005). Indeed, these residues are involved in metal binding

and are involved in the self-healing properties of the threads (Reinecke et al. 2016, Zechel et al. 2019, Schmitt et al. 2015, Xu et al. 2019). Thus, modification of their expression could strongly affect the behaviour of byssal threads. The results of the amino acids content of diploid and triploid mussels showed no difference between the two groups, suggesting no impacts of their composition on the attachment strength and tensile properties of the byssal threads.

Absence of difference in molecular composition between threads from diploid and triploid mussels was also confirmed by absence of profile differentiation with NMR analyses. NMR data were similar to NMR results from Arnold et al. (2013) performed on distal byssal threads of *Mytilus edulis* diploids; highlighting the same peaks as in our study. Previous studies also showed that byssal threads with the same content in amino acid residues could have different attachment strength (Hennebicq et al. 2013). For instance, Hennebicq et al. (2013) found no significant variation in amino acid residues excepted for glutamine between threads showing different mechanical properties of *Mytilus edulis*. In their study, the reduction of the attachment strength was mostly due to the reduction of the diameter of the byssal threads. In our study, glycine, Asx, Glx, arginine, alanine, and proline counted for more than 54 % of the total of the amino acids. These observations were consistent with other studies showing that the major amino acids present in the distal part of byssal threads were first glycine, followed by alanine, asparagine, glutamine, arginine, and proline (Hennebicq et al. 2013, Bouhleb et al. 2017, Lucas et al. 2002). As for Hennebicq et al. (2013), we observed that the dominant amino acid was glycine with level of 18%. The higher levels of glycine are supposedly due to the presence of repetitive sequences containing glycine (Gly-Xaa-Yaa) in the preCols (Waite et al. 1998, Silverman and Roberto 2010, Lucas et al. 2002, Hagenau et al. 2011). These last domains are flanked by silk fibroin like domains and are believed to mediate the function between the distal and proximal regions (Silverman and Roberto 2010). Moreover, glycine-rich sequences with histidine such as Gly-His-Gly are present in the N-terminus of preCol-NG and C-termini of preCol-P and -D and are involved in binding with metals such as Cu(II) (Waite et al. 2002, Waite et al. 1998). Furthermore,

Glycine forms triplets with proline and hydroxyproline (Gly-Pro-Hyp) which helps the stabilization of the triple-helix conformation (Engel et al. 1977, Hennebicq et al. 2013).

Hagenau et al. (2011) showed that polyalanine beta sheets present in the flanks of preCol-D and -NG are involved in the load-bearing of dehydrated distal byssal threads. At yield, polyalanine and polyglycine beta-sheets will unfold and reorient themselves to soften the stress and thus mediate load dissipation (Hagenau et al. 2011, Bertoldi and Boyce 2007). Therefore, the important role of glycine, proline, and alanine might explain their high abundance in the amino acid residues of distal byssal threads. Indeed, Bouhleb et al. (2017) found that although amino acid content strongly varies among bivalve species, glycine, alanine, and proline were usually the most abundant amino acids in bivalve threads.

The comparison of metal content in diploid and triploid byssal threads with other studies showed that the metal proportions measured in this study are different from what was previously observed. Indeed, we measured that Na, Ca, Mg, B, and Fe were respectively the most abundant elements in byssal threads, while Bouhleb et al. (2017) showed that Mn was the most abundant element in *M. edulis* byssal threads followed by Ca, and Mg. In their study, Hennebicq et al. (2013) observed Al, Fe, I, and Mg were, in this order, the most abundant elements. Such differences in the proportion of elements of byssal threads may be due to the feeding of the mussels as well as their location. Indeed, Szefer et al. (2002) showed highly variable metals concentrations in byssal threads depending on the mussels harvesting site. For instance, they demonstrated important variability of Fe concentrations ranging from 243 to 10308 µg/g dry weight between different harvest location. Similar observations were made by Seguin-Heine et al. (2014) showing differences in metal composition between the Open Sea and Lagoon. Moreover, their result also highlighted metal variability with seasons, showing different proportions of metals between summer and autumn/winter. Nevertheless, while differences in proportions were observed between these studies and ours, the major metals remained the same and could be classified, as proposed by Bouhleb et al. (2017), into 3 different groups. Group I with B, Fe, Al, Mg, Ca, Mn, and K; group II containing Ti, V,

Cr, Ni, Cu, Zn, Sn, Sr, Mo, and, Ba; and group III would represent trace metals. Our results also suggest that Os and W could both be included in group II metals.

In our study, high proportion of Na were observed while it was not the case in other studies. These high levels of Na may be due to remaining sea salt on the byssal threads, resulting such sodium concentrations. Indeed, although threads were cleaned three times with Millipore water, we tried to avoid keeping the threads in water for too long to reduce the risks of rinsing metals from the threads and altering their composition. Therefore, it is possible that some salt remained on the threads, causing the high levels of Na.

Interestingly, contrary to what would have been expected, triploid mussels did not show higher concentrations of iron nor zinc, metals known to be involved in the mechanical properties of the byssal thread and cuticle, through the formation of sacrificial bindings by interacting with histidine or with DOPA residues (Waite and Harrington 2022, Holten-Andersen et al. 2009). Therefore, it seems unlikely that the differences observed in mechanical properties of triploid byssal threads would be directly due to their concentration in zinc or iron. In fact, most of the metal and minerals present in triploid byssal threads showed no significant differences with the composition of diploid threads, excepted for B, Cu, Sr, Os, W, Ag, Nb, Bi, and Tl which all elicited higher proportions in diploid threads than in triploids. Such results are counterintuitive as, for instance, Cu is known to be involved in histidine coordination resulting in self-healing properties of byssal threads (Degtyar et al. 2014, Coombs and Keller 1981, Vaccaro and Waite 2001). Thus, higher mechanical performances would be expected in diploid mussels. Instead, our results showed that triploid mussels had improved mechanical performances compared to diploids. Based on ICP-MS results as well as on the amino acid composition of byssal threads, we were not able to explain the differences in mechanical properties between diploid and triploid threads. Nevertheless, we observed a tendency to have different proportions of metals between diploid and triploid threads although high variability was measured, particularly in triploids. Such variations in metals percentage may partially explain the improved performances of triploid byssal threads. Indeed, Schmitt et al. (2015) showed that Fe could be replaced by V in protein-metal

coordination without significantly altering the performance of the cuticle. They also showed that replacing Fe by Al results in full recovery of the stiffness but decreases the hardness recovery. Therefore, it is possible that triploid mussels use different proportions of metals to compensate for the lacking metals or even improve their byssal properties.

Triploid mussels elicited significantly higher valve breaking strength compared to diploid mussels at both 10 and 20°C. This higher resistance of triploid shell could therefore provide them with a better protection against predators such as shell-crushing fishes, birds, crustacean, gastropods, and starfishes (Johnson 2020, Drouin et al 2015, D'Amours et al 2008, Wilding and Nickell 2013, Sardenne et al 2019). The increased shell resistance of triploids seems to be mainly due to their thicker shell which requires more strength to break as thinner shells are easier for predator to penetrate (Johnson 2020, Grey et al. 2007, Alexander 1990). Also, results of shell shape demonstrated that triploid shells showed higher length and height for similar width. Therefore, the more resistant shell of triploids had slightly different shapes from diploids, as demonstrated by the altered length/width, height/length, and height/width ratios. Johnson (2020) determine that bivalve shell shape plays an important role in its resistance against pressure and thus potential predators. Based on their observation, we may hypothesize that the better resistance of triploid shells may be partially due to their slightly different shape compared to diploids, that could possibly have a better repartition of the stress applied on them.

Differential byssogenesis and shell resistance of triploid mussels could be, at least partially, explained by their physiological rates resulting in different energetic status as measured at 10 and 20 °C. These temperatures were chosen as 20 °C represents the summer temperature present in Prince Edward Island, while 10 °C is associated with cooler and longer seasons (Poirier et al. 2021, Comeau et al. 2017). As predicted, temperature impacted the metabolism of mussels with an increase in scope for growth, VO_2 , and clearance rate at 20 °C compared to 10 °C for both diploids and triploids. However, scope for growth and clearance rate were both higher in triploids than in diploids for both 10 and 20 °C treatments and were in accordance with results obtained in young mussels by Osterheld et al. (2022).

Similar observations have also been performed in *Saccostrea commercialis* as triploid oysters showed significantly higher clearance rate, and scope for growth in juveniles and adults (Kesarcodi-Watson et al. 2001). No differences were observed for other physiological rates measured, except for VO_2 of triploid mussels at 10 °C, indicating higher metabolic rates, which may be linked with the higher clearance rate requiring more energy compared to diploids (Norkko et al. 2005). It is also possible that once triploid mussels were put in the respirometer chamber, they could have been faster to acclimate and started producing more byssal threads. This possible activity may have increased their metabolic needs resulting in higher VO_2 . However, this was not tested in this study and thus cannot be confirmed.

The absence of difference of VO_2 rates at 20 °C between triploid and diploid mussels, could be linked to the higher reproductive investment of diploid resulting in increased VO_2 , which may compensate for higher VO_2 observed in triploids at 10 °C (Iglesias and Navarro 1991, De Vooy 1976, Sastry 1966). This increase in VO_2 due to reproduction would be expected to be lower in triploid mussels as triploid bivalves are known to have reduced reproductive investment (Kiyomoto et al. 1996, Brake et al. 2004, Qin et al. 2020). Indeed, we recently observed that triploid of *Mytilus edulis*, while investing in reproduction, elicited significantly lower gonad volume than diploids (chapter 3) suggesting lower metabolic costs than for diploids.

Thus, the higher energy availability in triploid mussels measured at 10 and 20°C were mostly related to their higher clearance rate. With similar food assimilation level (absorption efficiency), the higher ingestion of food by triploid mussel would induce higher energy available for different function, like byssus and shell production.

With their higher clearance rate, triploid mussels may be of interest to fight against eutrophication phenomenon. Mussels are known as extractive species and mussel aquaculture is believed to be an efficient and ecological way to reduce eutrophication (Lindahl et al. 2005, Petersen et al. 2016, Smaal et al. 2019). By filtering and consuming algae, mussel can extract the anthropic nutrient assimilated by algae and either extract them by the sedimentation of feces and pseudo-feces or store them in their tissues and extract the

nutrient from the environment when mussels are harvested for commercialization (Petersen et al. 2016, Songsangjinda et al. 2000, Petersen et al. 2019, Smaal et al. 2019). As triploid mussels have higher clearance rate, it can be hypothesized that they would either consume more algae and thus, store more nutrient in their tissues, or produce more feces and pseudo-feces and therefore increase the sedimentation of these nutrients which could ultimately lead to reduction of eutrophication.

4.7 CONCLUSION

In this study, we confirmed our previous work on triploid spats of *Mytilus edulis* showing higher energy available to produce more byssal threads with enhanced mechanical properties. Such improved triploid byssal behavior was therefore also observed in adult mussels, suggesting lower losses due to fall-off for mussel farmers. However, we cannot explain difference in mechanical properties by their differential biochemical and molecular composition as amino acids and NMR analyses showed similar results between diploid and triploid mussels. Strangely, metal composition could not explain the differences in mechanical properties between diploid and triploid byssal threads, therefore more work needs to be done to determine the reasons for such differences. The higher energy availability to produce more byssal threads and more resistant shells of triploid mussels was mostly related to their higher clearance rates. The higher clearance rate suggested that triploid mussels could be of interest as an ecological species to reduce eutrophication. Future works such modelization study could be performed to determine the potential ecological benefits of triploid mussels.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail effectué au cours de cette thèse a fourni de nouvelles informations sur l'utilisation des moules triploïdes en aquaculture en soulignant leur potentiel car elles possèdent un meilleur attachement ainsi qu'une amélioration de leur potentiel de croissance en comparaison aux moules diploïdes. Cette étude suggère que les moules triploïdes seraient moins sensibles au détachement, ce qui résulterait en de meilleurs taux de production pour les mytiliculteurs. L'originalité de cette étude tient au fait qu'elle a mis au point une méthode de production facile de moules triploïdes dans les conditions d'une éclosérie commerciale. De plus, il s'agit de la première étude à démontrer des effets de la triploïdie sur la force d'attachement des moules avec une production de fibres supérieure et des propriétés mécaniques améliorées. Je commencerai cette discussion générale en résumant les apports majeurs de cette thèse au domaine de la mytiliculture, suivis des utilisations potentielles des moules triploïdes comme espèce extractive et de leurs services écologiques prometteurs. Enfin, j'aborderai des questions plus larges sur les futurs travaux à venir sur les moules triploïdes.

6. CONTRIBUTION DE L'ETUDE

6.1 Écloseries de moules et production de triploïdes

L'étude présentée au chapitre 1 a développé une méthode efficace pour produire des moules triploïdes dans un contexte d'éclosérie. En effet, avec cette méthode, un pourcentage élevé de succès peut être obtenu, pouvant atteindre jusqu'à plus de 90% de triploïdisation. De plus, cette méthode est extrêmement facile à appliquer dans le cadre d'une éclosérie car elle nécessite seulement d'avoir une température d'eau contrôlée et un contrôle sur le temps post-fécondation avant traitement. Avec cette méthode, les écloseries pourraient facilement

produire des quantités importantes de moules triploïdes sans avoir besoin de formation spécifique pour le personnel ni d'infrastructures particulières. En effet, la production d'un petit lot de moules triploïdes a déjà été réalisée, suivant la méthode décrite au chapitre 1, dans la Bideford Shellfish Hatchery à l'Île-du-Prince-Édouard, Canada, au cours du printemps 2019.

De plus, les moules produites avec cette méthode n'ont pas montré de différence de survie significative avec les témoins diploïdes, depuis le début de leur phase de larves-D jusqu'à leur métamorphose, en comparaison du groupe contrôle diploïde non-traité. Cela suggère que la production à grande échelle de larves triploïdes dans les écloseries ne semble pas réduire de manière significative la quantité de larves produites par rapport aux pratiques des écloseries classiques. Conjugué au fait que le 6-DMAP peut être utilisé à faible concentration pour induire la triploïdisation des moules, cela suggère que les coûts de production du naissain triploïdes ne seraient pas considérablement plus élevés que la production classique de moules diploïdes.

Fait intéressant, les larves triploïdes obtenues au chapitre 1 ont montré une croissance plus rapide et ont atteint une taille plus grande à la métamorphose par rapport aux diploïdes. Cela suggère que la triploïdisation procure un avantage aux moules même au stade larvaire. Ceci est pertinent car il existe une controverse quant à savoir si la triploïdie améliore ou non les performances des bivalves avant qu'ils n'atteignent leur maturation sexuelle. Mes résultats tendent à indiquer un impact direct de la triploïdie même au stade larvaire. Cette croissance plus rapide avant la métamorphose peut entraîner une amélioration de la survie au début de la vie des moules et pourrait réduire les pertes pour les mytiliculteurs. En effet, il est connu que les premiers stades de vie peuvent être particulièrement sensibles. L'abondance du naissain sur les collecteurs peut diminuer significativement jusqu'à ce que les moules atteignent 20 mm de longueur, entre autres en raison de leur détachement (Comeau et al. 2017, South et al. 2022).

Cette croissance plus rapide et ce meilleur potentiel de survie pourraient être d'autres atouts à la production de moules triploïdes en écloserie. Ainsi, les écloseries pourraient

utiliser cet aspect comme argument de vente pour les mytiliculteurs en argumentant que l'utilisation de moules triploïdes réduirait leurs pertes dans les stades précoces de développement. Cependant, des travaux supplémentaires sur la survie post-métamorphose sont nécessaires pour confirmer cet aspect.

Par conséquent, la production et le développement de naissain triploïde pourraient être d'un grand intérêt pour les écloséries de moules car elles seraient en mesure de fournir des moules possédant une meilleure qualité et de meilleures performances en comparaison aux captures sauvages. En effet, le coût du naissain triploïde pourrait être facilement compensé par des taux de production supérieurs en raison de la croissance plus rapide du naissain et d'une éventuelle meilleure survie. De plus, comme les coûts de production du naissain triploïde devraient être relativement faibles, la commercialisation de naissain triploïdes devrait être lucrative car ce naissain pourrait être préféré aux naissains diploïdes sauvage, en raison de leurs meilleures performances. De plus, comme la commercialisation des huîtres triploïdes est déjà bien établie, il semble probable que les moules triploïdes seraient plus facilement acceptées par les mytiliculteurs et les consommateurs.

6.2 Les moules triploïdes pour une meilleure fixation

Les travaux présentés aux chapitres 2 et 4 de cette thèse ont mis en évidence les effets de la triploïdie sur l'attachement des moules tant sur les moules < 30 mm que sur les moules de taille commerciale. Les résultats de ces deux études ont montré que les moules triploïdes avaient un taux de filtration de nourriture plus élevée (clearance rate) qui se traduit par un plus grand potentiel de croissance (SFG). Alors que le potentiel de croissance estime l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction, les résultats présentés au chapitre 3 ont montré que les moules triploïdes investissaient moins dans la reproduction que les diploïdes. Par conséquent, les résultats de cette thèse suggèrent que le SFG supérieur des triploïdes est principalement utilisé pour la production de tissus, de coquilles et de byssus, ce qui entraîne une byssogénèse supérieure avec des propriétés mécaniques améliorées incluant une résistance plus élevée face à la déformation. Ces résultats suggèrent fortement que les moules

triploïdes ont un attachement amélioré par rapport aux diploïdes. Cet atout a été observé pour les triploïdes quel que soit leur groupe de taille. Cela suggère que les moules triploïdes seraient avantageées même durant leurs premiers stades de vie avec un meilleur attachement, réduisant ainsi leur chute/détachement tout au long de leur cycle de vie et pas uniquement durant la période de reproduction. Ces résultats sont en accord les travaux présentés au chapitre 1 et qui ont montré une croissance plus rapide pour les larves triploïdes par rapport aux diploïdes, suggérant que les larves triploïdes peuvent avoir une survie améliorée par rapport aux diploïdes avec éventuellement un meilleur attachement également au cours des stades larvaires.

Avec un meilleur attachement, la chute des moules triploïdes devrait être réduite, ce qui limiterait les pertes directes pour les mytiliculteurs, ainsi que les besoins en manipulation et en entretien, diminuant ainsi les coûts de production. De plus, avec un meilleur attachement, l'efficacité de la production serait augmentée, ce qui implique que les mytiliculteurs pourraient boudiner avec une densité réduite de moules pour atteindre la même quantité de production finale. Réduire la densité d'élevage des moules pourrait avoir des effets bénéfiques sur la production. En effet, lorsque les moules sont produites à fortes densités, elles sont soumises au phénomène d'auto-amincissement, entraînant une compétition pour la nourriture et l'espace, ce qui va limiter la croissance de la population et réduire l'abondance des moules (Fréchette 2012, Fréchette et al 2010). En réduisant la densité des moules sur les appareils d'élevage, la compétition pour l'espace devrait être réduite et les moules pourraient grossir plus et plus rapidement que lorsqu'elles sont produites à haute densité. Cependant, cela doit être considéré avec précaution car les moules triploïdes ont un taux de filtration supérieur, ce qui risquerait d'augmenter la compétition alimentaire. En effet, cela peut réduire les gains des moules triploïdes dus à la densité réduite. De plus, si les moules triploïdes devaient être produites à des densités élevées, la compétition pour la nourriture pourrait devenir problématique et diminuer l'efficacité de production des moules triploïdes. Néanmoins, peu de preuves semblent indiquer que l'auto-amincissement pourrait être uniquement dû aux seuls effets de la restriction alimentaire, il semble au contraire être plus sensible à la limitation pour l'espace (communication personnelle de Marcel Fréchette,

novembre 2022). À cet égard, d'autres études doivent être réalisées pour déterminer les effets des densités de moules triploïdes sur les boudins d'élevage et la croissance des moules.

Un autre atout de l'amélioration de l'attachement des moules triploïdes serait une meilleure résistance contre l'encrassement biologique des espèces envahissantes telles que les tuniciers. C'est particulièrement vrai pour l'Î.-P.-É. où, depuis les dernières décennies, 4 espèces différentes de tuniciers sont apparues. Avec un meilleur attachement, les moules triploïdes pourraient rester accrochées aux outils d'élevage même lorsqu'elles sont encrassées par des tuniciers, puis une fois manipulées par les aquaculteurs, ils pourraient débarrasser les moules des organismes envahissants avant leur détachement et leur perte. Néanmoins, alors que les moules triploïdes devraient rester attachées aux boudins de moules, l'augmentation du taux de filtration observée aux chapitres 2 et 4 pourrait augmenter la compétition alimentaire avec les espèces biosalissantes ainsi qu'avec les autres organismes qui pourraient trouver refuge dans les structures d'élevage. Cependant, plus d'études doivent être menées pour confirmer ces hypothèses.

Les résultats présentés au chapitre 3 ont montré que les moules triploïdes investissent de l'énergie dans le développement des gamètes. Néanmoins, l'investissement était fortement réduit en comparaison des diploïdes et leurs gamètes n'ont jamais atteint leur pleine maturité quel que soit le moment de la saison de reproduction. De plus, alors qu'aucune ponte spontanée n'a été observée chez les moules triploïdes, il a été possible d'induire la ponte de quelques triploïdes entraînant l'émission d'un peu de gamètes ayant une faible motilité. Cependant, malgré leur faible concentration et leur faible motilité, ces gamètes étaient capables d'induire la fécondation des œufs diploïdes. En revanche, toutes les larves sont mortes dans la semaine qui a suivi la ponte. Comme les moules triploïdes investissent de l'énergie dans la reproduction, on peut émettre l'hypothèse qu'au cours de la saison de reproduction, leur force d'attachement pourrait diminuer de la même manière que les diploïdes en raison de la réduction de leurs réserves énergétiques au profit de leur reproduction (Lachance et al. 2008, Seguin-Heine et al. 2014), mais dans une moindre mesure que les diploïdes car leur investissement reproductif est inférieur à celui des diploïdes.

Aussi, les résultats présentés au chapitre 3 suggèrent qu'au lieu de pondre, les moules triploïdes résorberaient leurs gamètes ce qui pourrait permettre de récupérer une partie de l'énergie investie dans la reproduction. Ainsi, leurs gamètes pourraient servir de réserves énergétiques pendant la saison de reproduction. Avec la résorption des gamètes, les moules triploïdes pourraient avoir plus d'énergie en fin de saison de reproduction et donc être en meilleure condition que les diploïdes. L'énergie plus élevée chez les moules triploïdes en raison de la résorption des gamètes pourrait entraîner moins d'affaiblissement des moules après la ponte et donc moins de chute dues au détachement.

De plus, avec la résorption des gamètes, on peut considérer que les moules triploïdes auraient plus d'énergie disponible pour la byssogénèse juste après la saison de ponte. Cela pourrait mener à une plus grande force d'attachement et à de meilleures performances mécaniques des fibres de byssus chez les triploïdes ayant résorbé leurs gamètes, que chez les diploïdes ayant pondus. En effet, les diploïdes seraient affaiblis avec de faibles réserves énergétiques, tandis que les triploïdes resteraient dans un état optimal.

Ces résultats suggèrent que les moules triploïdes pourraient avoir une meilleure survie après la saison de ponte comparé aux diploïdes. Ils semblent en accord avec les résultats présentés aux chapitres 1, 2 et 4 qui ont montré un potentiel élevé des moules triploïdes pour l'aquaculture. De plus, sans saison de ponte, les moules triploïdes pourraient être commercialisées tout au long de l'année avec une qualité de chaire constante.

La figure 31 résume les nombreux résultats obtenus dans cette thèse, et met en évidence les impacts potentiels de la triploïdie chez les moules à partir des résultats des 4 chapitres.

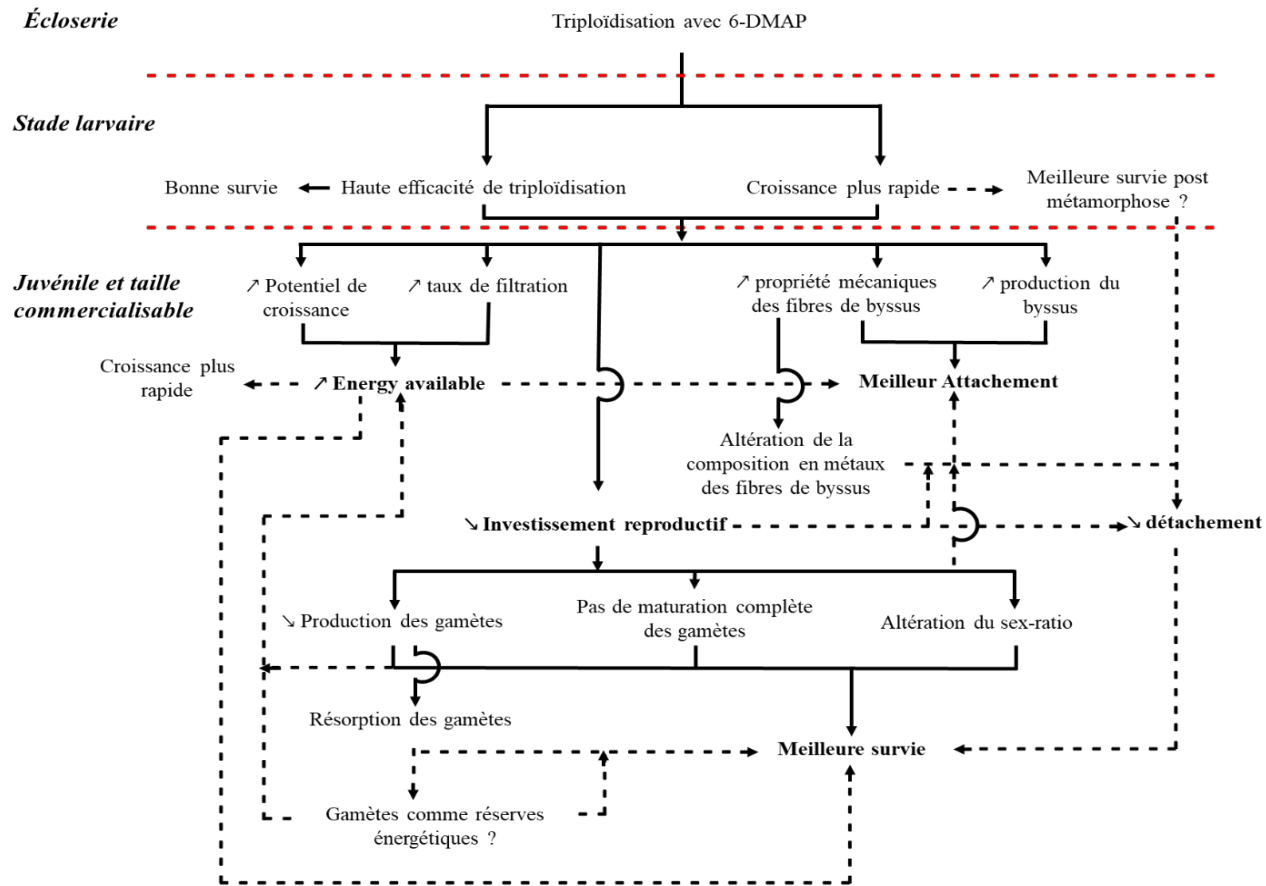


Figure 31 : Représentation synthétique des principaux résultats obtenus et des liens entre chacun d'eux, du chapitre 1 à 4. Les flèches noires représentent les liens directs entre les résultats obtenus, tandis que les flèches noires en pointillés sont les liens hypothétiques entre les résultats. Les lignes pointillées rouges servent de séparation entre les différents stades de développement des moules

Les résultats de cette thèse suggèrent que les moules triploïdes pourraient avoir un potentiel économique élevé pour les mytiliculteurs tout en réduisant les coûts de manutention. En effet, une meilleure fixation et une densité réduite sur les boudins pouvant se traduire par une meilleure croissance et moins de chute/détachement réduiraient le nombre de fois où les mytiliculteurs devraient entretenir les boudins d'élevage. Ceci réduirait également les coûts dus au transport vers et depuis les sites d'élevage. En outre, les bénéfices pourraient être plus élevés, car le taux de production pourrait augmenter *via* la diminution des pertes de moules. Aussi, la qualité de la chair des moules triploïdes devrait être élevée la majeure partie de l'année, voire toute l'année.

7. SERVICES ENVIRONNEMENTAUX DES MOULES TRIPLOÏDES

L'élevage de bivalves est connu pour être l'une des pratiques agricoles les plus écologiques (Suplicy 2020), notamment car la production de bivalves ne nécessite aucune alimentation externe. En effet, les bivalves se nourrissent de phytoplancton marin, réduisant ainsi la quantité de déchets rejetés dans le système marin. De plus, la mytiliculture nécessite relativement peu de manutention, de sorte que les utilisations de bateaux et de machines sur les lieux d'élevage sont occasionnelles et l'empreinte carbone reste relativement faible. Par exemple, l'une des dépenses en carbone les plus importantes de la mytiliculture est due au carburant dépensé pour le transport des moules du site d'élevage au lieu de vente (Aubin et al. 2018). En effet, Aubin et al. (2018) ont suggéré que les performances environnementales de la mytiliculture notamment concernant l'empreinte carbone dépendraient principalement des pratiques d'élevage et du carburant consommé.

De plus, la mytiliculture est écologiquement intéressante car les moules peuvent appliquer un contrôle sur les événements d'eutrophisation. En effet, le rejet de déchets anthropiques dans l'écosystème marin va augmenter le développement de microalgues entraînant une eutrophisation du milieu (Smaal et al. 2019). En se nourrissant de phytoplancton, les moules peuvent réduire l'eutrophisation et incorporer les nutriments anthropiques dans leurs tissus, qui pourront être extraits de l'environnement une fois les

moules récoltées pour la commercialisation (Smaal et al. 2019, Petersen et al. 2019). De plus, grâce à la formation de leur coquille, les moules contribuent à réduire la concentration de CO₂ dans l'environnement marin car elles peuvent se servir du carbone pour produire du CaCO₃, le principal élément de leurs coquilles (Filgueira et al 2019). Cette séquestration du CO₂ pourrait à terme avoir un impact sur les changements climatiques car une fois que les moules récoltées pour l'alimentation humaine, leur coquille sera enfouie sous forme de déchets et le CO₂ séquestré sous forme de CaCO₃ est stable et ne sera pas rejeté dans l'environnement.

Cependant, à cause de la chute des moules, ces services environnementaux de la mytiliculture peuvent être réduits car les moules tombées sont consommées par des prédateurs et des organismes microbiens, ce qui entraîne la libération des nutriments stockés dans leurs tissus. Ces nutriments libérés peuvent ensuite être utilisés par le phytoplancton, ce qui pourrait augmenter les phénomènes d'eutrophisation. De plus, la respiration bactérienne due à la dégradation des moules et des déchets de moules augmentera la consommation d'oxygène et les émissions de CO₂. Enfin, le carbone stocké sous forme de CaCO₃ dans les coquilles de moules mortes peut, à terme et sur une durée plus ou moins longue, être rejeté dans le milieu par dissolution des coquilles, si les coquilles ne sont pas enfouies sous les sédiments.

À cet égard, les moules triploïdes pourraient fournir des services environnementaux améliorés par rapport aux moules diploïdes. En effet, comme démontré aux chapitres 2 et 4, les moules triploïdes semblent avoir une meilleure fixation. Par conséquent, elles sont moins susceptibles de tomber des boudins de moules, ce qui réduit le risque de libération de nutriments par la dégradation des moules mortes. Comme une plus grande proportion de moules triploïdes serait récoltée, la quantité de nutriments anthropiques extraits de l'eau de mer devrait également être augmentée, réduisant ainsi encore plus l'eutrophisation. Cette réduction plus importante de l'eutrophisation se traduirait par une meilleure oxygénation de la colonne d'eau avec un meilleur apport de lumière dans la colonne d'eau. Cela améliorerait alors la qualité de l'eau et réduirait la mortalité d'autres organismes marins. De plus, avec

moins de chutes et donc moins de moules disponibles pour l'alimentation des prédateurs et des organismes microbiens, la consommation d'oxygène dissous dans l'eau pourrait être encore plus réduite. En outre, avec moins de moules mortes, la respiration bactérienne devrait être réduite, ce qui diminuerait les émissions de CO₂ par les organismes microbiens. Ceci aurait pour effet d'améliorer les conditions d'oxygénation du milieu.

De plus, les résultats présentés aux chapitres 2 et 4 ont démontré que le taux de filtration des moules triploïdes était supérieur à celui des diploïdes. Cela suggère que les moules triploïdes pourraient consommer plus de phytoplancton que les diploïdes. Avec une plus grande consommation de microalgues, les moules triploïdes pourraient avoir des impacts encore plus importants sur l'eutrophisation car elles devraient réduire la couche eutrophique plus rapidement et de manière plus importante. L'assimilation des nutriments, et donc leur extraction de l'environnement, devrait également être plus importante, ce qui augmenterait les impacts sur l'eutrophisation de façon durable.

De plus, les moules triploïdes devraient avoir une meilleure extraction des nutriments de l'écosystème marin en raison de leur plus grande production de fibre de byssus en comparaison des moules diploïdes. En effet, la production de byssus nécessite une quantité considérable de carbone et d'azote puisqu'elle peut représenter jusqu'à 44 % et 21 % de leur budget respectif. Par conséquent, comme les triploïdes produisent plus de fibres, comme indiqué aux chapitres 2 et 4, il semble probable que plus de carbone et d'azote soient stockés sous forme de fibres de byssus et extraits de l'environnement marin une fois que les boudins seront retirés pour l'entretien ou la récolte des moules. Si les fibres de byssus étaient retirées du milieu marin, davantage de nutriments seraient extraits de l'écosystème.

Comme décrit au chapitre 4, les moules triploïdes ont des coquilles plus épaisses, ce qui signifie que leur séquestration du carbone sous forme de CaCO₃ est supérieure aux diploïdes. Ainsi les moules triploïdes réduiraient de façon plus efficace les concentrations de CO₂ et pourraient être intéressantes pour diminuer encore plus l'empreinte carbone de la mytiliculture. Cela pourrait finalement avoir un impact sur les gaz à effets de serre et constituer un organisme durable en tant qu'approvisionnement alimentaire. De plus, avec une

meilleure fixation, non seulement les moules triploïdes réduiraient leur empreinte carbone en raison d'une séquestration plus élevée de CO₂, mais avec moins de moules mortes au fond de la mer, la libération de carbone dissous due à la dissolution des coquilles serait réduite, et une proportion plus élevée de carbone pourrait être enterré après la consommation humaine des moules. Cependant, cette hypothèse doit être considérée avec précaution car il n'existe à l'heure actuelle pas de consensus concernant l'emploi de moules comme puit ou source de carbone. Les travaux de Álvarez-Salgado et al. (2022) ont notamment mis en avant l'importance de la gestion des déchets issus de la consommation des moules et les risques de libération du carbone stocké dans leur coquilles lors de leur incinération, relâchant le carbone dans l'atmosphère.

Néanmoins, l'amélioration de l'attachement des moules triploïdes peut réduire la quantité de soins que les mytiliculteurs doivent fournir aux moules et, par conséquent, cela pourrait réduire le nombre de manipulations et l'entretien des moules.

La réduction des manipulations de moules réduirait l'empreinte carbone de l'aquaculture, les bateaux et les machines d'élevage étant moins souvent nécessaires et consommant ainsi moins de carburant. Par ailleurs, en raison d'un éventuel attachement plus importante des moules triploïdes, les mytiliculteurs pourraient produire des moules à plus faible densité sur les boudins de moules afin d'atteindre la même quantité production qu'avec les diploïdes, diminuant ainsi le phénomène d'auto-amincissement. Ceci pourrait également réduire l'entretien et les manipulations par les aquaculteurs. En effet, habituellement, les mytiliculteurs doivent fréquemment réduire et sélectionner manuellement les moules présentes sur les boudins d'élevage afin de se débarrasser des petites moules et diminuer leur densité d'élevage. Si la densité d'élevage des moules triploïdes est réduite, il est envisageable de s'attendre à une diminution du besoin de cet entretien manuel. Outre la diminution de l'entretien des moules et structures, le meilleur attachement des moules, ainsi que leur production à des densités plus faibles pourraient réduire les impacts de la mytiliculture sur l'écosystème en diminuant les déplacements indésirables des ressources énergétiques vers les fonds marins lors du détachement des moules, ce qui permettrait une meilleure

valorisation des ressources environnementales. Les effets possibles des moules triploïdes en tant qu'espèce extractive sont illustrés dans la figure 32.

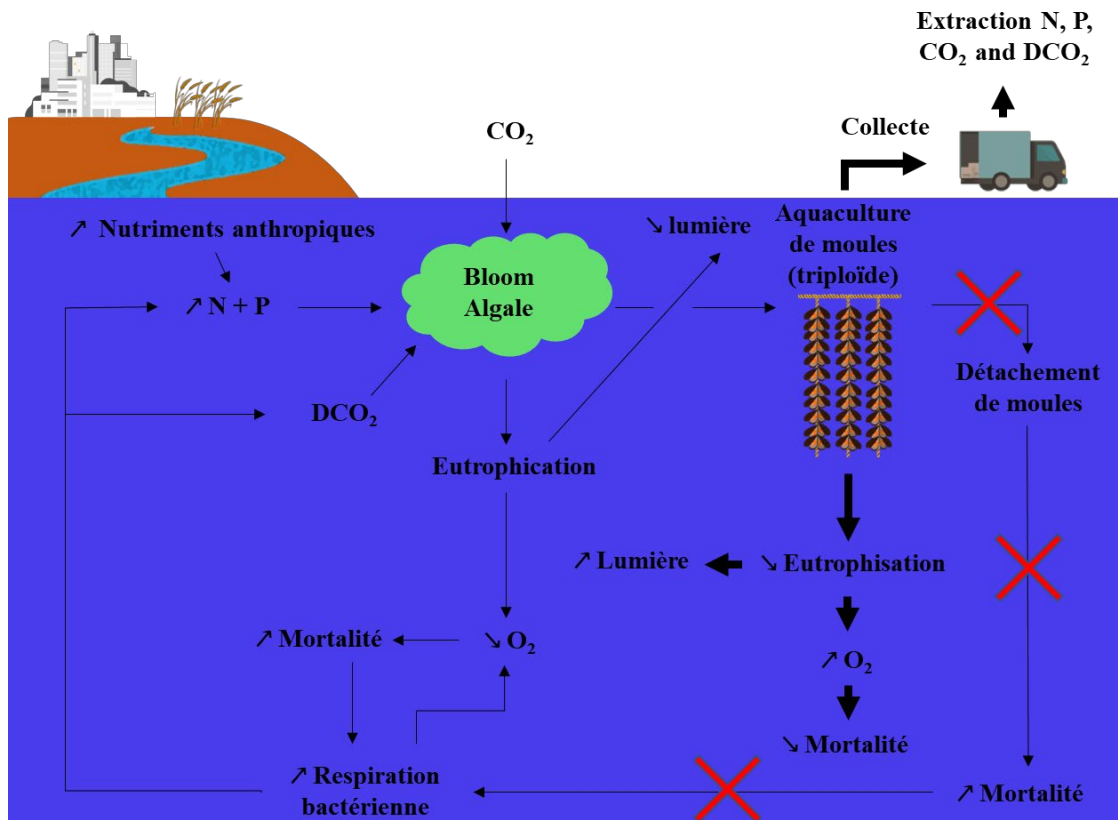


Figure 32 : Représentation des services écologiques potentiels des moules triploïdes pour la réduction de l'eutrophication. Des flèches en gras sont utilisées pour montrer l'effet accru dû aux moules triploïdes. Les croix rouges sont utilisées pour montrer la réduction ou l'inhibition d'un processus dû au fait que les moules sont triploïdes.

Une préoccupation majeure concernant les organismes triploïdes est la fuite et la reproduction de ces organismes dans l'environnement, ce qui pourrait entraîner leur invasion dans les écosystèmes marins ; les organismes triploïdes risquant de se substituer aux espèces endémiques (Benfey 2016). Ces préoccupations sont particulièrement vraies pour les espèces de bivalves car elles produisent une quantité massive de gamètes et les relâchent dans l'environnement. Par exemple, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) est une espèce envahissante des eaux nord-américaines et représente un défi important pour le contrôle

environnemental (Strayer 2009, Miehl et al. 2009). À cet égard, la revue de littérature de Benfey (2016) sur l'efficacité de la triploïdie comme outil de confinement de la reproduction de *Salmo salar* a montré que la production de saumons triploïdes uniquement femelles est le moyen le plus efficace de contrôler leur stock et d'éviter l'incursion de poissons fertiles diploïdes dans les populations sauvages. En effet, les femelles triploïdes *Salmo salar* produisent peu ou pas de gamètes avec presque aucun développement de follicules ovariens. Les résultats présentés au chapitre 3 de cette thèse ont montré un fort biais de sexe-ratio pour les moules triploïdes, avec une absence de femelles. Ces moules étaient capables de produire une faible concentration de gamètes sans maturation complète. Cependant, nous avons réussi à forcer la ponte des moules triploïdes, entraînant la libération de spermatozoïdes à faible motilité. Les gamètes ont pu féconder les œufs diploïdes bien que toutes les larves soient mortes quelques jours après la fécondation. Bien que de tels résultats tendent à indiquer un faible risque que les triploïdes puissent se reproduire en se croisant avec des diploïdes de manière efficace à cause d'une mortalité larvaire élevée. Cependant, la fécondation des œufs diploïdes par des mâles triploïdes risque de réduire la quantité d'œufs disponibles pour la fécondation des moules mâles sauvages. Des observations similaires ont été mises en évidence dans la revue de Benfey (2016) avec des saumons mâles triploïdes capables de féconder des œufs diploïdes mais produisant des embryons aneuploïdes qui meurent tôt au cours de leur développement. Néanmoins, il est possible d'émettre l'hypothèse que les moules triploïdes seraient capables de féconder moins efficacement les œufs diploïdes en milieu marin. En effet, si la reproduction chez les saumons nécessite généralement une proximité entre mâles et femelles, elle est moins importante pour les moules car elles libèrent leurs gamètes dans l'eau. Ces dernières dérivent ensuite au gré des courants. À cet égard, les mâles triploïdes libéreraient des gamètes de mauvaise qualité et avec une faible mobilité, ce qui pourrait réduire la possibilité pour ces gamètes d'atteindre les œufs diploïdes. De plus, les résultats présentés au chapitre 3 ont démontré que non seulement les gamètes triploïdes n'ont jamais atteint leur pleine maturité, mais aussi que leurs gamètes n'étaient jamais au même stade de développement au même moment que les moules diploïdes. Ainsi, on peut suggérer que les moules triploïdes ne seraient pas susceptibles de frayer en même temps que les

diploïdes, réduisant ainsi d'autant plus les risques que les moules triploïdes affectent les populations sauvages.

Enfin, les moules triploïdes n'étant que des mâles, elles pourraient être un atout important pour les services environnementaux décrits précédemment. En effet, comme toutes les moules sont du même sexe, il serait possible de produire massivement des moules triploïdes dans les régions où l'espèce n'est pas endémique tout en évitant le risque d'une invasion de moules. Ainsi, non seulement les mytiliculteurs pourraient avoir accès à de nouvelles régions et sites de production, mais les moules triploïdes pourraient également être utilisées pour réguler l'eutrophisation dans des secteurs où cela serait autrement impossible sans risquer d'importants effets à long terme dus à l'invasion par les moules. Cependant, cet aspect doit être traité avec prudence car certaines études ont montré que les bivalves triploïdes peuvent avoir une réversion de la triploïdie et revenir à un état chimérique ou même entièrement diploïde. Ceci pourrait conduire au développement de moules fertiles et à terme à l'invasion par les moules. Par conséquent, des travaux supplémentaires doivent être effectués sur cet aspect spécifique.

Cette thèse a mis en évidence le grand potentiel des moules triploïdes pour l'aquaculture. Les principaux résultats suggèrent que les triploïdes pourraient avoir une efficacité de production importante en réduisant les pertes de moules pour les agriculteurs ainsi que leur travail de manutention. De plus, l'élevage de moules triploïdes peut représenter une production particulièrement écologique avec une empreinte carbone faible ou même négative. Les moules triploïdes pourraient également servir d'espèce extractive améliorée et avoir des impacts significatifs sur l'eutrophisation et potentiellement même sur les changements climatiques.

8. PERSPECTIVES

Alors que les moules triploïdes semblent avoir un grand potentiel pour l'aquaculture, la production à grande échelle et l'efficacité de l'attachement directement sur les boudins de moules n'ont pas été testées dans le cadre de cette étude. Bien que nous ayons réussi à

développer une méthode efficace pour produire des moules triploïdes, cette méthode ne peut pas produire 100% de triploïdes contrairement au croisement de tétraploïdes avec des géniteurs diploïdes. Ainsi, à l'avenir, il serait pertinent de travailler sur le développement de moules tétraploïdes afin de disposer de stocks de géniteurs capables de produire uniquement des triploïdes, comme cela se fait pour les huîtres triploïdes. La production de moules tétraploïdes pourrait être tentée soit par l'inhibition des deux globules polaires avec du 6-DMAP ou d'autres traitements tels que le choc thermique et les chocs de pression, soit par l'inhibition de l'extrusion du deuxième globule polaire d'œufs diploïdes fécondés avec du sperme triploïde, ou par inhibition de la première mitose.

Cette thèse a montré que les moules triploïdes produisent plus de fibres avec des propriétés mécaniques améliorées. Cependant, ces résultats ont été obtenus dans des conditions de laboratoire qui peuvent être très différentes de ce qui pourrait se passer sur des structures d'élevage aquacoles. En effet, l'attachement d'une moule sur les boudins est affectée par ses congénères qui ont tendance à s'attacher les unes aux autres, répartissant ainsi la charge sur plusieurs moules et un plus grand nombre de fibres de byssus, tandis que la charge elle-même augmente en raison de l'augmentation de la quantité de moules. Il serait donc pertinent de tester la force d'attachement des moules triploïdes en conditions réelles d'aquaculture. Cela pourrait être réalisé en fixant un dynamomètre sur la coquille de moules attachées à un boudin et en tirant un jusqu'au détachement de la moule. Cela informerait sur la force réelle requise pour détacher les moules et pourrait être effectué à plusieurs reprises au cours de l'année. Cela donnerait également des informations quant à la variation de la force d'attachement en aquaculture au cours de l'année. La relation avec la saison de reproduction et la disponibilité de la nourriture pourraient ainsi être également estimée.

De plus, les impacts réels sur la chute devraient être testés dans des conditions d'aquaculture pour confirmer les hypothèses présentées dans cette thèse. À cet égard, une méthode simple consisterait à placer des bassins ou des boîtes sous les boudins de moules avec un groupe de boudins ne comportant que des moules triploïdes et un autre groupe n'ayant que des contrôles diploïdes. Les bassins recueilleraient les moules tombées. Le comptage des

moules dans chaque bassin donnerait alors une bonne estimation du taux de détachement des moules triploïdes et diploïdes.

Effectuer une modélisation sur l'application économique et écologique des moules triploïdes serait également intéressant car cela donnerait une meilleure compréhension des revenus et des coûts potentiels de la production de moules triploïdes. Cela permettrait également d'avoir une meilleure vision des services écologiques potentiels des moules triploïdes et de déterminer l'empreinte carbone de leur production et de leur commercialisation, ce qui pourrait être un éventuel atout commercial pour les moules.

De plus, il serait important de tester si les moules triploïdes sont sensibles à la réversion de la triploïdie. En effet, si les moules triploïdes devaient être utilisées dans des conditions spécifiques, comme pour la régulation de l'eutrophisation dans une région d'où elles ne sont pas endémiques, il serait très préoccupant que la réversion de la triploïdie puisse se produire. Ainsi, la réversion de la triploïdie, sa survenue et les risques associés à une telle réversion doivent être bien compris.

Récemment, un intérêt croissant a été montré pour les fibres de byssus en tant que biomatériau afin de produire de nombreux nouveaux matériaux et produits (Lintz et al. 2013, Torres et al. 2012, Waite et Harrington 2022). Avec une production plus élevée de fibres possédant des propriétés mécaniques améliorées, les moules triploïdes pourraient être d'un grand intérêt pour le développement de nouveaux biomatériaux. Il serait donc pertinent de se pencher sur les usages potentiels des fibres triploïdes pour la commercialisation ou la transformation en nouveaux bioproduits. Cela pourrait être un moyen rentable pour les mytiliculteurs de tirer profit des déchets de la mytiliculture.

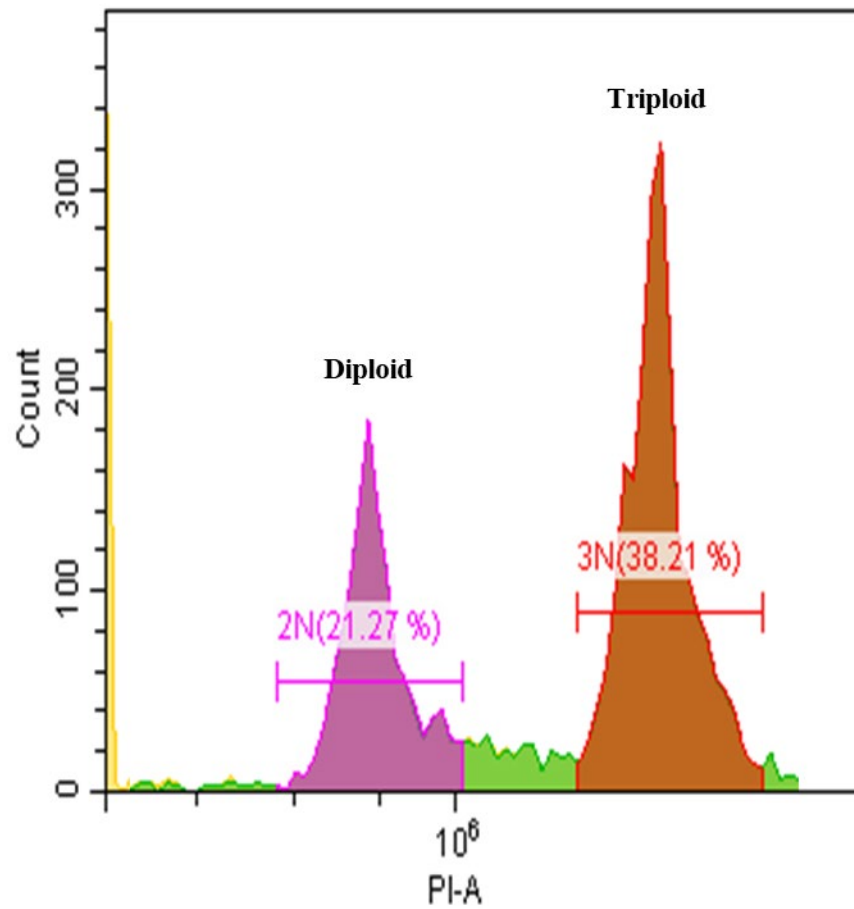
ANNEXES

ANNEXE I

FLOW CYTOMETRY SPECTRA OF DIPLOID AND TRIPLOID CELLS.

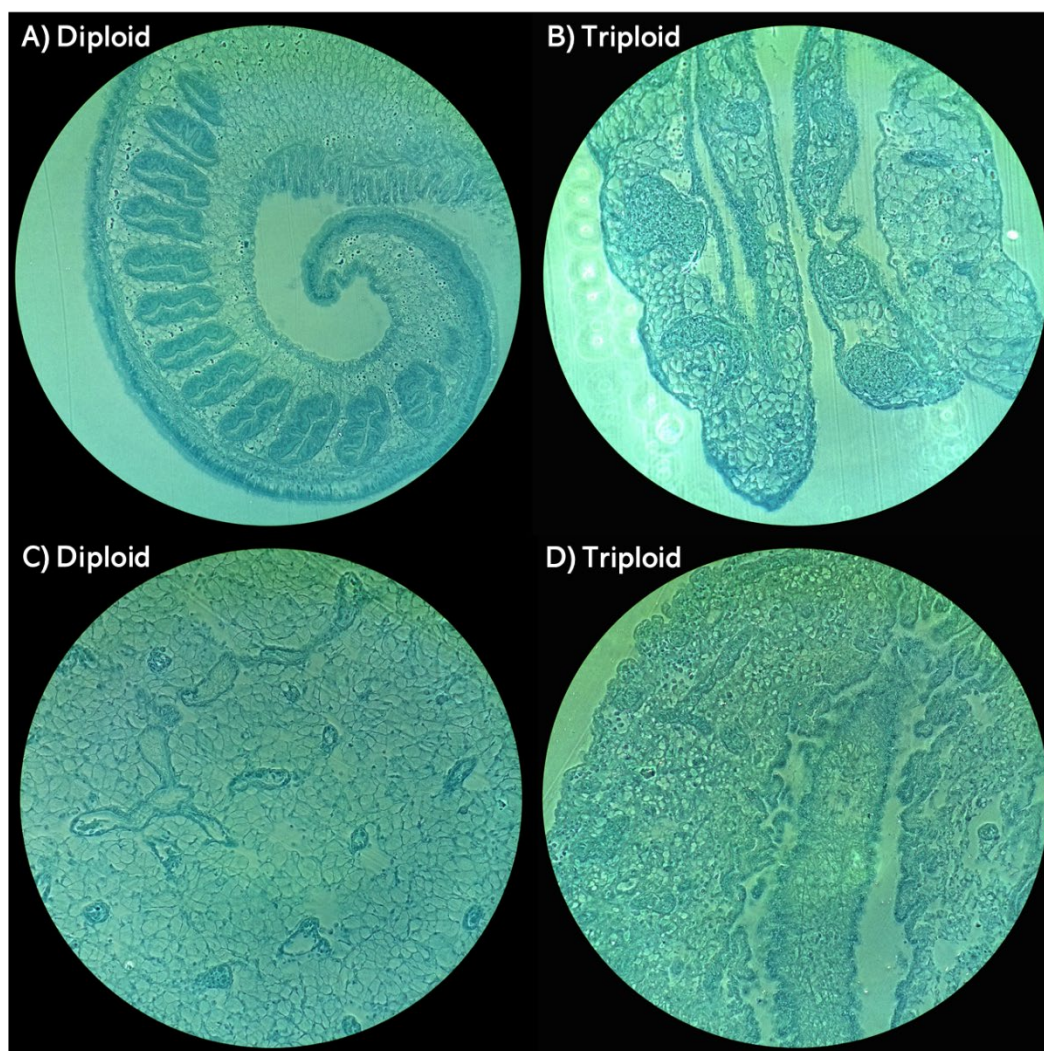
NUCLEUS WERE STAINED WITH THE FLORESCENT MARKER

PROPIDIUM IODIDE (PI-A)



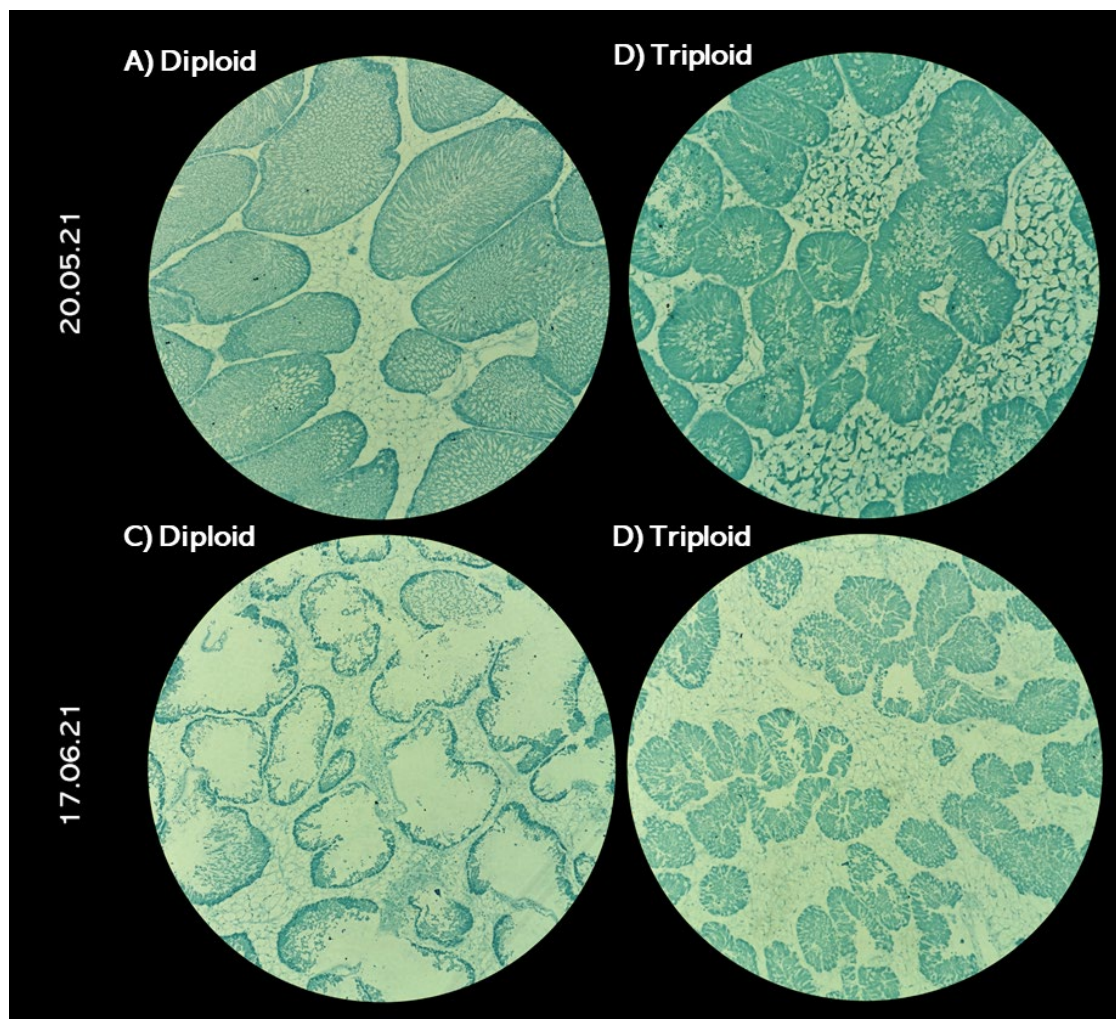
ANNEXE II

GONADS OF DIPLOID AND TRIPLOID FROM LABORATORY < 30 MM MUSSELS HARVESTED IN DECEMBER 2020. PICTURES A) AND B) ARE RESPECTIVELY DIPLOID AND TRIPLOID GONADS AT A MINOR DEVELOPMENTAL STAGE. PICTURES C) AND D) ARE RESPECTIVELY DIPLOID AND TRIPLOID GONADS AT AN UNDIFFERENTIATED DEVELOPMENTAL STAGE



ANNEXE III

HISTOLOGICAL CUTS OF DIPLOID AND TRIPLOID FROM > 50 MM MUSSELS AT TWO DIFFERENT TIME POINTS DURING THEIR SPAWNING SEASON. A) AND B) ARE HISTOLOGICAL CUTS OF A DIPLOID AND A TRIPLOID MUSSEL, RESPECTIVELY, HARVESTED ON 20.05.21. C) AND D) ARE HISTOLOGICAL CUTS OF A DIPLOID AND A TRIPLOID MUSSEL, RESPECTIVELY, HARVESTED ON 17.06.21



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACTION, I. (2020). World Fisheries and Aquaculture.
- Aldred, N., T. Wills, D. Williams, A. Clare. (2007). Tensile and dynamic mechanical analysis of the distal portion of mussel (*Mytilus edulis*) byssal threads. *Journal of the Royal Society Interface*, 4:1159-1167. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1026>
- Allendorf, F. W., Leary, R. F. (1984). Heterozygosity in gynogenetic diploids and triploids estimated by gene-centromere recombination rates. *Aquaculture*, 43(4), 413-420.
- Alexander, R. R. (1990). Mechanical strength of shells of selected extant articulate brachiopods: implications for Paleozoic morphologic trends. *Historical Biology*, 3(3), 169-188.
- Alfaro, A. C. (2006). Byssal attachment of juvenile mussels, *Perna canaliculus*, affected by water motion and air bubbles. *Aquaculture*, 255(1-4), 357-361. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.059>
- Allen, J., M. Cook, D. Jackson, S. Preston, E. Worth. (1976). Observations on the rate of production and mechanical properties of the byssus threads of *Mytilus edulis* L. *Journal of Molluscan Studies*, 42(2), 279-289. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065333>
- Allen Jr., S. K., Bushek, D. (1992). Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using “stripped” gametes. *Aquaculture*, 103(3-4), 241-251. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90170-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90170-P).

- Allen Jr., S. K., Gagnon, P. S., Hidu, H. (1982). Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. *Journal of Heredity*, 73(3), 421-428. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109691>
- Allen Jr, S. K., Hidu, H., Stanley, J. G. (1986)a. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *The Biological Bulletin*, 170(2), 198-210.
- Allen Jr, S. K. Downing, S. L. (1986)b. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 102(2-3): 197-208. [doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90176-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90176-0)
- Allen Jr, S. K. Downing, S. L. (1990). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 47(6): 1213-1222. doi.org/10.1139/f90-14
- Allen Jr, S. K., Guo, X., Burreson, G., Mann, R. (1996). Heteroploid mosaics and reversion among triploid oysters, *Crassostrea gigas*: fact or artifact. *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 514.
- Álvarez-Salgado, X. A., Fernández-Reiriz, M. J., Fuentes-Santos, I., Antelo, L. T., Alonso, A. A., Labarta, U. (2022). CO₂ budget of cultured mussels metabolism in the highly productive Northwest Iberian upwelling system. *Science of the Total Environment*, 849, 157867. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157867>
- Anderson, M., Gorley, R., Clarke, K, (2008). PERMANOVA+ for PRIMER. Guide to software and statistical methods. Plymouth: primer-E.

- Anderson, M. J., Robinson, J. (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian New Zealand Journal of Statistics*, 45(3), 301-318. <https://doi.org/10.1111/1467-842X.00285>
- Anderson, M. J., Walsh, D. C. (2013). PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing? *Ecological Monographs*, 83(4), 557-574. <https://doi.org/10.1890/12-2010.1>
- Androuin, T., Barbier, P., Forêt, M., Meziane, T., Thomas, M., Archambault, P., ... Olivier, F. (2022). Pull the trigger: interplay between benthic and pelagic cues driving the early recruitment of a natural bivalve assemblage. *Ecosphere*, 13(1), e03672. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3672>
- Arens, C. J., Paetzold, S. C., Davidson, J. (2011). The effect of high-pressure spraying for tunicate control on byssal thread characteristics in the cultured blue mussel (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758). *Aquatic Invasions*, 6(4), 507-510.
- Arnold, A. A., Byette, F., Séguin-Heine, M.-O., LeBlanc, A., Sleno, L., Tremblay, R., Pellerin, C., Marcotte, I. (2013). Solid-State NMR structure determination of whole anchoring threads from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biomacromolecules*, 14(1), 132-141. <https://doi.org/10.1021/bm301493u>
- Atalah, J., Fletcher, L. M., Davidson, I. C., South, P. M., Forrest, B. M. (2020). Artificial habitat and biofouling species distributions in an aquaculture seascape. *Aquaculture Environment Interactions*, 12, 495-509. <https://doi.org/10.3354/aei00380>
- Aubin, J., Fontaine, C., Callier, M., Roque d'orbcastel, E. (2018). Blue mussel (*Mytilus edulis*) bouchot culture in Mont-St Michel Bay: potential mitigation effects on climate

- change and eutrophication. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 23(5), 1030-1041. <https://doi.org/10.1007/s11367-017-1403-y>
- Babarro, J. M., E. Carrington. (2013). Attachment strength of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: effect of habitat and body size. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 443, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.035>
- Babarro, J. M., Reiriz, M. J. F. (2010). Secretion of byssal threads in *Mytilus galloprovincialis*: quantitative and qualitative values after spawning stress. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(1), 95-104. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0392-y>
- Babarro, J. M., M. J. F. Reiriz, U. Labarta. (2008). Secretion of byssal threads and attachment strength of *Mytilus galloprovincialis*: the influence of size and food availability. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4), 783-791. <https://doi.org/10.1017/S0025315408001367>
- Barber, B. J., Mann, R. L. (1991). Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, 10(2), 445.
- Barreto-Hernández, A., Velasco, L., Winkler, F. (2018). Effect of three triploidy induction methods on the growth and survival of larvae and post-larvae of the Caribbean scallop *Argopecten nucleus*. *Aquaculture Research*, 49(4), 1578-1587. <https://doi.org/10.1111/are.13612>

- Bassim, S., A. Tanguy, B. Genard, D. Moraga, R. Tremblay. (2014). Identification of *Mytilus edulis* genetic regulators during early development. *Gene*, 551(1), 65-78.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.042>
- Bayne, B. L. (1964). Primary and secondary settlement in *Mytilus edulis* L. (Mollusca). *The Journal of Animal Ecology*, 513-523. <https://doi.org/10.2307/2569>
- Bayne, B. L. (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2(1), 1-47. <https://doi.org/10.1080/00785326.1965.10409596>
- Bayne, B. L. (2017). Biology of oysters. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, volume 41, Academic press. London England.
- Bayne, B. L., A. J. Hawkins. (1997). Protein metabolism, the costs of growth, and genomic heterozygosity: experiments with the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Physiological Zoology*, 70(4), 391-402.
- Beaumont, A. R., Fairbrother, J. E. (1991). Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *Journal of Shellfish. Research*, 10, 1-18.
- Beaumont, A. R., Kelly, K. S. (1989). Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 132(1), 69-84.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90177-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90177-9)
- Bell, E., Gosline, J. (1996). Mechanical design of mussel byssus: material yield enhances attachment strength. *Journal of Experimental Biology*, 199(4), 1005-1017.
<https://doi.org/10.1242/jeb.199.4.1005>

- Bell, E. C., Gosline, J. M. (1997). Strategies for life in flow: tenacity, morphometry, and probability of dislodgment of two *Mytilus* species. *Marine Ecology Progress Series*, 159, 197-208. doi:10.3354/meps159197
- Benfey, T. J. (2016). Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 264-282. <https://doi.org/10.1111/raq.12092>
- Bertoldi, K., Boyce, M. C. (2007). Mechanics of the hysteretic large strain behavior of mussel byssus threads. *Journal of Materials Science*, 42(21), 8943-8956. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1649-z>
- Boghen, A. D. (1995). Cold-water aquaculture in Atlantic Canada (collective work). 2nd edition, 672p. ISBN 0-88659-033-7
- Bouhleb, Z., Genard, B., Ibrahim, N., Carrington, E., Babarro, J. M., Lok, A., Flores, A. A., Pellerin, C., Tremblay, R., Marcotte, I. (2017). Interspecies comparison of the mechanical properties and biochemical composition of byssal threads. *Journal of Experimental Biology*, 220(6), 984-994. <https://doi.org/10.1242/jeb.141440>
- Boulais, M., Demoy-Schneider, M., Alavi, S. M. H., Cosson, J. (2019). Spermatozoa motility in bivalves: Signaling, flagellar beating behavior, and energetics. *Theriogenology*, 136, 15-27. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.025
- Bourque, F., B. Myrand. (2006). Étude descriptive du dégrappage en milieu lagunaire aux Îles-de-la-Madeleine. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation.

- Brake, J., Davidson, J., Davis, J. (2002). Triploid induction of *Mytilus edulis* using 6-dimethylaminopurine. *Shellfish Research*, 21(2), 503-508.
- Brake, J., Davidson, J., Davis, J. (2004). Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 236(1-4), 179-191.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.016>
- Brand, S. C., Jeffs, A. G. (2022). The potential for proliferation of an invasive fanworm due to harvesting in mussel aquaculture. *Aquaculture*, 552, 738027.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738027>
- Brazeo, S. L., Carrington, E. (2006). Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *The Biological Bulletin*, 211(3), 263-274
- Brenko, M. H., Calabrese, A. (1969). The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 4(3), 224-226.
<https://doi.org/10.1007/BF00393897>
- Breton, S., Capt, C., Guerra, D., Stewart, D. (2018). Sex-determining mechanisms in bivalves. *Transitions Between Sexual Systems*, 165-192.
[doi:10.20944/preprints201706.0127.v1](https://doi.org/10.20944/preprints201706.0127.v1)
- Burkholder, J. M., Shumway, S. E. (2011). Bivalve shellfish aquaculture and eutrophication. *Shellfish Aquaculture and the Environment*, 155-215.
- Byette, F., Pellerin, C., Marcotte, I. (2014). Self-assembled pH-responsive films prepared from mussel anchoring threads. *Journal of Materials Chemistry B*, 2:6378-6386. doi:
[10.1039/c4tb01021c](https://doi.org/10.1039/c4tb01021c)

- Byette, F., Laventure, A., Marcotte, I., Pellerin, C. (2016). Metal–ligand interactions and salt bridges as sacrificial bonds in mussel byssus-derived materials. *Biomacromolecules*, 17(10), 3277-3286. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01010>
- Calderwood, J., O'Connor, N. E., Sigwart, J. D., Roberts, D. (2014). Determining optimal duration of seed translocation periods for benthic mussel (*Mytilus edulis*) cultivation using physiological and behavioural measures of stress. *Aquaculture*, 434, 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.023>
- Callam, B. R., Allen Jr., S. K., Frank-Lawale, A. (2016). Genetic and environmental influence on triploid *Crassostrea virginica* grown in Chesapeake Bay: growth. *Aquaculture*, 452, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.027>
- Callier, M. D., Richard, M., McKindsey, C. W., Archambault, P., Desrosiers, G. (2009). Responses of benthic macrofauna and biogeochemical fluxes to various levels of mussel biodeposition: an in situ “benthocosm” experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 58(10), 1544-1553. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.05.010>
- Callier, M. D., McKindsey, C. W., Desrosiers, G. (2008). Evaluation of indicators used to detect mussel farm influence on the benthos: two case studies in the Magdalen Islands, Eastern Canada. *Aquaculture*, 278(1-4), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.026>
- Cannuel, R., Beninger, P. G., McCombie, H., Boudry, P. (2009). Gill development and its functional and evolutionary implications in the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia:

- Mytilidae). *The Biological Bulletin*, 217(2), 173-188.
<https://doi.org/10.1086/BBLv217n2p173>
- Carregosa, V., Velez, C., Pires, A., Soares, A. M., Figueira, E., Freitas, R. (2014). Physiological and biochemical responses of the Polychaete *Diopatra neapolitana* to organic matter enrichment. *Aquatic Toxicology*, 155, 32-42.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.029>
- Carrington, E. (2002a). The ecomechanics of mussel attachment: from molecules to ecosystems. *Integrative Comparative Biology*, 42(4), 846-852.
<https://doi.org/10.1093/icb/42.4.846>
- Carrington, E. (2002b). Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: causes and consequences. *Limnology and Oceanography*, 47(6), 1723-1733.
<https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.6.1723>
- Carrington, E., and Gosline, J. M. (2004). Mechanical design of mussel byssus: load cycle and strain rate dependence. *American Malacological Bulletin*, 18(1/2), 135-142.
- Carrington, E., Waite, J. H., Sara, G., Sebens, K. P. (2015). Mussels as a model system for integrative ecomechanics. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 443-469.
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135049>
- Cartier, S., Pellerin, J., Fournier, M., Tamigneaux, E., Girault, L., Lemaire, N. (2004). Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture*, 241(1-4), 633-654. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.015

- Chávez-Villalba, J., Soyez, C., Huvet, A., Gueguen, Y., Lo, C., Le Moullac, G. (2011). Determination of gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Shellfish Research*, 30(2), 231-240. doi.org/10.2983/035.030.0206
- Christensen, P. B., Glud, R. N., Dalsgaard, T., Gillespie, P. (2003). Impacts of longline mussel farming on oxygen and nitrogen dynamics and biological communities of coastal sediments. *Aquaculture*, 218(1-4), 567-588. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00587-2
- Chung, E. Y., Koh, C. H., Park, G. M. (2007). Oogenesis, oocyte degeneration and sexual maturation in female *Cyclina sinensis* (Gmelin, 1971) (Bivalvia: *Veneridae*) in Korea. *Integrative Biosciences*, 11(2), 191-198. doi.org/10.1080/17386357.2007.9647335
- Clarke, K., Gorley, R. (2015). PRIMER v7: user manual/tutorial 3rd ed. Plymouth, United Kingdom: Primer-E Ltd
- Clarke, M. (1999). The effect of food availability on byssogenesis by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha Pallas*). *Journal of Molluscan Studies*, 65(3), 327-333. https://doi.org/10.1093/mollus/65.3.327
- Clarke, C. L., Therriault, T. W. (2007). Biological synopsis of the invasive tunicate *Styela clava* (Herdman 1881). Fisheries and Oceans Canada, Science Branch, Pacific Region, Pacific Biological Station.
- Clayden, S. R., Munro, M. C., Blaney, C. S., Vander Kloet, S. P. (2010). Vascular flora of the Atlantic Maritime Ecozone: some new perspectives. Assessment of species

diversity in the Atlantic Maritime Ecozone. Edited by DF McAlpine and IM Smith. NRC Research Press, Ottawa, Ont., Canada, 197-213.

CleanFish:

<https://static1.squarespace.com/static/5c478736f793922c09e8aea5/t/5cd619dcb208fc87eaf4d151/1557535199115/Saltspring+Island+Mussels+sales+sheet+2019.pdf>

Consulted may 2022

Coe, W. R. (1943). Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *The Quarterly Review of Biology*, 18(2), 154-164.

Cole, A., Denny, M. (2014). United we fail: group versus individual strength in the California sea mussel, *Mytilus californianus*. *The Biological Bulletin*, 227(1), 61-67.
<https://doi.org/10.1086/BBLv227n1p61>

Comeau, L., Drapeau, A., Landry, T., Davidson, J. (2008a). Development of longline mussel farming and the influence of sleeve spacing in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture*, 281(1-4), 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.031>

Comeau, L. A., Pernet, F., Tremblay, R., Bates, S. S., LeBlanc, A. (2008b). Comparison of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and blue mussel (*Mytilus edulis*) filtration rates at low temperatures. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2810,1-17.

Comeau, L. A., R. Filgueira, T. Guyondet, Sonier, R. 2015. The impact of invasive tunicates on the demand for phytoplankton in longline mussel farms. *Aquaculture*, 441, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.018>

- Comeau, L.A., Filgueira, R., Davidson, J.D.P., Nadeau, A., Sonier, R., Guyondet, T., Ramsay, A., Davidson, J. (2017). Population structure and grazing capacity of cultivated mussels in Prince Edward Island, Canada. *Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Science*. Moncton, N.B. Fisheries and Oceans Canada, 3228 23 p.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., ... Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014-1015. DOI: 10.1126/science.1167755
- Coombs, T. L., Keller, P. J. (1981). *Mytilus* byssal threads as an environmental marker for metals. *Aquatic Toxicology*, 1(5-6), 291-300.
- Correia-Martins, A., Tremblay, R., Bec, B., Roques, C., Atteia, A., Gobet, A., ... Lagarde, F. (2022). Failure of bivalve foundation species recruitment related to trophic changes during an extreme heatwave event. *Marine Ecology Progress Series*, 691, 69-82. <https://doi.org/10.3354/meps14060>
- Cox, E. S., Smith, M. S. R., Nell, J. A., Maguire, G. B. (1996). Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 197(1), 101-120. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00147-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00147-6)
- Cranford, P. J. (2019). Magnitude and extent of water clarification services provided by bivalve suspension feeding. In *Goods and services of marine bivalves* (pp. 119-141). Springer, Cham.

- Cranford, P. J., Kamermans, P., Krause, G., Mazurié, J., Buck, B. H., Dolmer, P., ... Strand, Ø. (2012). An ecosystem-based approach and management framework for the integrated evaluation of bivalve aquaculture impacts. *Aquaculture Environment Interactions*, 2(3), 193-213. <https://doi.org/10.3354/aei00040>
- Croll, R. P., Wang, C. (2007). Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture*, 272(1-4), 76-86. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.031
- Cusson, M., Tremblay, R., Daigle, G., Roussy, M. (2005). Modeling the depuration potential of blue mussels (*Mytilus* spp.) in response to thermal shock. *Aquaculture*, 250(1-2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.045>
- Davidson, J. D. (2015). Optimal treatment regimes from productivity and economic standpoints: The management of suspended mussel lines using high pressure water treatments for the vase tunicate, *Ciona intestinalis*. (Master Thesis, University of Prince Edward Island).
- D'Amours, O., Archambault, P., McKindsey, C. W., Johnson, L. E. (2008). Local enhancement of epibenthic macrofauna by aquaculture activities. *Marine Ecology Progress Series*, 371, 73-84. <https://doi.org/10.3354/meps07672>
- da Silva, P. M., Soudant, P., Carballal, M. J., Lambert, C., Villalba, A. (2005). Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(1-2), 133-139.

- David, M.B. and Gentry, L.E. (2000). Anthropogenic inputs of nitrogen and phosphorus and riverine export for Illinois, USA. *Journal of Environmental Quality*, 29(2), 494-508. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900020018x>
- De Blok, J. W., & Tan-Maas, M. (1977). Function of byssus threads in young postlarval *Mytilus*. *Nature*, 267(5611), 558-558. <https://doi.org/10.1038/267558a0>
- Degtyar, E., Harrington, M. J., Politi, Y., Fratzl, P. (2014). The mechanical role of metal ions in biogenic protein-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(45), 12026-12044.
- De La Rosa, L., Velasco, L., Winkler, F. (2020). Effects of triploidy induction on productive traits of the Caribbean pectinid, *Argopecten nucleus* (Mollusca: Bivalvia). *Aquaculture*, 521, 735083. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735083>
- de Lacerda, L. D., Vaisman, A. G., Maia, L. P., e Silva, C. A. R., Cunha, E. M. S. (2006). Relative importance of nitrogen and phosphorus emissions from shrimp farming and other anthropogenic sources for six estuaries along the NE Brazilian coast. *Aquaculture*, 253(1-4), 433-446. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.005>
- DeMartini, D. G., Errico, J. M., Sjoestroem, S., Fenster, A., Waite, J. H. (2017). A cohort of new adhesive proteins identified from transcriptomic analysis of mussel foot glands. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(131), 20170151.
- Desrosiers, R. R., Gérard, A., Peignon, J.-M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P., Dubé, F. (1993). A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *Journal of Experimental*

Marine Biology Ecology, 170(1), 29-43. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90127-A](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90127-A)

De Vooy, C. G. N. (1976). The influence of temperature and time of year on the oxygen uptake of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 36(1), 25-30.

DFO Project 17-G-03: <https://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/rp-pr/acrdp-pcrda/projects-projets/17-1-G-03-eng.html>

Dheilly, N. M., Jouaux, A., Boudry, P., Favrel, P., Lelong, C. (2014). Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas*: towards an understanding of partial sterility associated with triploidy. *PLOS One*, 9(11), e112094. doi.org/10.1371/journal.pone.0112094

Diaz, R. J., Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321(5891), 926-929. DOI: 10.1126/science.1156401

Dolmer, P., Svane, I. B. (1994). Attachment and orientation of *Mytilus edulis* L. in flowing water. *Ophelia*, 40(1), 63-74. <https://doi.org/10.1080/00785326.1994.10429551>

Downing, S. L., Allen Jr., S. K. (1987). Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 6(1), :1-15. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90332-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90332-2)

Drapeau, A., L. Comeau, T. Landry, H. Stryhn, Davidson, J. (2006). Association between longline design and mussel productivity in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture*, 261(3), 879-889. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.045>

Drouin, A., Archambault, P., Clynick, B., Richer, K., McKindsey, C. W. (2015). Influence of mussel aquaculture on the distribution of vagile benthic macrofauna in îles de la

- Madeleine, eastern Canada. *Aquaculture Environment Interactions*, 6(2), 175-183.
<https://doi.org/10.3354/aei00123>
- Duchemin, M. B., Fournier, M., Auffret, M. (2007). Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 264(1-4), 73-81.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.030>
- Dufresne, L., Neant, I., St-Pierre, J., Dube, F., Guerrier, P. (1991). Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryos. *Journal of Cell Science*, 99(4), 721-730.
- Duinker, A., Håland, L., Hovgaard, P., Mortensen, S. (2008). Gonad development and spawning in one and two year old mussels (*Mytilus edulis*) from Western Norway. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(7), 1465-1473. [doi:10.1017/S0025315408002130](https://doi.org/10.1017/S0025315408002130)
- Dunstan, G. A., Elliott, N. G., Appleyard, S. A., Holmes, B. H., Conod, N., Grubert, M. A., Cozens, M. A. (2007). Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) to market size: Commercial implications. *Aquaculture*, 271(1-4), 130-141.
doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.023
- El-Wazzan, E., Scarpa, J. (2009). Comparative growth of triploid and diploid juvenile hard clams *Mercenaria mercenaria notata* under controlled laboratory conditions. *Aquaculture*, 289(3-4), 236-243.

- Engel, J., Chen, H. T., Prockop, D. J., Klump, H. (1977). The triple helix \rightleftharpoons coil conversion of collagen-like polytripeptides in aqueous and nonaqueous solvents. Comparison of the thermodynamic parameters and the binding of water to (L-Pro-L-Pro-Gly)_n and (L-Pro-L-Hyp-Gly)_n. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 16(3), 601-622.
- Erlandson, J. M. (1988). The role of shellfish in prehistoric economies: a protein perspective. *American Antiquity*, 53(1), 102-109. <https://doi.org/10.2307/281156>
- Eyster, L. S., Pechenik, J. A. (1988). Attachment of *Mytilus edulis* L. larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 114(2-3), 99-110. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90131-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90131-1)
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(1-2), 458-470. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.038>
- Filgueira, R., Byron, C. J., Comeau, L. A., Costa-Pierce, B., Cranford, P. J., Ferreira, J. G., ... Strohmeier, T. (2015). An integrated ecosystem approach for assessing the potential role of cultivated bivalve shells as part of the carbon trading system. *Marine Ecology Progress Series*, 518, 281-287. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps11048>
- Filgueira, R., Strohmeier, T., Strand, Ø. (2019). Regulating services of bivalve molluscs in the context of the carbon cycle and implications for ecosystem valuation. In *Goods and services of marine bivalves* (pp. 231-251). Springer, Cham.

Fisheries Then and Now:

https://www.collectionscanada.gc.ca/eppp-archive/100/200/301/ic/can_digital_collections/fisheries_then/scitech/muss.asp.
Consulté en novembre 2022.

Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., De Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649-669.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>

Fitzer, S. C., Vittert, L., Bowman, A., Kamenos, N. A., Phoenix, V. R., Cusack, M. (2015). Ocean acidification and temperature increase impact mussel shell shape and thickness: problematic for protection? *Ecology and Evolution*, 5(21), 4875-4884.
<https://doi.org/10.1002/ece3.1756>

Forêt, M., Barbier, P., Tremblay, R., Meziane, T., Neumeier, U., Duvieilbourg, E., Olivier, F. (2018a). Trophic cues promote secondary migrations of bivalve recruits in a highly dynamic temperate intertidal system. *Ecosphere*, 9(12), e02510.
<https://doi.org/10.1002/ecs2.2510>

Forêt, M., Tremblay, R., Neumeier, U., Olivier, F. (2018b). Temporal variation of secondary migrations potential: concept of temporal windows in four commercial bivalve species. *Aquatic Living Resources*, 31, 19. <https://doi.org/10.1051/alr/2018007>

Forrest, B. M., Atalah, J. (2017). Significant impact from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* biofouling on aquaculture production of green-lipped mussels in New Zealand. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 115-126.
<https://doi.org/10.3354/aei00220>

- Fréchette, M., Bergeron, P., Gagnon, P. (1996). On the use of self-thinning relationships in stocking experiments. *Aquaculture*, 145(1-4), 91-112. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01349-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01349-X)
- Fréchette, M., M. Lachance-Bernard, Daigle, G. (2010). Body size, population density and factors regulating suspension-cultured blue mussel (*Mytilus spp.*) populations. *Aquatic Living Resources*, 23(3), :247-254. <https://doi.org/10.1051/alr/2010028>
- Fréchette, M. (2012). Self-thinning, biodeposit production, and organic matter input to the bottom in mussel suspension culture. *Journal of Sea Research*, 67(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.08.006>
- Fuller, S. C., Lutz, R. A. (1988). Early shell mineralogy, microstructure, and surface sculpture in five mytilid species. *Malacologia*, 29(2), 363-371.
- Fry, J. M. (2012). Carbon footprint of Scottish suspended mussels and intertidal oysters. *SARF078*.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L. (2003). Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134(2), 189-198. [doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00248-X](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00248-X)
- Gabbott, P. A. (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In *The mollusca* (pp. 165-217). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751402-4.50012-1>

- Gagnon, M. (2019). Self-organization and mechanical properties of mussel culture suspensions: A critical review. *Aquacultural Engineering*, 87, 102024. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102024>
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), 1049-1051. <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>
- Garen, P., Robert, S., Bougrier, S. (2004). Comparison of growth of mussel, *Mytilus edulis*, on longline, pole and bottom culture sites in the Pertuis Breton, France. *Aquaculture*, 232(1-4), 511-524. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00535-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00535-0)
- Garner, Y. L., Litvaitis, M. K. (2013). Effects of injured conspecifics and predators on byssogenesis, attachment strength and movement in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 448, 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.07.004>
- Gérard, A., Ledu, C., Phelipot, P., Naciri-Graven, Y. (1999). The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture*, 174(3-4), 229-242.
- Gilek, M., M. Tedengren, Kautsky, N. (1992). Physiological performance and general histology of the blue mussel, *Mytilus edulis* L., from the Baltic and North seas. *Netherlands Journal of Sea Research*, 30, 11-21. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(92\)90041-C](https://doi.org/10.1016/0077-7579(92)90041-C)
- Giles, H., Pilditch, C. A., Bell, D. G. (2006). Sedimentation from mussel (*Perna canaliculus*) culture in the Firth of Thames, New Zealand: impacts on sediment oxygen and

nutrient fluxes. *Aquaculture*, 261(1), 125-140.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.048>

Gittenberger, A. (2009). Invasive tunicates on Zeeland and Prince Edward Island mussels, and management practices in The Netherlands. *Aquatic Invasions*, 4(1), 279-281. doi: 10.3391/ai.2009.4.1.28

Gosling, E. M. (1992). Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 25, 1-20.

Gosling, E. (2015). Marine bivalve molluscs. John Wiley & Sons. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00032-0)

Gosling, E. M., Nolan, A. (1989). Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*, 78(3-4), 223-228. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90100-2)

Grey, M., Lelievre, P. G., Boulding, E. G. (2007). Selection for prey shell thickness by the naticid gastropod *Euspira lewisii* (Naticidae) on the bivalve *Protothaca staminea* (Veneridae). *Veliger*, 48(4), 317-322.

Griffiths, C. L., King, J. A. (1979). Energy expended on growth and gonad output in the ribbed mussel *Aulacomya ater*. *Marine Biology*, 53(3), 217-222. <https://doi.org/10.1007/BF00952429>

Guiñez, R. (2005a). A review on self-thinning in mussels. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 40(1), 1-6.

Guiñez, R. (2005b). Layering, the effective density of mussels and mass-density boundary curves. *Oikos*, 110(1), 186-190. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13870.x>

- Guo, X., Allen Jr, S. K. (1994a). Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *The Biological Bulletin*, 187(3), 309-318. <https://doi.org/10.2307/1542288>
- Guo, X., Allen Jr, S. K. (1994b). Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3(1), 42-50.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W. K., Cooper, K., Jr, S. K. A. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution*, 52(2), 394-402. doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01640.x
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., ... Soudant, P. (2010). Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 96-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.006>
- Hagenau, A., P. Papadopoulos, F. Kremer, Scheibel, T. (2011). Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads. *Journal of Structural Biology*, **175(3)**, 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.05.016>
- Hand, R. E., Nell, J. A., Reid, D. D., Smith, I. R., Maguire, G. B. (1999). Studies on triploid oysters in Australia: effect of initial size on growth of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). *Aquaculture Research*, 30(1), 34-42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00296.x>

- Harrington, M. J., H. S. Gupta, P. Fratzl, Waite, J. H. (2009). Collagen insulated from tensile damage by domains that unfold reversibly: In situ X-ray investigation of mechanical yield and damage repair in the mussel byssus. *Journal of Structural Biology*, 167(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.001>
- Harrington, M. J., . Waite, J. H. (2007). Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *Journal of Experimental Biology*, 210(24), 4307-4318. <https://doi.org/10.1242/jeb.009753>
- Harrington, M. J., Waite, J. H. (2008). pH-dependent locking of giant mesogens in fibers drawn from mussel byssal collagens. *Biomacromolecules*, 9(5), 1480-1486. <https://doi.org/10.1021/bm8000827>
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. (1985). Seasonal variation in the relative utilization of carbon and nitrogen by the mussel *Mytilus edulis*: budgets, conversion efficiencies and maintenance requirements. *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf, 25(2), 181-188.
- Hawkins, A. (1985). Relationships between the synthesis and breakdown of protein, dietary absorption and turnovers of nitrogen and carbon in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Oecologia*, 66(1), 42-49.
- Hawkins, A., J. Widdows, Bayne, B. (1989). The relevance of whole-body protein metabolism to measured costs of maintenance and growth in *Mytilus edulis*. *Physiological Zoology*, 62(3), 745-763.
- Hedrick, P. W., Hedgecock, D. (2010). Sex determination: genetic models for oysters. *Journal of Heredity*, 101(5), 602-611. doi.org/10.1093/jhered/esq065

- Hedlund, J., Andersson, M., Fant, C., Bitton, R., Bianco-Peled, H., Elwing, H., Berglin, M. (2009). Change of colloidal and surface properties of *Mytilus edulis* foot protein 1 in the presence of an oxidation (NaIO₄) or a complex-binding (Cu²⁺) agent. *Biomacromolecules*, 10(4), 845-849. <https://doi.org/10.1021/bm801325j>
- Helm, M. M., N. Bourne, Lovatelli, A. (2004). Hatchery culture of bivalves: A practical manual. Rome, FAO *Fisheries Technical*, 177p. <https://www.fao.org/3/y5720e/y5720e00.htm>. Consulted may 2022
- Hennebicq, R., G. Fabra, C. Pellerin, I. Marcotte, B. Myrand, Tremblay, R. (2013). The effect of spawning of cultured mussels (*Mytilus edulis*) on mechanical properties, chemical and biochemical composition of byssal threads. *Aquaculture*, 410, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.011>
- Holten-Andersen, N., Mates, T. E., Toprak, M. S., Stucky, G. D., Zok, F. W., Waite, J. H. (2009). Metals and the integrity of a biological coating: the cuticle of mussel byssus. *Langmuir*, 25(6), 3323-3326. <https://doi.org/10.1021/la8027012>
- Honkoop, P. (2003). Physiological costs of reproduction in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Oecologia*, 135(2), 176-183. doi: 10.1007/s00442-002-1172-5
- Huang, C. H., Lin, H. J., Huang, T. C., Su, H. M., Hung, J. J. (2008). Responses of phytoplankton and periphyton to system-scale removal of oyster-culture racks from a eutrophic tropical lagoon. *Marine Ecology Progress Series*, 358, 1-12. <https://doi.org/10.3354/meps07465>

- Hulot, V., Saulnier, D., Lafabrie, C., Gaertner-Mazouni, N. (2020). Shellfish culture: a complex driver of planktonic communities. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 33-46. <https://doi.org/10.1111/raq.12303>
- Husband, B. C. (2004). The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 537-546. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00339.x>
- Hussain, M. G., Chatterji, A., McAndrew, B., Johnstone, R. (1991). Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theoretical Applied Genetics*, 81(1), 6-12.
- Iglesias, J. I. P., Navarro, E. (1991). Energetics of growth and reproduction in cockles (*Cerastoderma edule*): seasonal and age-dependent variations. *Marine Biology*, 111(3), 359-368. <https://doi.org/10.1007/BF01319407>
- Jansen, H. M., Strand, Ø., Broekhoven, W. V., Strohmeier, T., Verdegem, M. C., Smaal, A. C. (2019). Feedbacks from filter feeders: review on the role of mussels in cycling and storage of nutrients in oligo-meso-and eutrophic cultivation areas. *Goods and Services of Marine Bivalves*, 143-177.
- Jansen, H. M. (2012). *Bivalve nutrient cycling* (Doctoral dissertation, PhD thesis Wageningen University).
- Jehle, F., Priemel, T., Strauss, M., Fratzl, P., Bertinetti, L., Harrington, M. J. (2021). Collagen pentablock copolymers form smectic liquid crystals as precursors for mussel byssus fabrication. *ACS Nano*, 15(4), 6829-6838. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10457>

- Jeung, H. D., Keshavmurthy, S., Lim, H. J., Kim, S. K., Choi, K. S. (2016). Quantification of reproductive effort of the triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* raised in intertidal rack and bag oyster culture system off the west coast of Korea during spawning season. *Aquaculture*, 464, 374-380. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.010
- Jiang, W., Li, G., Xu, G., Lin, Y., Qing, N. (1993). Growth of the induced triploid pearl oyster, *Pinctada martensii* (D.). In *Genetics in Aquaculture* (pp. 245-253). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81527-9.50027-0
- Johnson, E. H. (2020). Experimental tests of bivalve shell shape reveal potential tradeoffs between mechanical and behavioral defenses. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76358-x
- Jordan, T. E., Valiela, I. (1982). A nitrogen budget of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*, and its significance in nitrogen flow in a New England salt marsh 1. *Limnology and Oceanography*, 27(1), 75-90. https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.1.0075
- Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdain, P., Mathieu, M., Kellner, K. (2010). Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 395(1-2), 162-170. doi.org/10.1016/j.jembe.2010.08.030
- Kamermans, P., Capelle, J. J. (2019). Provisioning of mussel seed and its efficient use in culture. In *Goods and services of marine bivalves* (pp. 27-49). Springer, Cham.

- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D. W., Lucas, J. S. (2001). Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*): II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture*, 203(1-2), 195-216. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00623-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00623-8)
- Kiyomoto, M., Komaru, A., Scarpa, J., Wada, K. T., Danton, E., Awaji, M. (1996). Abnormal gametogenesis, male dominant sex ratio, and Sertoli cell morphology in induced triploid mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Zoological Science*, 13(3), 393-402.
- Komaru, A., Uchimura, Y., Ieyama, H., Wada, K. T. (1988). Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69(3-4): 201-209. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90329-8)
- Komaru, A. (1989). Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 55(3), 447-452
- Komaru, A., Scarpa, J., Wada, K. T. (1995). Ultrastructure of spermatozoa in induced tetraploid mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Journal of Shellfish Research*, 14, 405-410.
- Komaru, A. Wada, K. (1994). Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids. *Aquaculture*, 120(1-2), 61-70. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90222-4)

- Komaru, A., Konishi, K., Wada, K. T. (1994). Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 123(3-4), 217-222. doi.org/10.1016/0044-8486(94)90060-4
- Krampah, E. A., Yankson, K., Blay, J. (2016). Aspects of reproduction of the brown mussel *Perna perna* at the Iture rocky beach near Cape Coast, Ghana. *African Journal of Marine Science*, 38(4), 503-512. doi.org/10.2989/1814232X.2016.1247751
- Krauss, S., Metzger, T. H., Fratzl, P., Harrington, M. J. (2013). Self-repair of a biological fiber guided by an ordered elastic framework. *Biomacromolecules*, 14(5), 1520-1528. https://doi.org/10.1021/bm4001712
- Kuriakose, P. S., Appukuttan, K. K. (1996). Technology of mussel culture. *CMFRI Bulletin-Artificial reefs and Seafarming technologies*, 48, 70-75. http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/2847
- 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. *Aquatic Living Resources*, 24(3), 283-293. doi: 10.1051/alr/2011115
- 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. *Aquatic Biology*, 2(2), 119-129. doi.org/10.3354/ab00041

- Lachance-Bernard, M., Daigle, G., Himmelman, J. H., Fréchette, M. (2010). Biomass–density relationships and self-thinning of blue mussels (*Mytilus* spp.) reared on self-regulated longlines. *Aquaculture*, 308(1-2), 34-43.
- Lacoste, E., Gueguen, Y., Le Moullac, G., Koua, M. S., Gaertner-Mazouni, N. (2014). Influence of farmed pearl oysters and associated biofouling communities on nutrient regeneration in lagoons of French Polynesia. *Aquaculture Environment Interactions*, 5(3), 209-219. <https://doi.org/10.3354/aei00107>
- Lane, D. J. W., Beaumont, A. R., Hunter, J. R. (1985). Byssus drifting and the drifting threads of the young post-larval mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 84(3), 301-308. <https://doi.org/10.1007/BF00392500>
- LeBlanc, N., Davidson, J., Tremblay, R., McNiven, M., Landry, T. (2007). The effect of anti-fouling treatments for the clubbed tunicate on the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 264(1-4), 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.027>
- Lee, P. O., McLellan, S. L., Graham, L. E., Young, E. B. (2015). Invasive dreissenid mussels and benthic algae in Lake Michigan: characterizing effects on sediment bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(1), 1-12.
- Lenoir, F., Robbins, I., Mathieu, M., Lubet, P., Gabbott, P. A. (1989). Isolation, characterization and glucose metabolism of glycogen cells (= vesicular connective-tissue cells) from the labial palps of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 101(4), 495-501. <https://doi.org/10.1007/BF00541651>

- Li, Y. F., Yang, X. Y., Cheng, Z. Y., Wang, L. Y., Wang, W. X., Liang, X., Yang, J. L. (2020). Near-future levels of ocean temperature weaken the byssus production and performance of the mussel *Mytilus coruscus*. *Science of The Total Environment*, 733, 139347.
- Lindahl, O., Hart, R., Hernroth, B., Kollberg, S., Loo, L. O., Olrog, L., ... Syversen, U. (2005). Improving marine water quality by mussel farming: a profitable solution for Swedish society. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(2), 131-138. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-34.2.131>
- Lintz, E. S., Scheibel, T. R. (2013). Dragline, egg stalk and byssus: a comparison of outstanding protein fibers and their potential for developing new materials. *Advanced Functional Materials*, 23(36), 4467-4482. <https://doi.org/10.1002/adfm.201300589>
- Liu, W., Heasman, M., Simpson, R. (2009). Growth and reproductive performance of triploid and diploid blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814). *Aquaculture Research*, 40(2), 188-203. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02082.x
- Lohrmann, K. B., Von Brand, E. (2005). Histological study of gonads in triploid scallops, *Argopecten purpuratus*. *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 369-375. [doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[369:HSOGIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[369:HSOGIT]2.0.CO;2)
- Lowe, D. M., Moore, M. N., Bayne, B. L. (1982). Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62(1), 133-145. [doi:10.1017/S0025315400020166](https://doi.org/10.1017/S0025315400020166)

- Lubet, P., Besnard, J. Y., Faveris, R., Robbins, I. (1987). Physiologie de la reproduction de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Océanis (Paris)*, 13(3), 265-290.
- Lucas, J. M., E. Vaccaro, Waite, J. H. (2002). A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Biology*, **205**(12), 1807-1817. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.12.1807>
- Ma, P., Wang, Z., Yu, R. (2018). Triploid induction by hyperosmotic shock in the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 922-933. <https://doi.org/10.1111/jwas.12583>
- Maldonado-Amparo, R., Ramírez, J. L., Ávila, S., Ibarra, A. M. (2004). Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 235(1-4), 185-205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.014>
- 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 ed. The Canadian Institute for Research on Regional Development 255-296.
- Mallia, J. V., Thomas, P., Muthiah, P. (2006). Induced triploidy in the edible oyster, *Crassostrea madrasensis* by temperature shock. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 48(2), 249-152.
- Martel, A. L., Tremblay, R., Toupoint, N., Olivier, F., Myrand, B. (2014). Veliger size at metamorphosis and temporal variability in prodissoconch II morphometry in the blue

- mussel (*Mytilus edulis*): potential impact on recruitment. *Journal of Shellfish Research*, 33(2), 443-455. <https://doi.org/10.2983/035.033.0213>
- Martinez Rodriguez, N. R., Das, S., Kaufman, Y., Israelachvili, J. N., Waite, J. H. (2015). Interfacial pH during mussel adhesive plaque formation. *Biofouling*, 31(2), 221-227. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1026337>
- 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. *Canadian Journal of Zoology*, 89(7), 622-646. <https://doi.org/10.1139/z11-037>
- McKindsey, C. W., Archambault, P., Simard, N. (2012). Spatial variation of benthic infaunal communities in baie de Gaspé (eastern Canada)—Influence of mussel aquaculture. *Aquaculture*, 356, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.037>
- Miehls, A. L. J., Mason, D. M., Frank, K. A., Krause, A. E., Peacor, S. D., Taylor, W. W. (2009). Invasive species impacts on ecosystem structure and function: A comparison of Oneida Lake, New York, USA, before and after zebra mussel invasion. *Ecological Modelling*, 220(22), 3194-3209. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.07.020>
- Mirto, S., Danovaro, R., Mazzola, A. (2000). Microbial and meiofaunal response to intensive mussel-farm biodeposition in coastal sediments of the western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 40(3), 244-252. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00209-X)

- Mita, M., Nakamura, M. (1998). Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: an approach based on echinoid phylogeny. *Zoological Science*, 15(1), 1-10. doi.org/10.2108/zsj.15.1
- Miyagoshi, M., Fujikawa-Yamamoto, K. (2006). The reversion to diploid cells from established triploid V79 cells. *Cell Proliferation*, 39(5), 421-428. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2006.00398.x
- Møhlenberg, F., Riisgård, H. U. (1978). Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. *Ophelia*, 17(2), 239-246. https://doi.org/10.1080/00785326.1978.10425487
- Moeser, G. M., Carrington, E. (2006). Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *Journal of Experimental Biology*, 209(10), 1996-2003. doi: 10.1242/jeb.02234
- Murphy, A. E., Kolkmeier, R., Song, B., Anderson, I. C., Bowen, J. (2019). Bioreactivity and microbiome of biodeposits from filter-feeding bivalves. *Microbial ecology*, 77(2), 343-357. https://doi.org/10.1007/s00248-018-01312-4
- 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. *Marine Ecology Progress Series*, 197, 193-207. doi:10.3354/meps197193
- Neant, I., Guerrier, P. (1988). 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Experimental Cell Research*, 176(1), 68-79. https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90121-8

- Nell, J., Hand, R., Goard, L., McAdam, S., Maguire, G. (1996). Studies on triploid oysters in Australia: Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploidy induction in Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture Research*, 27(9), 689-698. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00777.x>
- Nell, J. A. (2002). Farming triploid oysters. *Aquaculture*, 210(1-4), 69-88. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00861-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00861-4)
- Newell, R. I., Hilbish, T. J., Koehn, R. K., Newell, C. J. (1982). Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *The Biological Bulletin*, 162(3), 299-310.
- Newell, R. I., Koch, E. W. (2004). Modeling seagrass density and distribution in response to changes in turbidity stemming from bivalve filtration and seagrass sediment stabilization. *Estuaries*, 27(5), 793-806. <https://doi.org/10.1007/BF02912041>
- Newell, C. R., Wildish, D. J., MacDonald, B. A. (2001). The effects of velocity and seston concentration on the exhalant siphon area, valve gape and filtration rate of the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(1), 91-111
- Nielsen, P., Cranford, P. J., Maar, M., Petersen, J. K. (2016). Magnitude, spatial scale and optimization of ecosystem services from a nutrient extraction mussel farm in the eutrophic Skive Fjord, Denmark. *Aquaculture Environment Interactions*, 8, 311-329. DOI: <https://doi.org/10.3354/aei00175>

- Nielsen, T. G., Maar, M. (2007). Effects of a blue mussel *Mytilus edulis* bed on vertical distribution and composition of the pelagic food web. *Marine Ecology Progress Series*, 339, 185-198. <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v339/p185-198/>
- Norén, F., Haamer, J., Lindahl, O. (1999). Changes in the plankton community passing a *Mytilus edulis* mussel bed. *Marine Ecology Progress Series*, 191, 187-194. <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v191/p187-194/>
- Norkko, J., Pilditch, C. A., Thrush, S. F., Wells, R. M. G. (2005). Effects of food availability and hypoxia on bivalves: the value of using multiple parameters to measure bivalve condition in environmental studies. *Marine Ecology Progress series*, 298, 205-218. doi:10.3354/meps298205
- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P. (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, 282(1-4), 124-129. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.026
- Osterheld, K., Davidson, J., Comeau, L. A., Hori, T., Belzile, C., Tremblay, R. (2021). Efficiency of various strategies to induce triploidy in *Mytilus edulis* in relation to their first-stage performance. *Journal of Applied Aquaculture*, 1-16. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1985032>
- Osterheld, K., Davidson, J., Comeau, L., Hori, T., Babarro, J. M. F., Marcotte, I., Pellerin, C., Tremblay, R. (2022). Triploidy in *Mytilus edulis* impacts the mechanical

properties of byssal threads. Submitted and accepted with minor corrections in *Aquaculture*. submitted

- Otto, S. P., Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 401-437.
- Park, J. J., Shin, Y. K., Hung, S. S., Romano, N., Cheon, Y. P., Kim, J. W. (2015). Reproductive impairment and intersexuality in *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: *Veneridae*) by the tributyltin compound. *Animal Cells and Systems*, 19(1), 61-68. doi.org/10.1080/19768354.2014.995225
- Peek, K., Gabbott, P. A. (1989). Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* LI Isolation, purification and biochemical characteristics of dispersed cells. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 126(3), 203-216. https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90187-1
- Pernet, F., Tremblay, R., Redjah, I., Sévigny, J.-M., 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(6), 969-977. https://doi.org/10.1242/jeb.014639
- Petersen, J. H. (1984a). Establishment of mussel beds: Attachment behavior and distribution of recently settled mussels (*Mytilus californianus*). *The Veliger*, 27, 7-13. https://www.biodiversitylibrary.org/part/94065
- Petersen, J. H. (1984b). Larval settlement behavior in competing species: *Mytilus californianus* Conrad and *M. edulis* L. *Journal of Experimental Marine*

Biology and Ecology, 82(2-3), 147-159. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90100-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90100-X)

Petersen, J. K., Hasler, B., Timmermann, K., Nielsen, P., Tørring, D. B., Larsen, M. M., Holmer, M. (2014). Mussels as a tool for mitigation of nutrients in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 82(1-2), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.006>

Petersen, J. K., Holmer, M., Termansen, M., Hasler, B. (2019). Nutrient extraction through bivalves. In *Goods and Services of Marine Bivalves* (pp. 179-208). Springer, Cham.

Petersen, J. K., Saurel, C., Nielsen, P., Timmermann, K. (2016). The use of shellfish for eutrophication control. *Aquaculture International*, 24(3), 857-878. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9953-0>

Petratits, P. S. (1978). Distributional patterns of juvenile *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *The Veliger*, 21, 288-292.

Pipe, R. K. (1987). Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Marine Biology*, 95(3), 405-414. doi.org/10.1007/BF00409571

Pocklington, P., Scott, D. B., Schaffer, C. T. (1994, July). Polychaete response to different aquaculture activities. In *Proceedings of the 4th International Polychaete Conference* (Vol. 162, pp. 511-520).

Poirier, L., A., Ramsay, A., Coffin, M., R., S., Davidson, J., D., P., Comeau L. (2021). Price Edward Island's mussel monitoring program and associated environmental data. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Science* 3226. Fisheries and Oceans Canada, Moncton, New Brunswick, E1C 9B6, Canada

- Price, H. (1982). An analysis of factors determining seasonal variation in the byssal attachment strength of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62(1), 147-155. <https://doi.org/10.1017/S0025315400020178>
- Priemel, T., Degtyar, E., Dean, M. N., Harrington, M. J. (2017). Rapid self-assembly of complex biomolecular architectures during mussel byssus biofabrication. *Nature Communications*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms14539>
- Priemel, T., Palia, R., Babych, M., Thibodeaux, C. J., Bourgault, S., Harrington, M. J. (2020). Compartmentalized processing of catechols during mussel byssus fabrication determines the destiny of DOPA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(14), 7613-7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919712117>
- Qin, X. X., Coyne, K. J., Waite, J. H. (1997). Tough tendons: mussel byssus has collagen with silk-like domains. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32623-32627. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32623>
- Qin, Y., Li, X., Noor, Z., Li, J., Zhou, Z., Ma, H., ... Yu, Z. (2020). A comparative analysis of the growth, survival and reproduction of *Crassostrea hongkongensis*, *Crassostrea ariakensis*, and their diploid and triploid hybrids. *Aquaculture*, 520, 734946. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734946>
- Racotta, I. S., Palacios, E., Ibarra, A. M., Ramírez, J. L., Arcos, F., Arjona, O. (2008). Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Marine Biology*, 153(6), 1245-1256. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0897-4>

- Ramsay, A., Davidson, J., Landry, T., Arsenault, G. (2008). Process of invasiveness among exotic tunicates in Prince Edward Island, Canada. *Biological Invasions*, 10(8), 1311-1316. doi: 10.1007/s10530-007-9205-y
- Rayssac, N., Pernet, F., Lacasse, O., Tremblay, R. (2010). Temperature effect on survival, growth, and triacylglycerol content during the early ontogeny of *Mytilus edulis* and *M. trossulus*. *Marine Ecology Progress Series*, 417, 183-191. <https://doi.org/10.3354/meps08774>
- Redjah, I., Olivier, F., Tremblay, R., Myrand, B., Pernet, F., Neumeier, U., Chevarie, L.. (2010). The importance of turbulent kinetic energy on transport of juvenile clams (*Mya arenaria*). *Aquaculture*, 307(1-2), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.022>
- Reinecke, A., Bertinetti, L., Fratzi, P., Harrington, M. J. (2016). Cooperative behavior of a sacrificial bond network and elastic framework in providing self-healing capacity in mussel byssal threads. *Journal of Structural Biology*, 196(3), 329-339. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.020>
- Riisgård, H. U., Kittner, C., Seerup, D. F. (2003). Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 284(1-2), 105-127. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00496-3)
- Richard, M., Archambault, P., Thouzeau, G., Desrosiers, G. (2006). Influence of suspended mussel lines on the biogeochemical fluxes in adjacent water in the Îles-de-la-

- Madeleine (Quebec, Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(6), 1198-1213. <https://doi.org/10.1139/f06-030>
- Riemann, B., Nielsen, T. G., Horsted, S. J., Bjoernsen, P. K., Pock-Steen, J. (1988). Regulation of phytoplankton biomass in estuarine enclosures. *Marine Ecology Progress Series. Oldendorf*, 48(3), 205-215.
- Roberts, E. A. (2019). Resource allocation to growth and structure: The cost of mussel attachment in a dynamic coastal environment (Doctoral dissertation).
- Roberts, E. A., Newcomb, L. A., McCartha, M. M., Harrington, K. J., LaFramboise, S. A., Carrington, E., Sebens, K. P. (2021). Resource allocation to a structural biomaterial: Induced production of byssal threads decreases growth of a marine mussel. *Functional Ecology*, 35(6), 1222-1239. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13788>
- Rodhouse, P., McDonald, J., Newell, R., Koehn, R. (1986). Gamete production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 90(2), 209-214.
- Rodhouse, P., Roden, C., Hensey, M., Ryan, T. (1984a). Resource allocation in *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture. *Marine Biology*, 84(1), 27-34. <https://doi.org/10.1007/BF00394523>
- Rodhouse, P. G., Roden, C. M., Burnell, G. M., Hensey, M. P., McMahon, T., Ottway, B., Ryan, T. H. (1984b). Food resource, gametogenesis and growth of *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture: Killary Harbour, Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 64(3), 513-529

- Rose, J. M., Bricker, S. B., Ferreira, J. G. (2015). Comparative analysis of modeled nitrogen removal by shellfish farms. *Marine Pollution Bulletin*, 91(1), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.006>
- Ruiz-Verdugo, C. A., Ramirez, J. L., Allen Jr, S. K., Ibarra, A. M. (2000). Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186(1-2), 13-32. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00369-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00369-5)
- Ruiz-Verdugo, C. A., Racotta, I. S., Ibarra, A. M. (2001). Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*. 259(2), 155-170. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00226-X)
- Russell-Hunter, W. D. (1979). *A life of invertebrates*. MacMillan Publishing Company.
- Rupp, G. S., Parsons, G. J. (2004). Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion's paw scallop *Nodipecten nodosus* at its southern distribution limit. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 309(2), 173-198. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.018>
- Sardenne, F., Forget, N., McKindsey, C. W. (2019). Contribution of mussel fall-off from aquaculture to wild lobster *Homarus americanus* diets. *Marine Environmental Research*, 149, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.06.003>

- Sastry, A. N. (1966). Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *The Biological Bulletin*, 130(1), 118-134.
- Scarpa, J., Wada, K. T., Komaru, Akira. (1993). Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(12), 2017-2023. <https://doi.org/10.2331/suisan.59.2017>
- Scarpa, J., Toro, J. E., Wada, K. T. (1994). Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture*, 119(2-3), 119-133. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90169-4)
- Schindler, D. W., Dillon, P. J., Schreier, H. (2006). A review of anthropogenic sources of nitrogen and their effects on Canadian aquatic ecosystems. *Nitrogen Cycling in the Americas: Natural and Anthropogenic Influences and Controls*, 25-44. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5517-1_2
- Schmitt, C. N., Winter, A., Bertinetti, L., Masic, A., Strauch, P., Harrington, M. J. (2015). Mechanical homeostasis of a DOPA-enriched biological coating from mussels in response to metal variation. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(110), 20150466. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0466>
- Sebens, K. P., Sarà, G., Carrington, E. (2018). Estimation of fitness from energetics and life-history data: An example using mussels. *Ecology and Evolution*, 8(11), 5279-5290. <https://doi.org/10.1002/ece3.4004>
- Seed, R., Suchanek, T. H. (1992). Population and community ecology of *Mytilus*. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture, Gosling, E., Ed.; Elsevier, 25, 87-170.

- Seguin-Heine, M. O., Lachance, A. A., Genard, B., Myrand, B., Pellerin, C., Marcotte, I., Tremblay, R. (2014). Impact of open sea habitat on byssus attachment of suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquaculture*, 426, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.006>
- Selin, N. I., Vekhova, E. E. (2004). Effects of environmental factors on byssal thread formation in some members of the family Mytilidae from the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 30(5), 306-313. <https://doi.org/10.1023/B:RUMB.0000046549.86598.f4>
- Shaw, B. L., Battle, H. I. (1957). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, 35(3), 325-347. <https://doi.org/10.1139/z57-026>
- Shumway, S. E., Davis, C., Downey, R., Karney, R., Kraeuter, J., Parsons, J., ... Wikfors, G. (2003). Shellfish aquaculture—in praise of sustainable economies and environments. *World Aquaculture*, 34(4), 8-10.
- Silverman, H. G., Roberto, F. F. (2010). Byssus formation in *Mytilus*. In *Biological adhesive systems* (pp. 273-283). Springer, Vienna. DOI: 10.1007/978-3-7091-0286-2_18
- Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K., Strand, Ø. (2019). Goods and services of marine bivalves. *Springer Nature*.
- Smeathers, J., Vincent, J. (1979). Mechanical properties of mussel byssus threads. *Journal of Molluscan Studies*, 45(2), 219-230. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065497>

- Songsangjinda, P., Matsuda, O., Yamamoto, T., Rajendran, N., Maeda, H. (2000). The role of suspended oyster culture on nitrogen cycle in Hiroshima Bay. *Journal of Oceanography*, 56(2), 223-231. <https://doi.org/10.1023/A:1011143414897>
- South, P. M., Floerl, O., Jeffs, A. G. (2021). Immersion can trigger detachment of juvenile mussels. *Aquaculture*, 538, 736548. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736548>
- South, P. M., Delorme, N. J., Skelton, B. M., Floerl, O., Jeffs, A. G. (2022). The loss of seed mussels in longline aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 440-455. <https://doi.org/10.1111/raq.12608>
- Sprung, M. (1984). Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). I. Shell growth and biomass. *Marine Ecology Progress Series. Oldendorf*, 17(3), 283-293.
- Stanley, J. G., H. Hidu, Allen Jr, S. K. (1984). Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 37(2), 147-155. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90072-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90072-3)
- Statistics Canada 2019. Table 32-10-0107-01 Aquaculture, production and value. Retrieved January 13, 2021. <https://doi.org/10.25318/3210010701-eng>
- Statistics Canada 2021. Table 32-10-0107-01 Aquaculture, production and value. <https://doi.org/10.25318/3210010701-eng>
- Strayer, D. L. (2009). Twenty years of zebra mussels: lessons from the mollusk that made headlines. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(3), 135-141. <https://doi.org/10.1890/080020>

- Steele, S., Mulcahy, M. F. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(4), 673-686. doi:10.1017/S0025315498000836
- Stenyakina, A., Walters, L. J., Hoffman, E. A., Calestani, C. (2010). Food availability and sex reversal in *Mytella charruana*, an introduced bivalve in the southeastern United States. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 77(3), 222-230. doi.org/10.1002/mrd.21132
- Strand, Ø., Ferreira, J. G. (2019). Introduction to regulating services. In *Goods and Services of Marine Bivalves* (pp. 115-117). Springer, Cham.
- Suquet, M., Malo, F., Quere, C., Ledu, C., Le Grand, J., & Benabdelmouna, A. (2016). Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 451, 11-15. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.032
- Sun, L., Feng, J. C., Yan, J. (2022). Carbon Sequestration Via Shellfish Culturing: A Potential Negative Emissions Technology. Available at SSRN 4113022. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4113022>
- Sun, C., Waite, J. H. (2005). Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39332-39336.
- Suplicy, F. M. (2020). A review of the multiple benefits of mussel farming. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 204-223. <https://doi.org/10.1111/raq.12313>

- Szefer, P., Frelek, K., Szefer, K., Lee, C. B., Kim, B. S., Warzocha, J., ... Ciesielski, T. (2002). Distribution and relationships of trace metals in soft tissue, byssus and shells of *Mytilus edulis trossulus* from the southern Baltic. *Environmental Pollution*, 120(2), 423-444.
- Tabarini, C. L. (1984). Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effects on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42(2), 151-160. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90362-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90362-4)
- Taylor, D., Larsen, J., Buer, A. L., Friedland, R., Holbach, A., Petersen, J. K., ... Maar, M. (2021). Mechanisms influencing particle depletion in and around mussel farms in different environments. *Ecological Indicators*, 122, 107304. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107304>
- Taylor, J., Preston, A. C., Guy, D., Migaud, H. (2011). Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315(1-2), 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.029>
- Teaniniuraitemoana, V., Leprêtre, M., Levy, P., Vanaa, V., Parrad, S., Gaertner-Mazouni, N., ... Le Moullac, G. (2016). Effect of temperature, food availability, and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(1), 13-24. doi.org/10.1002/jez.1992
- Theuerkauf, S. J., Barrett, L. T., Alleway, H. K., Costa-Pierce, B. A., St. Gelais, A., Jones, R. C. (2021). Habitat value of bivalve shellfish and seaweed aquaculture for fish and

- invertebrates: Pathways, synthesis and next steps. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 54-72. <https://doi.org/10.1111/raq.12584>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Torres, C. E. (2012). Mussel Byssus Fibres: A Tough Biopolymer. In *Natural Polymers* (pp. 305-329).
- Toupoint, N. (2012). Le succès de recrutement de la moule bleue: influence de la qualité de la ressource trophique (Thèse de doctorat, Université du Québec à Rimouski).
- Tremblay, R., Landry, T. (2016). The implication of metabolic performance of *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus*, and hybrids for mussel aquaculture in eastern Canadian waters. *Marine Biology and Aquaculture*, 2, 1-7. <https://doi.org/10.15436/2381-0750.16.009>
- Tremblay, R., Landry, T., Leblanc, N., Pernet, F., Barkhouse, C., Sévigny, J.-M. (2011). Physiological and biochemical indicators of mussel seed quality in relation to temperatures. *Aquatic Living Resources*, 24(3), 273-282. <https://doi.org/10.1051/alr/2011113>
- Tremblay, R., Myrand, B., Sevigny, J. M., Blier, P., Guderley, H. (1998). 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(1), 27-58. [doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00114-7)
- Troncoso, O., Torres, F., Grande, C. (2008). Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of *Aulacomya ater*. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1114-1117. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.01.014>

- Utting, S. D., Doyou, J. (1992). The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*, 103(1), 17-28. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90274-O](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90274-O)
- Vaccaro, E., Waite, J. H.. (2001). Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: a self-healing biomolecular material. *Biomacromolecules*, 2(3), 906-911. <https://doi.org/10.1021/bm0100514>
- Waite, J. H., Qin, X.-X., Coyne, K. J. (1998). The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biology*, 17(2), 93-106. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(98\)90023-3](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(98)90023-3)
- Waite, J. H., Vaccaro, E., Sun, C., Lucas, J. M. (2002). Elastomeric gradients: a hedge against stress concentration in marine holdfasts?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418), 143-153. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1025>
- Waite, J. H., Harrington, M. J. (2022). Following the thread: Mytilus mussel byssus as an inspired multi-functional biomaterial. *Canadian Journal of Chemistry*, 100(3), 197-211. <https://doi.org/10.1139/cjc-2021-0191>
- Wallace, R. B., Baumann, H., Grear, J. S., Aller, R. C., Gobler, C. J. (2014). Coastal ocean acidification: The other eutrophication problem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 148, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.05.027>
- Wang, C., Croll, R. P. (2004). Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 238(1-4), 483-498.

- Ware, J. R., Smith, S. V., Reaka-Kudla, M. L. (1992). Coral reefs: sources or sinks of atmospheric CO₂?. *Coral Reefs*, 11(3), 127-130.
- Warren, C. E., Davis, G. E. (1967). Laboratory studies on the feeding, bioenergetics, and growth of fish. Department of fisheries and wildlife, Oregon State University, Corvallis
- Watson DI, Shumway SE, Whitlatch RB (2009). Biofouling and the shellfish Industry. Pages 317–336 in S. E. Shumway and G. E. Rodrick, editors. Shellfish quality and safety, Chapter 13. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
<https://doi.org/10.1533/9781845695576.2.317>
- Wilding, T. A., Nickell, T. D. (2013). Changes in benthos associated with mussel (*Mytilus edulis* L.) farms on the west-coast of Scotland. *PLoS One*, 8(7), e68313.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068313>
- Winberg, G. (1956). Rate of metabolism and food requirements of fishes. Fisheries Research Board Canada, Translation Series 194, 202.
- Wu, X., Zhang, Y., Xiao, S., Qin, Y., Ma, H., Yu, Z. (2019). Comparative studies of the growth, survival, and reproduction of diploid and triploid Kumamoto oyster, *Crassostrea sikamea*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(4), 866-877.
<https://doi.org/10.1111/jwas.12596>
- Xu, Q., Feng, C. Y., Hori, T. S., Plouffe, D. A., Buchanan, J. T., Rise, M. L. (2013). Family-specific differences in growth rate and hepatic gene expression in juvenile triploid growth hormone (GH) transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative*

- Biochemistry Physiology Part D: Genomics Proteomics*, 8(4), 317-333.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.09.002>
- Xu, Q., Xu, M., Lin, C. Y., Zhao, Q., Zhang, R., Dong, X., ... Xia, Z. (2019). Metal coordination-mediated functional grading and self-healing in mussel byssus cuticle. *Advanced Science*, 6(23), 1902043.
- Yamamoto, S., Sugawara, Y. (1988). Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 72(1-2), 21-29. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90143-3)
- Yang, H., Guo, X. (2018). Triploid hard clams *Mercenaria mercenaria* produced by inhibiting polar body I or polar body II. *Aquaculture Research*, 49(1), 449-461.
<https://doi.org/10.1111/are.13476>
- Young, G. (1985). Byssus-thread formation by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of environmental factors. *Marine Ecology Progress Series. Oldendorf*, 24(3), 261-271.
- Ytrøy, E. H. (2008). Blue mussel farming: a comparison of the Norwegian and the Canadian industries. (*Master's thesis, Universitetet i Tromsø*).
<https://hdl.handle.net/10037/1696>
- Zardi, G., C. McQuaid, Nicastrò, K.. (2007). Balancing survival and reproduction: seasonality of wave action, attachment strength and reproductive output in indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Marine Ecology Progress Series*, 334, 155-163. doi:10.3354/meps334155

- Zechel, S., Hager, M. D., Priemel, T., Harrington, M. J. (2019). Healing through histidine: Bioinspired pathways to self-healing polymers via imidazole–metal coordination. *Biomimetics*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4010020>
- Zeng, Z., Tan, Q., Huang, Z., Shi, B., Ke, C. (2019). Differential gene expression related to morphological variation in the adductor muscle tissues of diploid and triploid fujian oysters, *Crassostrea angulata*. *Aquaculture Research*, 50(12), 3567-3578.
- Zhang, Q., Yu, H., Howe, A., Chandler, W., Allen Jr, S. K. (2010a). Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis*. *Aquaculture Research*, 41(11), 1658-1667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02541.x>
- Zhang, Q., Zhuang, Y., Allen Jr, S. K. (2010b). Meiotic chromosome configurations in triploid and heteroploid mosaic males of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis*. *Aquaculture Research*, 41(11), 1699-1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02559.x>
- Zhu, X. P., You, F., Zhang, P. J., Xu, Y. L., Xu, J. H. (2006). Effects of cold shock on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Marine Biotechnology*, 8(3), 312-318.

