

Université de Montréal

L'influence des conditions environnementales sur le déterminisme du sexe chez la moule
bleue (*Mytilus edulis*)

Par

Andréanne Dalpé

Département de Sciences Biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Biologiques

Septembre 2020

© Andréanne Dalpé, 2020

Université de Montréal

Département de Sciences Biologiques, Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

L'influence des conditions environnementales sur le déterminisme du sexe chez la moule bleue (*Mytilus edulis*)

Présenté par

Andréanne Dalpé

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Simon Joly

Président-rapporteur

Sophie Breton

Directeur de recherche

Bernard Angers

Codirecteur

Anne-Sophie Martinez

Membre du jury

Résumé

L'accroissement de la population humaine mondiale a des répercussions majeures, ce n'est donc pas surprenant, compte tenu de la nécessité de nourrir une population grandissante au niveau planétaire, que la production en conchyliculture ait augmenté au cours des dernières décennies. Or, les connaissances acquises concernant les divers facteurs du déterminisme du sexe et du rapport des sexes chez les bivalves sont très limitées et cela pourrait ralentir grandement le taux de production des éleveurs et leur capacité à intervenir si les stocks venaient à diminuer de façon inquiétante. Certains travaux mentionnent que certains facteurs environnementaux, comme la température, auraient un effet sur le rapport des sexes chez une variété de bivalves, incluant la moule bleue commerciale *Mytilus edulis*, quoiqu'aucune étude n'ait validé cette dernière possibilité. Cela dit, il est possible que l'environnement des adultes puisse aussi affecter le phénotype de la progéniture. En effet, une transmission intergénérationnelle a déjà été identifiée chez *Mytilus*, mais la possibilité que les conditions des parents affectent le rapport des sexes spécifiquement n'a jamais été abordée. Il est toutefois connu qu'un facteur maternel présent dans l'œuf affecte le sexe de la progéniture et que cette espèce de bivalve a un mode de transmission des mitochondries particulier. Ce mode de transmission appelé « transmission doublement uniparentale » a rendu possible l'identification du sexe chez les embryons. De cette façon, 1938 embryons provenant de 25 croisements artificiels réalisés à trois températures et effectués lors de trois différentes années ont été analysés. Nos analyses mettent en évidence une variation significative dans la proportion de larves femelles entre les années passant de 64 % à 98 %. Dans certains cas, la proportion de femelle varie de 0 à 100 % entre les différents traitements. Même si un effet général sur le rapport des sexes n'était pas significatif, chaque croisement s'est avéré avoir une norme de réaction qui lui est propre face aux 3 différentes températures. Cette étude met en valeur l'effet important de l'environnement sur le déterminisme du sexe chez *M. edulis*, autant chez les parents que lors du développement des embryons.

Mots-clés: Conditions environnementales, Température, Déterminisme du sexe, Sex-ratio, *Mytilus edulis*, Culture de moule, Transmission doublement uniparental des mitochondries (DUI)

Abstract

The factors affecting sex determination still remain unknown for most bivalve species. Some studies reported that environmental factors, such as temperature, influence sex determination in certain species, and this has been hypothesized also for the blue mussel *Mytilus edulis*, but not experimentally validated yet. Adult exposure to different environmental conditions during gametogenesis, which occurs seasonally, may also affect offspring phenotype, including sex determination. Intergenerational carryover effects have been reported in bivalves, but the impact of parental exposures on offspring sex determination has not been examined so far. To address these questions, artificial fertilizations were performed on individuals collected in three different years and their embryos and larvae were reared at three different temperatures to specifically test if the environment influence offspring sex ratio through effects on parental developing gametes and/or on developing embryos. We took advantage of the doubly uniparental inheritance of mitochondria in bivalves to determine the sex of the larvae. The analysis of 1938 larvae from 25 crosses revealed that the overall proportion of female larvae was significantly different among years, varying from 64 % to 98 %. While the proportion of female larvae across temperature ranged from 0 to 100 % in some cases, the reaction norms were cross-specific and there were no significant effects of rearing temperature on sex ratio. Taken together, our results suggested that sex determination in *M. edulis* occur during the gametogenesis according to the genotype of the parents, but could also be changed during the development. More importantly, both processes are strongly affected by environmental conditions.

Keywords: Environmental conditions, Temperature, Sex Determination, Sex ratio, Mussel Culture, *Mytilus edulis*, Doubly Uniparental Inheritance of mitochondria (DUI).

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
1. Introduction.....	1
2. Objectifs et hypothèses	7
3. Article	8
The influence of environmental conditions on sex determination in blue mussels (<i>Mytilus edulis</i>)	8
3.1. Introduction.....	9
3.2. Materials and Methods	11
3.2.1. <i>Crossing Experiment</i>	11
3.2.2 <i>Sex assignment of embryos</i>	12
3.2.3 <i>Statistical analysis</i>	13
3.3 Results.....	13
3.4 Discussion.....	18
3.4.1 <i>Effect of environmental conditions on sex determination of Mytilus edulis</i>	18
3.4.2 <i>Effect of environmental conditions and temperature on embryos</i>	19
3.4.3 <i>Efficacy of protocol</i>	20
3.4.4 <i>Implications and perspectives</i>	21
3.5 Conclusion	22

Author Contributions	22
4. Discussion	23
4.1 Efficacité du protocole expérimental.....	23
4.2 Transmission doublement uniparentale des mitochondries et déterminisme du sexe.....	25
4.3 Effet parental sur le rapport des sexes chez <i>Mytilus edulis</i>	26
4.4 Effet des conditions environnementales et de la température sur les embryons.....	28
4.5 Enjeux et perspectives	29
5. Conclusion	30
Références.....	30
Annexe A. Données supplémentaires	36

Liste des tableaux

Table 1. Sex distribution in pair matings of *M. edulis* in 2016, 2018 and 2019 at 10, 17 and 23 degrees Celsius..... 15

Table 2. Results of the canonical correlation analysis performed on *Mytilus edulis* offspring sex distribution data..... 17

Tableau 3. Moyennes de température en degrés Celsius pour chaque mois de l’année 2016, 2018 et 2019 dans la région de North Rustico à l’île du Prince Édouard. 36

Liste des figures

Figure 1. Graphique illustrant la production mondiale de mollusques en aquaculture en tonnes entre les années 1955 et 2015 selon les statistiques de la « <i>Food and Agriculture Organisation of the United Nations</i> ».....	1
Figure 2. Histogramme illustrant l'effet de la température sur le sex-ratio de juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i> lors de l'étude de Santerre <i>et al.</i> réalisée en 2013 (modifiée).	5
Figure 3. Schéma représentant le fonctionnement du système DUI chez les bivalves (modifiée de Breton <i>et al.</i> , 2014).....	7
Figure 4. Histogram showing the mean and variance in female frequency for each sampling year (2016, 2018, 2019) and temperature tested (10 °C, 17 °C and 23 °C).....	14
Figure 5. A. Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2016. B. Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2018. C. Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2019.	17

Liste des abréviations

ACC/CCA: Analyse canonique des corrélations/Canonical correlation analysis

ADN/DNA: Acide Désoxyribonucléique/Deoxyribonucleic acid

ADNmt/mtDNA: ADN mitochondrial/Mitochondrial DNA

DUI : Transmission doublement uniparentale/Doubly uniparental inheritance

Fcox2: gène codant pour la sous-unité 2 de la cytochrome c oxidase dans l'ADNmt F/ Gene coding for the subunit 2 in F mtDNA cytochrome c oxydase

F mtDNA: ADN mitochondrial transmis par la femelle /Female- transmitted mitochondrial DNA

hpf: Heures après fécondation/Hours post-fertilization

M mtDNA: ADN mitochondrial transmis par le mâle/Male-transmitted mitochondrial DNA

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne/Polymerase chain reaction

SMI : Transmission strictement maternelle/Strictly maternal inheritance

Remerciements

Mes premiers remerciements vont d'abord à ma directrice et à mon co-directeur, Sophie Breton et Bernard Angers, qui m'ont tous les deux supportés lors de ce périple. Ce n'a pas toujours été facile, mais ils m'ont offert un encadrement et un sentiment de sécurité pendant tout le processus m'aidant ainsi à mettre à terme ce mémoire. Il va de soi qu'ils ont contribué à l'épanouissement de mes connaissances en plus de m'aider à acquérir une rigueur scientifique. Un énorme merci pour votre confiance.

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes dont j'ai fait la connaissance durant mes stages et ma maîtrise au sein du Département de sciences biologiques. Toutes mes rencontres, autant étudiants, qu'enseignant ou autres membres du personnel m'ont enrichie tout au long de mon séjour. Plus particulièrement, je remercie les membres de mon laboratoire: Charlotte Capt, Stefano Bettinazzi, Georges Hraoui, Karim Bouvet, Philip Ouimet, Davide Guerra, Mélanie Tassé et Laura Kienzle ainsi que nos stagiaires qui ont rendu cette expérience unique.

Je remercie d'ailleurs particulièrement Stefano Bettinazzi qui a été là pour moi autant pendant mes stages que lors de ma maîtrise. J'ai l'honneur d'être co-auteure avec lui pour mon tout premier article et j'ai eu le plaisir d'avoir mes journées embellies par sa compagnie. Merci pour tout Stefano.

Un mot spécial pour Ariane Brucher et Thierry Choquette qui ont été mes stagiaires et ont fait tous les deux un travail remarquable pour l'avancée et la réalisation de ce projet. Merci énormément !

Bien entendu je remercie le groupe de recherche interuniversitaire en limnologie (GRIL) pour m'avoir soutenu financièrement lors de la réalisation de ce projet.

Finalement, je lève mon chapeau à ma famille, mais surtout à mon conjoint qui a été présent tous les jours de mon parcours, beaux temps et mauvais temps j'ai toujours pu compter sur lui.

Sur ce, je vous suis à tous énormément reconnaissante ! Merci !

1. Introduction

Les avancées scientifiques ont grandement affecté le mode de vie et l'environnement des nombreuses espèces peuplant la terre, y compris l'humain et ce surtout au cours des deux derniers siècles. Diverses découvertes, notamment dans le domaine de la médecine, ont favorisé un accroissement de la population mondiale et par la même occasion l'augmentation des besoins en nourriture (Nations Unies). Dans le but de répondre à la demande qui ne cesse d'augmenter, plusieurs variétés de cultures et d'élevages ont été développées. Dans les dernières années, une hausse de la production en conchyliculture (élevage des mollusques) a été relevée par les Nations Unies. En effet, la production mondiale est passée, entre 1995 et 2016, d'environ 7 à 15 millions de tonnes de moules, huîtres, pétoncles et palourdes (F.A.O., 2018; Figure 1), et il est prévu que cette production continuera d'augmenter significativement dans les décennies à venir (Shumway, 2011).

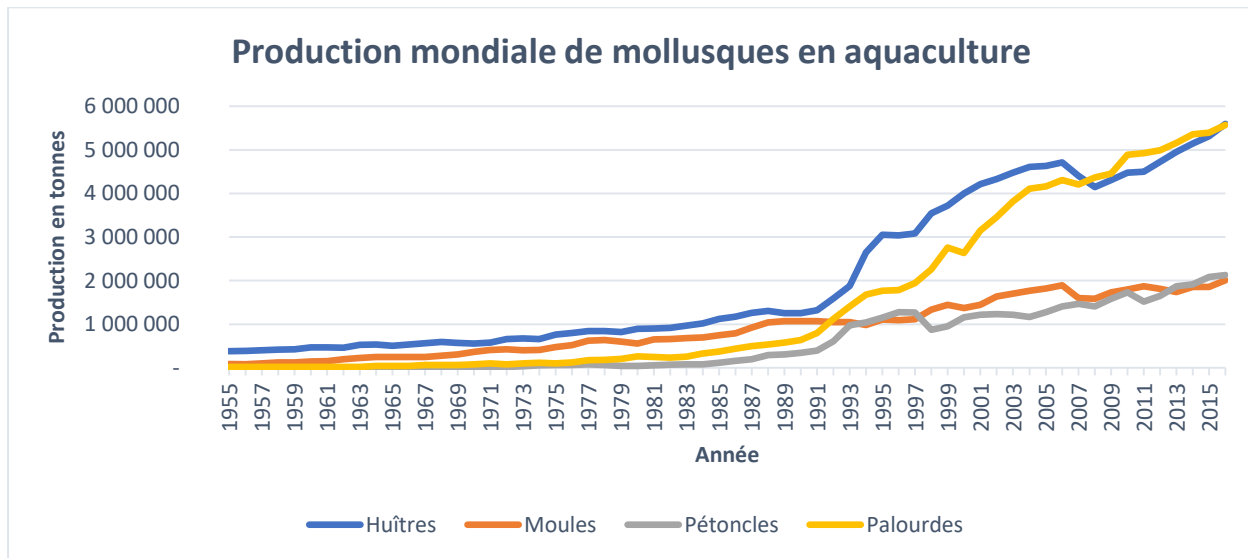


Figure 1. Graphique illustrant la production mondiale de mollusques en aquaculture en tonnes entre les années 1955 et 2015 selon les statistiques de la « Food and Agriculture Organisation of the United Nations ».

De multiples facteurs peuvent affecter le taux de rendement des cultures et des élevages, qu'il s'agisse d'agriculture ou d'aquaculture comme la conchyliculture. C'est pourquoi il est important d'évaluer les différents facteurs pouvant influencer le taux d'efficacité des diverses productions. Parmi ces facteurs, on retrouve la maîtrise des caractères associés à la reproduction, au déterminisme du sexe et au contrôle du rapport des sexes (Devauchelle, 2000; López-

Landavery *et al.*, 2017). Par exemple, chez une grande diversité de bivalves, le taux de croissance d'un des deux sexes est différent de l'autre (Coe et Fox, 1942). Une croissance asynchrone peut favoriser les éleveurs lorsqu'ils ont la possibilité de contrôler les rapports des sexes, cela signifie qu'ils peuvent manipuler le rapport du nombre de mâles et de femelles dans un élevage lorsque la reproduction s'effectue de façon sexuée. Ils ont alors le pouvoir de produire en grande quantité le sexe ayant une croissance favorable (Coe et Fox, 1942; López-Landavery *et al.*, 2017).

C'est d'ailleurs le cas du mollusque bivalve le plus cultivé dans la région du golfe du Saint-Laurent, la moule bleue aussi appelée moule commune, *Mytilus edulis* (Coe et Fox, 1942; Pêches et Océans Canada, 2003). Cette espèce constitue un moteur économique considérable non seulement au Canada, mais aussi en Europe (Robert *et al.*, 2013). Or, *M. edulis* a subi un déclin important au cours des dernières années dans les provinces de l'Atlantique et aux États-Unis (Jansen *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Sorte *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette chute inquiétante, notamment la surexploitation, l'acidification des eaux, la pollution, les maladies, l'augmentation de prédateurs ainsi que le réchauffement climatique (Jansen *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Sorte *et al.*, 2013). Étant un animal filtreur sessile fixé aux substrats tôt durant son développement, la moule bleue fait face à une quantité énorme de perturbations sans pouvoir y échapper. Son importance non seulement économique, mais aussi écologique suffit pour comprendre la nécessité d'approfondir les connaissances sur cette espèce.

En effet, la moule bleue a aussi une valeur inestimable dans le domaine de l'écologie. Pendant plusieurs années, *Mytilus* a été utilisée comme outil de biosurveillance par « The Mussel Watch » (Sedik *et al.*, 2010). Elle est une espèce sentinelle utilisée dans le monde entier comme indicateur de pollution environnementale. En d'autres mots, elle représente la santé de l'emplacement où elle se trouve et par extension, la santé des populations avoisinantes (Anantharaman et Craft, 2012). Alors que son mode de vie sessile rend ce bivalve à la merci de tous les perturbateurs anthropiques et environnementaux, il le rend aussi extrêmement pratique pour évaluer la bioaccumulation de divers contaminants dans le milieu marin.

Généralement, l'élevage de cette espèce de bivalve se fait en milieu naturel. En effet, ce dernier répond à tous les besoins nutritionnels des individus ce qui minimise le travail nécessaire de la part des mytiliculteurs. Toutefois, les éleveurs doivent récupérer les naissains avant de

pouvoir commencer l'élevage (Pêches et Océans Canada, 2003; MAPAQ, 2019). Un naissain représente l'ensemble des juvéniles de moule à l'état larvaire ou embryonnaire (Pêches et Océans Canada, 2003). Pour capturer les naissains, des collecteurs sont installés à proximité des zones de reproduction soit en fixant une corde sur pieux de bois (bouchot) ou en tendant une corde horizontalement, ces techniques sont plus fréquemment utilisées en zone peu profonde. Lorsque les naissains proviennent d'eau profonde, ceux-ci sont capturés à l'aide de filière. La phase d'élevage peut commencer une fois que les jeunes moules atteignent 1 centimètre (CRC Bretagne Sud, 2010). Plusieurs méthodes de culture sont connues. Au Canada, les naissains sont transférés sur des boudins de moules suspendus à des radeaux ou à des filières (Pêches et Océans Canada, 2003; MAPAQ, 2019). Il est aussi possible de faire la culture sur bouchots ou même à plat au sol (CRC Bretagne Sud, 2010; MAPAQ, 2019). L'espèce doit encore se développer pendant une période de 12 à 27 mois selon l'emplacement, la température de l'eau et la quantité de nourriture disponible avant de pouvoir être commercialisée (Pêches et Océans Canada, 2003; MAPAQ, 2019). Cela dit, les éleveurs n'ont pas besoin de superviser la reproduction des moules bleues, puisqu'ils collectent les individus au stade larvaire (MAPAQ, 2019; Pêches et Océans Canada, 2003; CRC Bretagne Sud, 2010). Néanmoins, la plupart des espèces de moules sont dioïques. Cela signifie que les deux sexes sont séparés, chaque individu est soit mâle soit femelle. Il est toutefois connu que l'apparition d'hermaphrodites est possible, mais ces apparitions surviennent chez moins d'un pourcent des cas chez *Mytilus* (Garrido-Ramos *et al.*, 1998). Les moules ont des périodes de maturité sexuelle, celle-ci est généralement atteinte à la fin du printemps ou au début de l'été, et selon l'endroit il y a aussi parfois une ponte à l'automne (MAPAQ, 2019 ; Pêches et Océans Canada, 2003). La libération des gamètes se produit habituellement en réponse à des facteurs déclencheurs présents dans le milieu comme des niveaux élevés de nourriture, des fluctuations de température et des perturbations physiques. Pour la Région du Golfe du Saint-Laurent, le frai a souvent lieu entre le mois de mai et d'août. À ce moment, les moules libèrent une partie ou même la totalité de leurs ovocytes ou de leur sperme dans l'eau. La fécondation se produit ensuite directement dans la colonne d'eau. Il ne faut parfois que 5 heures à l'embryon pour commencer à nager. La moule bleue adulte peut tolérer une salinité allant de 0 à 31 parties par millions (ppm), la valeur optimale étant de 26 ppm (Pêches et Océans Canada, 2003). La vitesse de croissance est fortement réduite lorsque la salinité est inférieure à 12, 8 ppm (MAPAQ, 2019). En ce qui concerne la température, elles peuvent tolérer des températures allant sous le

zéro et montant jusqu'à 25 °C (Pêches et Océans Canada, 2003 ; MAPAQ, 2019). Toutefois, les températures pour une croissance idéale se situent entre 10 °C et 20 °C. Des températures de surface de 27 °C sont létales chez les individus adultes (MAPAQ, 2019). Pour la reproduction de la moule bleue en laboratoire, il suffit de mettre en contact les gamètes d'individus matures dans un environnement respectant les critères de survie de l'espèce.

Curieusement, très peu d'études ont été réalisées sur la détermination du sexe et du rapport des sexes chez *Mytilus*. Comme chez tous les bivalves étudiés jusqu'à maintenant (Breton *et al.*, 2018), il semble que le déterminisme du sexe chez *Mytilus* ne soit pas lié à des chromosomes sexuels dimorphiques tels que les chromosomes X et Y chez les mammifères. Vraisemblablement, le déterminisme du sexe et du rapport des sexes chez les bivalves serait contrôlé à la fois par des facteurs génétiques et par des facteurs environnementaux, tels que la température, la pollution, l'abondance de nourriture et la présence de stéroïdes exogènes (Breton *et al.*, 2018). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore élucidés, une étude réalisée chez l'huître *Crassostrea gigas* suggère que la détermination du sexe se produirait tôt lors du développement embryonnaire (Santerre *et al.*, 2013). Toujours chez l'huître *C. gigas*, il a été démontré que la température à laquelle la fécondation et le développement embryonnaire ont lieu aurait un impact sur le rapport des sexes des juvéniles (Santerre *et al.*, 2013; Figure 2). D'ailleurs, la température affecte la proportion des sexes chez plusieurs autres espèces, telles que *Pinctada margaritifera*, *Crassostrea virginica*, *C. corteziensis* (Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Coe, 1936; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016). Ainsi, ces mollusques sessiles pourraient être à risque d'extinction locale face au réchauffement climatique advenant des modifications drastiques du sex-ratio de leurs populations. Bien que Kenchington *et al.*, aient émis l'hypothèse en 2002 que le déterminisme du sexe et le sex-ratio de la moule bleue *Mytilus* seraient aussi sous l'influence de la température, aucune étude n'a été réalisée sur le sujet. De plus, des études concentrées sur les effets intergénérationnels (effets parentaux) s'ajoutent à l'équation. Il y a donc encore beaucoup à découvrir dans ce domaine pour bien comprendre les mécanismes sous-jacents au déterminisme du sexe. En effet, une espèce de lézard, *Amphibolurus muricatus*, montre une variation du rapport des sexes associée au temps d'exposition à la chaleur des parents seulement (Schwanz, 2016). Il a déjà été démontré que *M. edulis* subit certains effets d'une transmission intergénérationnelle. Effectivement, lorsque les adultes sont exposés à un pH acide ou à un milieu hypoxique, cela permet de réduire l'impact négatif de ces facteurs sur la génération suivante en augmentant leur

valeur adaptative face à ce type d'environnement (Kong *et al.*, 2019). Malheureusement à notre connaissance aucune étude ne s'est intéressée, jusqu'à maintenant, à l'effet parental sur la détermination du sexe et le ratio des sexes chez les bivalves.

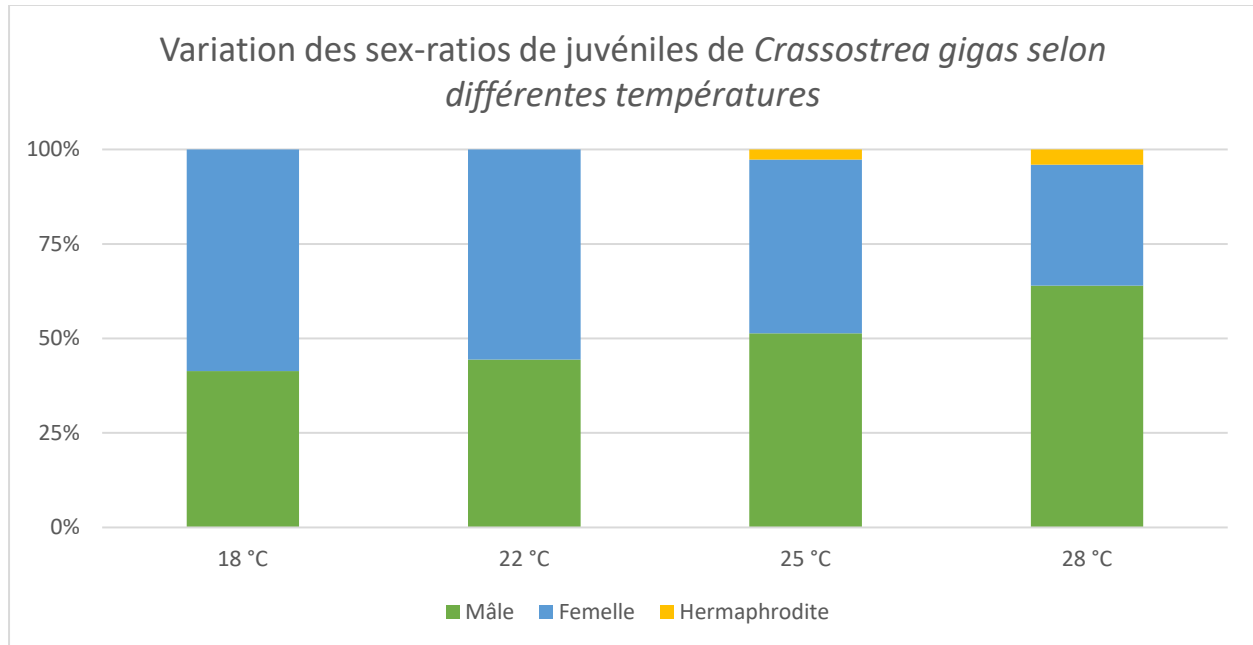


Figure 2. Histogramme illustrant l'effet de la température sur le sex-ratio de juvéniles de *Crassostrea gigas* lors de l'étude de Santerre *et al.* réalisée en 2013 (modifiée). Les rapports des sexes sont présentés sous forme de pourcentage.

Certaines hypothèses concernant la détermination du sexe chez *Mytilus* ont été proposées suite à l'étude de croisements en laboratoire, notamment l'implication d'un facteur maternel présent dans l'œuf (Kenchington *et al.*, 2002; Kenchington *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 1997). En effet, en réalisant plusieurs croisements impliquant une même mère, mais faisant varier le père, ces chercheurs ont remarqué que certaines femelles produisaient toujours des progénitures ayant un rapport des sexes fortement biaisé vers les femelles, d'autres vers les mâles et d'autres avaient des progénitures mixtes. Le rapport des sexes chez *Mytilus* peut donc varier de 0 à plus de 95 % d'un sexe à l'autre pour une progéniture selon l'impact de la mère seulement (Kenchington *et al.*, 2002; Kenchington *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 1997). Mais ce n'est pas tout, il est aussi connu que la moule bleue a un mode de transmission mitochondrial assez particulier qui est spécifique au sexe. Généralement, dans le règne animal, seules les mitochondries de la mère sont transmises aux prochaines générations; c'est une transmission strictement maternelle (Breton et Stewart, 2015; Cao *et al.*, 2004). En revanche, chez plusieurs mollusques bivalves, un phénomène différent survient.

Ce phénomène de transmission doublement uniparentale ou «Doubly Uniparental Inheritance» (DUI) est retrouvé chez une centaine d'espèces appartenant aux ordres Mytiloida, Unionoida, Veneroida et Nuculanoida (Gusman *et al.*, 2016). Le système DUI implique deux ADN mitochondriaux hautement divergents, l'un provient du père et est transmis par les spermatozoïdes, tandis que le second provient de la mère et est présent dans les œufs. Sous ce système particulier, les femelles sont normalement homoplasmiques, c'est-à-dire que seul l'ADN mitochondrial femelle (ADNmt F) est retrouvé dans tout l'organisme. Les mâles sont hétéroplasmiques et possèdent l'ADN mitochondrial mâle (ADNmt M), ainsi que l'ADNmt F (Breton *et al.*, 2018). Les deux ADN mitochondriaux peuvent présenter des divergences pouvant atteindre plus de 20 % chez *Mytilus edulis* (Breton *et al.*, 2007; Breton *et al.*, 2006).

La figure 3 présente une description détaillée des étapes de la DUI au niveau cellulaire suite à la fécondation chez les bivalves. Dès la fécondation, le spermatozoïde transmet 5 mitochondries contenant l'ADNmt M à l'embryon. L'ovocyte en détient déjà des dizaines de milliers portant l'ADNmt F (Cao *et al.*, 2004; Kyriakou *et al.*, 2010). Pendant le développement des embryons mâles, les mitochondries provenant du père forment un agrégat. Au stade embryonnaire de 4 cellules, le regroupement de mitochondries paternelles s'isole dans un même blastomère qui formera la future lignée germinale de l'individu mâle. Au contraire, durant le développement des embryons femelles, les mitochondries provenant du spermatozoïde se dispersent et sont éliminées par un processus toujours incompris, et ce dans les 24 heures suivant la fécondation (Cao *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 1998). Avec les connaissances actuelles, les marqueurs d'ADN mitochondriaux M et F représentent les seuls marqueurs sexuels pouvant être utilisés à ce stade de développement, c'est-à-dire aux environs de 24h post-fécondation.

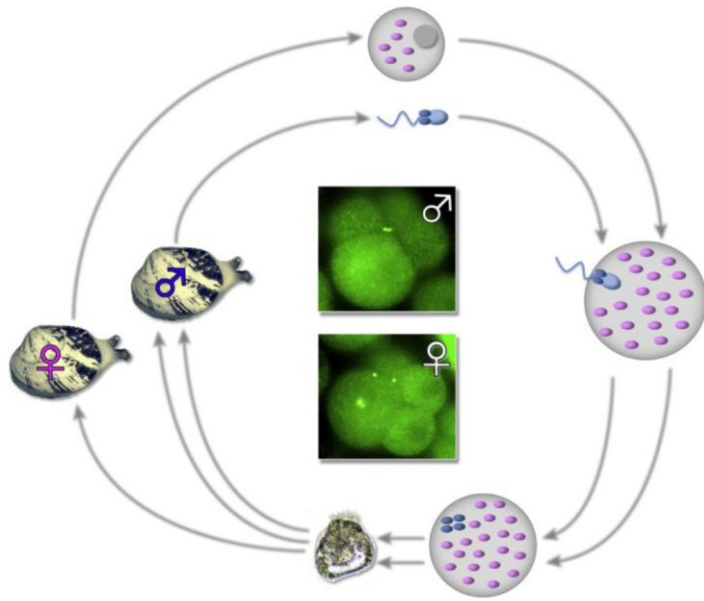


Figure 3. Schéma représentant le fonctionnement du système DUI chez les bivalves (modifiée de Breton *et al.*, 2014). Lorsque les mitochondries provenant du spermatozoïde forme un agrégat dans une région spécifique de l'embryon, celui-ci se développe en mâle. Lorsque les mitochondries se dispersent l'embryon se développe en femelle.

2. Objectifs et hypothèses

L'objectif de cette maîtrise est de tester l'effet de conditions environnementales sur la détermination du sexe chez les embryons de *Mytilus edulis*. Cet objectif comprend deux aspects, à savoir l'effet parental et l'effet direct. Comme les fécondations ont été réalisées à l'aide d'adultes nouvellement récoltés chaque année, il est possible d'observer si les différentes conditions environnementales des parents jouent un rôle dans le déterminisme du sexe. Comme *M. edulis* semble sensible à un certain effet intergénérationnel (hypoxie et pH) nous posons l'hypothèse que le rapport des sexes est aussi affecté par certaines conditions environnementales (Kong *et al.*, 2019).

Ensuite, il s'agit de déterminer si la température de l'eau dans laquelle la fécondation a lieu et les embryons se développent affecte directement le développement du sexe de ceux-ci. Selon les résultats d'études effectuées chez les huîtres (Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Coe, 1936; Santerre *et al.*, 2013; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016), il est approprié de croire que la température aura un impact sur le déterminisme du sexe et par conséquent affectera le rapport des sexes de *M. edulis*. Il est également possible que la tendance vue chez *Crassostrea gigas* soit celle observée chez la moule commune, c'est-à-dire que plus la température à laquelle l'embryon se développe est élevée, plus le rapport des sexes tend vers les mâles (Santerre *et al.*, 2013).

3. Article

The influence of environmental conditions on sex determination in blue mussels (*Mytilus edulis*)

Dalpe Andréanne^{1,2}, Angers Bernard^{1,2}, Lalonde-Larue Ariane^{1,2}, Choquette Thierry¹, Breton Sophie^{1,2}.

¹ Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Québec, Canada

² Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie (GRIL), Université de Montréal, Québec, Canada

* Authors for correspondence: andreeanne.dalpe@umontreal.ca; s.breton@umontreal.ca

En préparation pour future publication

3.1. Introduction

Sexual systems and sex determination mechanisms are known to be extremely variable, even in closely related species (Gamble and Zarkower, 2012; Haag and Doty, 2005; Beukeboom and Perrin, 2014). One animal taxon in which sexual systems vary greatly among species are bivalves, which exhibit simultaneous hermaphroditism, sequential hermaphroditism or strict gonochorism (i.e., species that exist as separate males and females) (reviewed in Breton *et al.*, 2018). However, knowledge of the various factors affecting sex determination in bivalves is still very scarce. This applies to the gonochoric blue mussel *Mytilus edulis*, which constitutes a considerable economic engine not only in Canada, but also in Europe (Robert *et al.*, 2013). To date, a few studies have been done on sex ratio biases and theoretical modeling of sex determination mechanisms in this species (reviewed in Breton *et al.*, 2007; Passamonti and Ghiselli, 2009; Zouros, 2013). As with all bivalve species studied so far, it seems that the sex determination in *Mytilus* is not linked to dimorphic sex chromosomes such as chromosomes X and Y in mammals (reviewed in Breton *et al.*, 2018). The sex ratio resulting from parental crosses in *Mytilus* can vary from one extreme to the other depending on the impact of the mother only, suggesting the presence of a key maternal factor in eggs involved in sex determination (Kenchington *et al.*, 2002; Kenchington *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 1997). A reanalysis of the data of both Saavedra *et al.* (1997) and Kenchington *et al.* (2002) also suggested the existence of minor sex-determining genes inherited from the father (Yusa *et al.*, 2013), but this still need to be clearly demonstrated. Presumably, sex determination and sex ratio in bivalves would be controlled by both genetic and environmental factors (Breton *et al.*, 2018), and it has been hypothesized that the sex determination in *Mytilus* is probably also influenced by temperature (Kenchington *et al.*, 2002). To our knowledge, however, no study has tested this hypothesis yet. It is known that the temperature at which fertilization and embryonic development take place has an impact on the sex ratio of juveniles of the oyster *Crassostrea gigas*, with a significant increase in the frequency of males observed at higher temperatures (Santerre *et al.*, 2013). A temperature effect on sex ratios was also observed in other oyster species, such as *Pinctada margaritifera*, *Crassostrea virginica* and *C. corteziensis* (Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Coe, 1936; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016). Even the environment experienced by parents could impact the phenotype (sex ratio) of their offspring (parental effects), a critical component of evolutionary

adaptation to changing environments (ex. Schwanz, 2016). In fact, intergenerational carryover effects (i.e. the influence of parental exposures on offspring phenotype) have been increasingly documented in the recent years and there are many cases reported across marine phyla (Cnidaria, Echinodermata, Mollusca, Arthropoda and Chordata), including bivalves, in which gametogenesis occurs seasonally. Therefore, year-round environmental changes could result in unexpected impacts on succeeding generations' sex ratios, and compromise reproduction (Spencer *et al.*, 2020). To our knowledge however, intergenerational carryover effects of environmental exposures on offspring sex ratio has not been examined in bivalves so far.

The objective of the present study is thus to investigate the effect of environmental conditions on sex determination of *M. edulis*. To address this objective, artificial fertilizations were performed on individuals collected in three different years and their embryos and larvae were reared at three different temperatures to specifically test if the environment influence offspring sex ratio through effects on parental developing gametes and/or on developing embryos. We took advantage of the existence of the system of doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondria in *Mytilus edulis* to identify the sex of individuals at an early stage of their development. The DUI system involves two highly divergent mitochondrial DNAs, one from the father and transmitted by sperm to only sons, while the second is from the mother and transmitted by the eggs to both daughters and sons. Under this system, females are normally homoplasmic, i.e. only the female-transmitted mitochondrial DNA (F mtDNA) is found throughout the body. In males however, an heteroplasmic state is observed since the F mtDNA is observed in all somatic tissues while the male-transmitted mitochondrial DNA (M mtDNA) is found in the gonad (see Breton *et al.*, 2007; Passamonti and Ghiselli, 2009; Zouros, 2013 for reviews), and also sometimes in somatic tissues along with the F mtDNA (e.g. Dalziel and Stewart, 2002; Breton *et al.*, 2017). Upon fertilization, the spermatozoon transmits 5 M mtDNA to the embryo. During the development of male embryos, these mitochondria form an aggregate which later is isolated in the same blastomere (future germ line) while the M mtDNA are eliminated -by a process that is still not understood- within 24 hours post-fertilization (hpf) during the development of female embryos (Cao *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 1998). Consequently, sex-specific F and M mitochondrial DNAs provide reliable molecular markers that can be used to sex individuals at a very early stage of development, more specifically around 24 hours post-fertilization.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Crossing Experiment

Adult mussels were purchased from fish markets in summer 2016, 2018 and 2019 to assess effect of interannual variation of environmental condition on parental developing gametes and offspring sex ratio. All mussels came from the Prince Edward Island industry near North Rustico, which utilizes indigenous unispecific *Mytilus edulis* seedstocks (Penney *et al.*, 2008). In absence of a clear hypothesis underlying the process of gametogenesis, our objective relied on the reproducibility of the treatments rather than in the identification of environmental factors responsible for interannual variation. For this reason, we did not attempt to characterize the temporal variation of the multiple factors susceptible to affect the sex-ratio (e.g. temperature, food, pH, salinity, interindividual relations, delivery conditions, etc.).

Once in the lab, mussels were kept on ice until further manipulation. To trigger the spawning of the gametes, each mussel was rubbed with a hard brush for about 1 minute, a physical stimulus known to provoke the release of gametes (Miglioli et Kapsenberg, 2017; Young, 1945). After this treatment, the mussels were subjected to thermal stimulation by being introduced in individual containers previously filled with room temperature saltwater (31 ppm, pH 8) (Miglioli et Kapsenberg, 2017; Wong et Arshad, 2013; Young, 1945). If the gametes were not released, the spermatozoa and oocytes were obtained by agitating gonads separately in small Petri dishes filled with saltwater to force the expulsion of the gametes. Individuals of each sex (usually 2 females and 3 males for each crossing experiment) were selected for crosses based on large number of eggs or high frequency of motile sperm. Gametes from the selected individuals were then mixed in individual plastic containers filled with 60 mL of filtered saltwater at the chosen temperature (10, 17 or 23 degrees Celsius) and containing 2.5 mg/L of ampicillin antibiotic (Saavedra *et al.*, 1997). Sperm and eggs from each individual were mixed at an egg/sperm ratio of 1:10 (Kenchington *et al.*, 2002). Embryos were collected after 24 hours (always starting by embryos at 23 °C since they develop more rapidly), which represents the key moment after fertilization where male mitochondria disappear from embryos that will develop into females (Sutherland *et al.*, 1998). After 24 hpf, the embryos were already swimming (trochophores larvae) and when possible, a minimum of 35 embryos were collected for each

cross. Embryos were harvested using a micropipette under a binocular loupe. Each embryo was pipetted separately (1 μ L volume) and transferred to a 0.2 mL PCR tube followed by further binocular loupe verification to ensure the presence of only one embryo in each tube. All embryos were stored at -80 °C until used.

3.2.2 Sex assignment of embryos

Sex identification of *M. edulis* embryos was performed from a two-round PCR using sex-specific mitochondrial markers. A first PCR reaction was performed on the embryos using the newly-designed male-specific primers M16s_for1 (5'-CATTAATTATAAAAATAGA-3') and M16s_rev1 (5'-GTTTTATAACACAGTTAGTT-3'), which amplify a 360 bp-long region of the M mtDNA 16SrRNA gene. The embryo was considered as a male if the first PCR reaction was positive with the expected size product of 360 bp. Samples that did not amplify with the male-specific primers were analyzed further using the female-specific primers Me_Fcox2_For (5'-CTGTGGTTCCTTCGATGAT-3') and Me_Fcox2_Rev (5'-CCTGGGGTTTACTCCACAAA-3'), which amplify a 433 bp-long region of the mitochondrial *Fcox2* gene. After this second PCR, negative samples were discarded from the analyses (16 % = 362 out of 2 300 samples), and those with only one band of 433 bp were considered as females. Rarely (5 % = 101 times out of 1 938 samples), the male-specific band appeared after the second PCR in addition to the female-specific band, these samples were considered as males.

The first PCR reaction mixture (12.5 μ L) consisted of 0.0625 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 1.25 μ L of 10 X Taq reaction buffer, 0.25 μ L of a 10 mM dNTP nucleotide mixture, 0.5 μ L of each primer solution (10 μ M) and 8.9375 μ L of purified water. Reactions were performed in a thermo-cycler for 35 cycles of 95 °C for 20 seconds, 45 °C for 40 seconds and 72 °C for 40 seconds, preceded by an initial denaturation of 5 minutes at 95 °C and followed by a final extension of 5 minutes at 72 °C. The PCR products were electrophoresed on a 1.5 % agarose gel and visualized by a UV photography via a Fusion FX7 imaging system. For the second PCR, the reaction volume was readjusted to 50 μ L, this volume showed the best results among the 3 tested (12.5 μ L 25 μ L and 50 μ L). This was achieved by adding 0.25 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 5 μ L of 10 X Taq reaction buffer, 1 μ L of dNTP nucleotides (10 mM), 0.4 μ L of each primer solution (10 μ M) and 35.25 μ L of purified water. Reactions were performed as above, but for 30 cycles.

3.2.3 Statistical analysis

The canonical correlation analysis (CCA) using chi square distances has been shown to be the most appropriate approach to decompose the variation according to different factors on frequency data (Legendre and Legendre, 2012). This method was first used to assess the effect of interannual variation of the environment experienced by the parents. The effect of the temperature on the sex determination of embryos during their development was then tested by controlling for the “years” factor. Both “years” and “temperature treatments” were considered as qualitative factors in these analyses. Significance of each factors was determined by permutation tests. Finally, to assess the effect of temperature treatments on sex-ratio (the reaction norm), Fisher’s Exact Tests were performed for each cross independently. All analyses were performed with the software R and using the additional package named *vegan* (R Core Team, 2016).

3.3 Results

All the obtained data were regrouped in Table 1, which summarizes the sex ratio across treatments of the 1938 larvae collected from a total of 25 crosses over three years (2016, 2018 and 2019). The proportions of female larvae obtained overall treatments varied from 64% to 98% (figure 4) and were significantly different among the three years (P-value = 0.001, $R^2_{ADJ} = 0.22$; Table 2).

However, the temperature treatments had no significant effect on offspring sex ratios, once the year was taken into account (P-value = 0.144, $R^2_{ADJ} = 0.014$; Table 2). Within a given year, the reaction norms were cross-specific, i.e. the sex ratio varied among the different crosses and/or among the temperature treatments for a same cross and the proportions of female larvae ranged from 0 to 100 % in some cases (Figure 5).

While no clear tendency was observed (Figure 5), differences among temperature treatments were also observed for some crosses within a given year (Figures 4, 5). In 2016, low variation in the proportion of females was detected (96 % to 99 % of female larvae) and a single of the reaction norms was significant (Fisher's Exact Test $P < 0.003$; Table 1). This contrasts with 2019 where the proportions of females ranged between 30 % and 96 % and 3 out of 4 reaction

norms were significant (Fisher's Exact Test $P < 1.723E-8$; Table 1). In 2018, the proportions of females varied from 55 % to 74 % and 6 out of 14 reaction norms were significant (Fisher's Exact Test $P < 0.006$; Table 1).

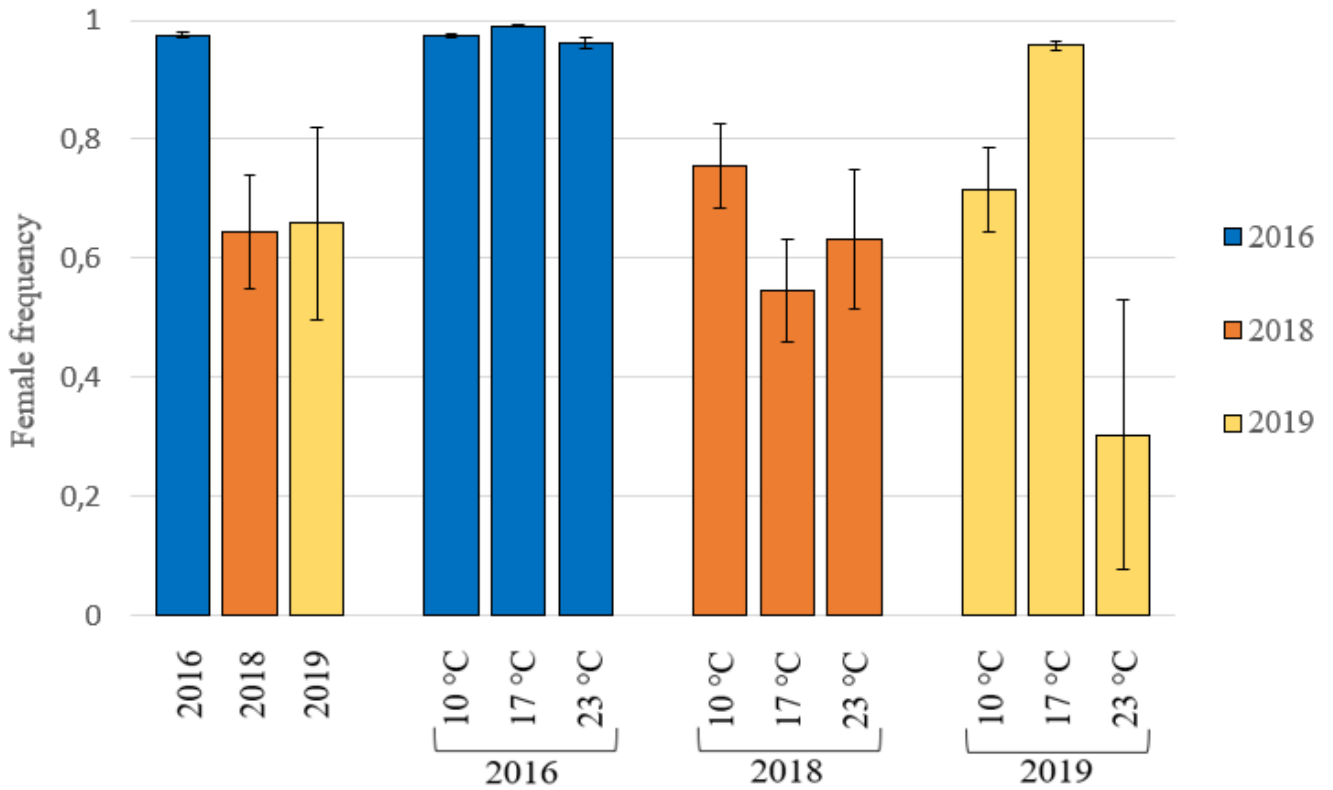


Figure 4. Histogram showing the mean and variance in female frequency for each sampling year (2016, 2018, 2019) and temperature tested (10 °C, 17 °C and 23 °C).

Table 1. Sex distribution in pair matings of *M. edulis* in 2016, 2018 and 2019 at 10, 17 and 23 degrees Celsius.

Years	Cross (female x male)	10°C			17°C			23°C		
		Total of embryos (n)	Females	Males	Total of embryos (n)	Females	Males	Total of embryos (n)	Females	Males
2016	♀1♂1*	26	26 (100 %)	0 (0 %)	27	26 (96 %)	1 (4 %)	37	28 (76 %)	9 (24 %)
	♀1♂2	20	18 (90 %)	2 (10 %)	36	35 (97 %)	1 (3 %)	15	15 (100 %)	0 (0 %)
	♀2♂3	11	11 (100 %)	0 (0 %)	27	27 (100 %)	0 (0 %)	11	11 (100 %)	0 (0 %)
	♀3♂4	28	28 (100 %)	0 (0 %)	22	22 (100 %)	0 (0 %)	15	15 (100 %)	0 (0 %)
	♀3♂5	35	35 (100 %)	0 (0 %)	34	34 (100 %)	0 (0 %)	38	37 (97 %)	1 (3 %)
	♀4♂6	40	40 (100 %)	0 (0 %)	26	26 (100 %)	0 (0 %)	14	14 (100 %)	0 (0 %)
	♀4♂7	12	11 (92 %)	1 (8 %)	39	39 (100 %)	0 (0 %)	30	30 (100 %)	0 (0 %)
Total 2016	7 crosses	172	169 (98 %)	3 (2 %)	211	209 (99 %)	2 (1 %)	160	150 (94 %)	10 (6 %)
2018	♀5♂8*	37	34 (92 %)	3 (8 %)	35	15 (43 %)	20 (57 %)	11	7 (64 %)	4 (36 %)
	♀6♂8	30	28 (93 %)	2 (7 %)	33	32 (97 %)	1 (3 %)	21	20 (95 %)	1 (5 %)
	♀6♂9	36	36 (100 %)	0 (0 %)	34	33 (97 %)	1 (3 %)	35	34 (97 %)	1 (3 %)
	♀6♂10*	20	18 (90 %)	2 (10 %)	37	29 (78 %)	8 (22 %)	35	35 (100 %)	0 (0 %)
	♀7♂11*	25	7 (28 %)	18 (72 %)	36	3 (8 %)	33 (92 %)	34	14 (41 %)	20 (59 %)
	♀8♂12	23	11 (48 %)	12 (52 %)	36	15 (42 %)	21 (58 %)	13	3 (23 %)	10 (77 %)

	♀9♂13	12	6 (50 %)	6 (50 %)	34	11 (32 %)	23 (68 %)	23	5 (22 %)	18 (78 %)
	♀9♂14	8	7 (87.5 %)	1 (12.5 %)	37	28 (76 %)	9 (24 %)	6	6 (100 %)	0 (0 %)
	♀10♂15	33	13 (39 %)	20 (61 %)	33	15 (45 %)	18 (55 %)	33	14 (42 %)	19 (58 %)
	♀10♂16*	20	18 (90 %)	2 (10 %)	31	18 (58 %)	13 (42 %)	8	1 (12.5 %)	7 (87.5 %)
	♀11♂15	6	6 (100 %)	0 (0 %)	22	14 (64 %)	8 (36 %)	10	10 (100 %)	0 (0 %)
	♀12♂16*	35	34 (97 %)	1 (3 %)	33	28 (85 %)	5 (15 %)	35	17 (49 %)	18 (51 %)
	♀12♂17	33	10 (30 %)	23 (70 %)	22	3 (14 %)	19 (86 %)	21	8 (38 %)	13 (62 %)
	♀13♂17*	31	29 (94 %)	2 (7 %)	24	6 (25 %)	18 (75 %)	9	9 (100 %)	0 (0 %)
Total 2018	14 crosses	349	257 (74 %)	92 (26 %)	447	250 (56 %)	197 (44 %)	294	183 (62 %)	111 (38 %)
2019	♀14♂18*	31	20 (65 %)	11 (35 %)	34	34 (100 %)	0 (0 %)	14	3 (21 %)	11 (79 %)
	♀14♂19*	34	13 (38 %)	21 (62 %)	24	24 (100 %)	0 (0 %)	13	0 (0 %)	13 (100 %)
	♀15♂20*	36	30 (83 %)	6 (17 %)	35	29 (83 %)	6 (17 %)	13	0 (0 %)	13 (100 %)
	♀15♂21	38	38 (100 %)	0 (0 %)	21	21 (100 %)	0 (0 %)	12	12 (100 %)	0 (0 %)
Total 2019	4 crosses	139	101 (73 %)	38 (27 %)	114	108 (95 %)	6 (5 %)	52	15 (29 %)	37 (71 %)
Total	25 crosses	660	527 (80 %)	133 (20 %)	772	567 (73 %)	205 (27 %)	506	348 (69 %)	158 (31 %)

*Cross that obtained a significative reaction norm from the Fisher's Exact Test.

Table 2. Results of the canonical correlation analysis performed on *Mytilus edulis* offspring sex distribution data.

	Degree of freedom	Chi square	P-value	Adjusted R ²
Year	2	0.11318	0.001 ***	0.22072070
Residual	72	0.35382	-	-
Temperature	2	0.01121	0.144	0.01381089
Residual	72	0.34261	-	-

Significance of P-values: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001

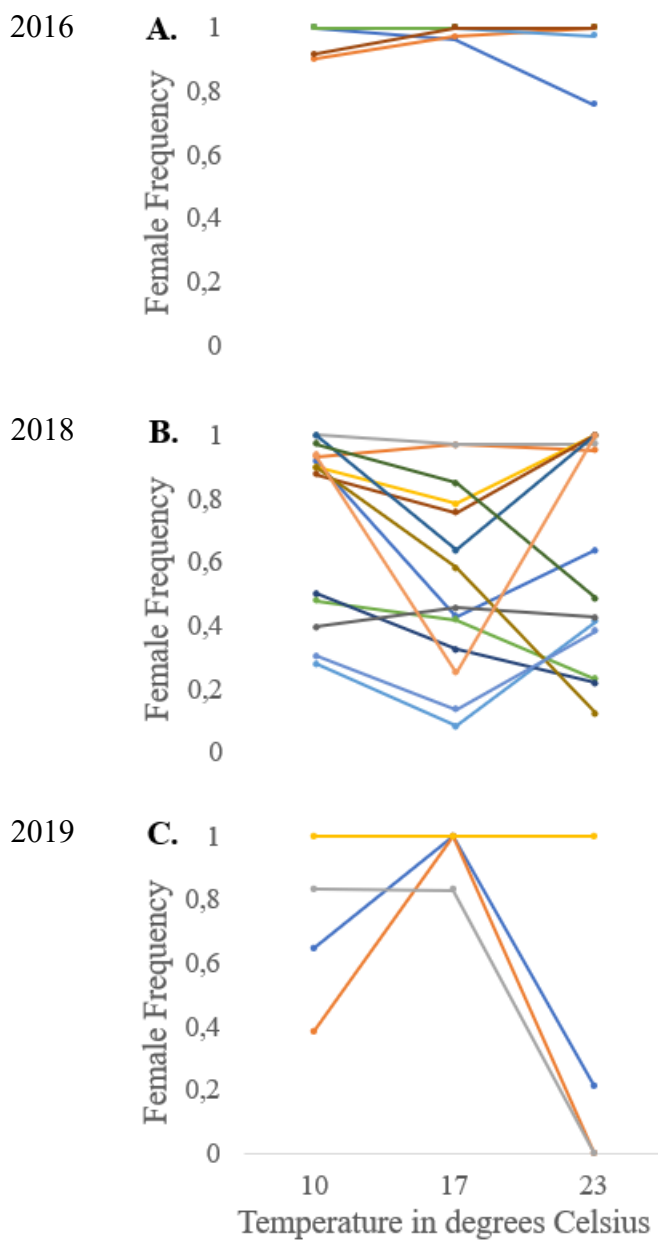


Figure 5. **A.** Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2016. **B.** Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2018. **C.** Female frequency for each cross at 10, 17 and 23 degrees Celsius in the year 2019.

3.4 Discussion

*3.4.1 Effect of environmental conditions on sex determination of *Mytilus edulis**

Previous studies suggested that offspring sex ratio in *Mytilus edulis* is dependant of the female parent. Indeed, using controlled crosses at a particular temperature, Saavedra *et al.* (1997) and Kenchington *et al.* (2002) reported that regardless of the male to which they were mated, females always produced either (i) all female progeny, (ii) all male progeny, or (iii) a roughly 50:50 sex ratio. Counter to these previous observations, our results not only show that *M. edulis* females do not always produce sex-biased progeny regardless of the male to which they are mated, but also that the sex ratio of the progeny produced by a female is not necessarily maintained according to the temperature at which the mating occurs. More importantly, our results also suggest an influence of parental exposures on offspring sex ratio, i.e. the possibility that year-to-year variations in the environment influence the gametogenesis of the parents and subsequently affect the future generation. To our knowledge, our study is the first suggesting that intergenerational carryover effects could play a role in sex determination in bivalves. Most studies concerning bivalves exposed the parents to acidification or elevated temperatures during de novo gamete formation (gametogenesis) and focused their analyse on the offspring fitness (e.g. growth and survival) (reviewed in Spencer *et al.*, 2020). In the wild numerous abiotic and biotic factors can contribute to intergenerational carryover effects. Since our mussels were sampled in the wild it is nearly impossible to know exactly what explain our results or which underlying mechanism is affected. Even if intergenerational carryover effects from non-genetic inheritance operate alongside genetically inherited factors, it is hard to know for how many generations they will remain heritable. Non-genetic inheritance incorporates a variety of different mechanisms (transmission of epigenetic marks, transmission of cytoplasmic or somatic factors, etc.). Consequently, the phenotype of a specific individual depends not only on its own genotype and environment, but also upon its recent ancestors' phenotype and environment (Head *et al.*, 2016; Salinas *et al.*, 2013). One of the major environmental factors affecting living organisms is ambient temperature (Gamble and Zarkower, 2012; Gunter, 1957). Many cases have already been reported, including in bivalves, where parents exposed to different temperatures affected their

offspring in many ways (Salinas *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2020). Although our study is the first showing that parental exposures may impact sex determination in bivalves, it is not the first time that the parental environment would play a determining role in the sex determination process of the offspring (e.g. Schwanz, 2016). For example, it has been demonstrated in the jacky dragon *Amphibolurus muricatus*, an oviparous temperature-dependent sex determination lizard, that the sex ratio outcome could be manipulated by the parental thermal environment. Non-genetic parental effects can enhance or reduce offspring fitness, and become more complex through persistence to many generations, or by making discordant the maternal and paternal effects (Schwanz, 2016). Indeed, although non-genetic parental effects are often linked to the mother, there are also cases where the paternal environment can induce transmissible changes through the sperm (Schwanz, 2016; Ritchie and Marshall, 2013). In marine invertebrates, the sperm can experience a vast diversity of conditions. For example, it was observed in the polychaete worm *Galeolaria gemineoa* that the environment of the sperm affected larval performance (Ritchie and Marshall, 2013). All these different effects could explain the high variability in our results compared to previous studies that use controlled crosses and environmental conditions (Saavedra *et al.*, 1997; Kenchington *et al.*, 2002).

Many external stimuli such as temperature, photoperiod, pollution, food availability or any social factor like competition or predation can affect the offspring directly or indirectly via intergenerational carryover effects (Bachtrog *et al.*, 2014; Schwanz *et al.*, 2020; Ritchie and Marshall, 2013). Therefore, as temperature rises and ocean acidification progresses it is very important to consider more interannual factors as they might be able to predict how *Mytilus* populations will respond across generations. More studies with controlled parental environment are needed to further understand what external factor played a key role in the offspring sex determination in this species.

3.4.2 *Effect of environmental conditions and temperature on embryos*

In contrast to the interannual (parental) effect, our analyses did not reveal a generalized effect of the temperature on sex determination and sex ratios in *Mytilus edulis* embryos. Nevertheless, an effect of the temperature was observed when each cross was analysed individually. Thus, the temperature during embryos development affected only some of the offspring depending on the genetic information the parent transmitted. This is not what we

expected since other studies on a variety of oyster species showed an generalized effect of temperature on sex ratios (Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Coe, 1936; Santerre *et al.*, 2013; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016), and also because the determinants of sex in most bivalve species studied to date appear to be both genetic and environmental (reviewed in Breton *et al.*, 2018). Even if an overall trend toward a higher proportion of males at higher temperature was observed, each cross analyzed separately seemed to have its own specific norm of reaction. That said, Fisher's Exact Test on each cross highlighted the parental genetic effect since many were significant. In other words, it would be impossible to predict or evaluate the effect of a global climate change on sex ratios only by looking at the proportion of females and males produced independently by each cross for this species since it is under the control of many different factors.

3.4.3 *Efficacy of protocol*

In this study, we took advantage of the existence of the system of doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondria in *Mytilus edulis* to investigate the effect of temperature on sex ratio of early embryos. However, it has to be noted that there are two main limitations in our experimental strategy to consider: (i) the presence of M-positive females (i.e. having the male-specific M mtDNA) that could be scored as males and (ii) the presence of M-negative males (i.e. containing only the F mtDNA) that could be scored as females. M-positive females have already been reported in previous studies investigating controlled crosses in *M. edulis* (e.g. Saavedra *et al.*, 1997). The occurrence of such females has been mainly explained by a malfunctioning of the elimination mechanism of sperm mitochondria in some embryos (Kyriakou *et al.*, 2010; Ghiselli *et al.*, 2011; Zouros, 2013). However, it seems that M-positive females are rather rare in this species. In previous controlled crossing experiments, the appearance rate was 0.62 % (Saavedra *et al.*, 1997) and 0 % (Kenchington *et al.*, 2009), which highly suggests that our experimental strategy is appropriate and that if there are M-positive females in our data, they should represent a fairly low number. This is in line with the literature that reported low frequency of heteroplasmic females in natural populations, such females being more common in heterospecific mating (hybridization events) than in conspecific mating (Fisher and Skibinski, 1990; Steward *et al.*, 1995; Wenne and Skibinskin, 1995; Quesada *et al.*, 1996; Rawson *et al.*, 1996).

The presence of M-negative sons can be explained in two ways: 1) the amount of the M genome is below the minimum required for its detection by PCR (but this method has been

proven successful before; Sutherland *et al.*, 1998) or 2) some males could contain a recently-masculinized M-type mtDNA, i.e. a F mtDNA that invaded the male route of inheritance (Saavedra *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2018). We controlled our fathers and all of them carried the standard M-type mtDNA (data not shown). Moreover, in previous controlled crossing experiments, Saavedra *et al.* (1997) observed only 2.5 % occurrence of M-negative males (following a re-analysis by Theologidis *et al.*, 2007), whereas Kenchington *et al.* (2009) reported an appearance of 3.8 %. Again, this suggests that our experimental strategy is valid, if there were M-negative males in our results, they would be in relatively low number. All limitations considered, we think that our protocol is reliable and so should be our results.

3.4.4 Implications and perspectives

According to United Nations (2019), the human population is projected to reach 9.5 billion by 2050. To fulfil the increasing protein demand arising from global population growth, an important solution resides in the increase of marine food production (Naylor *et al.*, 2000). Between 1995 and 2016, worldwide shellfish production increased from around 7 to 15 million tons of mussels, oysters, scallops and clams (F.A.O., 2018). To maximize reproduction and growth of species in cultivation, it is important to have a good knowledge of the factors involved in their sex determination, sexual differentiation, gonadal maturation and development (Devauchelle, 2000; López-Landavery *et al.*, 2017). For example, several strategies can be developed to manipulate sex ratios and produce large quantities of the sex with the highest growth rate (Coe and Fox, 1942; López-Landavery *et al.*, 2017). Asynchronous growth and sexual dimorphism – with females that grow more quickly than males – is the case of the blue mussel *Mytilus edulis*, the most cultivated bivalve mollusk in the Gulf of St. Lawrence (Coe and Fox, 1942; Fisheries and Oceans Canada, 2003; Mills and Côté, 2003).

In recent years, *M. edulis* has suffered a significant decline in the Atlantic provinces and the United States (Jansen *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Sorte *et al.*, 2013). Several hypotheses have been proposed to explain this decline, including overexploitation, water acidification, pollution, diseases, the increase in predators and global warming (Jansen *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Sorte *et al.*, 2013). Being sessile animals, blue mussels and other bivalves face enormous amounts of disturbance without being able to escape. From a global warming point of view, these mollusks could be at risk of local extinction in the

event of drastic changes in the sex ratio of their populations. We now know that parental exposures to external factors can skewed sex ratios which make it even harder for us to ensure the conservation of this marine species.

3.5 Conclusion

Our study suggested that parental environmental exposures may impact the sex determination and offspring sex ratios in the blue mussel *Mytilus edulis*. Future experiment should therefore consider the parent environment and possible non-genetic inheritance in order to better understand the external factors that may possibly affect the sex determination process in this species. Moreover, our study points to the importance of preserving a high genetic diversity in *M. edulis* populations to maintain their reproductive fitness. Otherwise, populations could show important biases toward one sex or the other therefore putting the species in danger if these biases become dramatic.

Author Contributions

A.D., A.L., T.C., S.B. contributed in the data acquisition, A.D., B.A., S.B. participated in the data analyses and the study design. The final version of the manuscript was approved by A.D., B.A. and S.B.

4. Discussion

L'objectif du projet était de tester l'effet des conditions environnementales sur le déterminisme du sexe chez *Mytilus edulis*. Premièrement, un effet intergénérationnel a été découvert au travers des différentes années testées. Le déterminisme du sexe est donc affecté par les conditions environnementales des parents. Deuxièmement, chaque croisement réagit différemment aux traitements de température. Ces deux découvertes sont en faveur d'un déterminisme du sexe à la fois génétique et environnemental. En revanche, nos résultats remettent en question la classification des femelles en trois types, une minorité de nos croisements ont conservé le même biais. Cela dit, notre étude apporte un aspect supplémentaire à considérer dans le déterminisme du sexe chez *Mytilus* : l'effet parental.

4.1 Efficacité du protocole expérimental

Avant de discuter sur les résultats générés par la présente étude, il est à noter que l'approche expérimentale comporte certaines limitations. Afin de démontrer la fiabilité de notre méthode expérimentale, nous allons clarifier ces limites. Nous avons utilisé à notre avantage un système déjà existant chez *Mytilus*, soit la transmission doublement uniparentale. Il existe deux limitations dans notre stratégie expérimentale : (i) la présence de femelle ayant l'ADNmt M (M-positive) et la présence de mâle n'ayant que l'ADNmt F (M-négatif). Dans le premier cas, le danger est de les identifier comme des mâles. La présence de femelle M-positive n'est pas nouvelle lors de croisements contrôlés chez *M. edulis* (Saavedra *et al.*, 1997). L'apparition de ce type de femelle est expliquée par le dysfonctionnement du mécanisme d'élimination des mitochondries provenant du sperme dans certains embryons (Kyriakou *et al.*, 2010; Ghiselli *et al.*, 2011; Zouros, 2013). Une seconde explication possible est la présence du génome mâle en quantité minime dans l'œuf, et ce en plus du génome maternel que contient déjà celui-ci. Dans ce cas précis, l'ADNmt M se comporte comme l'ADNmt F et se disperse dans les cellules somatiques (Kyriakou *et al.*, 2010). Cependant, la présence d'ADNmt M dans les œufs d'espèce DUI est un sujet controversé. Par exemple, la présence d'œufs hétéroplastiques a été reportée

chez *M. galloprovincialis* un proche parent de *M. edulis* (Obata *et al.*, 2006; Obata *et al.*, 2007). À l'opposé, pas la moindre présence de génome mâle n'a été obtenue dans une préparation hautement purifiée d'œuf de *Ruditapes philippinarum* révélant une homoplasmie très stricte chez les gamètes d'espèces DUI (Ghiselli *et al.*, 2011). Même si la question subsiste sur l'origine de l'ADNmt M dans les femelles de *Mytilus edulis*, nous savons que le phénomène est rare chez cette espèce. Par exemple, lors d'une expérimentation avec des croisements contrôlés, Saavedra *et al.* (1997) ont obtenu seulement deux femelles M-positives sur un total de 324 femelles analysées (0,62 %), tandis que Kenchington *et al.* (2009) n'a relevé aucune femelle M-positive sur les 147 embryons provenant de parent *M. edulis*. Donc, notre protocole expérimental est approprié et s'il y a présence de femelle M-positive cela représenterait un nombre négligeable (soit 0,6 % de 1442 embryons = ~9). Ceci est en accord avec la littérature qui reporte un taux d'apparition très bas de femelle hétéroplasmique dans les populations naturelles. Il est d'ailleurs démontré que les cas de femelle hétéroplasmiques sont plus fréquents lors de croisement hétérosécifique (événements d'hybridation) que dans les croisements consécifique (Fisher et Skibinski, 1990; Stewart *et al.*, 1995; Wenne et Skibinski, 1995; Quesada *et al.*, 1996; Rawson *et al.*, 1996).

Pour le second cas, le danger est d'identifier ces mâles comme étant des femelles. La présence de mâle M-négatif peut être expliquée de deux façons : 1) la quantité de génomes mâles est sous le seuil détecté par la PCR (ce qui est peu probable dans notre cas, comme notre méthode a déjà été utilisée avec succès précédemment; Sutherland *et al.*, 1998) et 2) certains mâles pourraient avoir un ADNmt M récemment masculinisé. Dans le deuxième scénario, l'ADNmt F se serait glissé dans les voies de transmission mâle (Saavedra *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2018). Lors du phénomène de renversement des rôles ou masculinisation, l'ADNmt M est remplacé par un ADNmt d'origine femelle beaucoup moins divergent (jusqu'à 4 %) (Revue dans Zouros, 2013). Ce phénomène a été observé chez des populations de *M. edulis* en Nouvelle-Écosse avec un taux d'apparition variant de 0 % et 24,1 % (Stewart *et al.*, 2018). Malheureusement, à notre connaissance, aucune étude n'a observé les événements de masculinisation dans les élevages de moule bleue provenant de l'île du Prince Édouard. Cette information nous est nécessaire pour réaliser une meilleure estimation de la présence de mâles masculinisés dans nos résultats. Cela dit, tous nos mâles ont été testés et portaient un ADNmt M standard (résultats non affichés). De plus, ce phénomène semble relativement rare; nous observons un taux d'apparition de 2,5 % (6

embryons M-négatif sur un total de 239 embryons mâles) chez Saavedra *et al.* (1997) suite à une réanalyse des données par Theologidis *et al.* (2007) et un taux de 3,8 % (2 embryons sur 52 embryons mâles) M-négatif chez Kenchington *et al.* (2009). Donc, les cas de mâles M-négatifs seraient assez négligeables. De ce fait, notre protocole ainsi que nos résultats devraient être assez fiables. Bref, ces informations suggèrent que notre expérimentation est valide et que s'il y avait des mâles M-négatif leur présence serait relativement faible. En considérant ces limitations, nous croyons que notre protocole et nos résultats sont fiables.

4.2 Transmission doublement uniparentale des mitochondries et déterminisme du sexe

L'approfondissement de nos connaissances sur le lien entre la DUI et le déterminisme du sexe chez *Mytilus* n'était pas l'objectif du présent projet. Néanmoins, nos résultats divergent des autres études qui ont utilisé des croisements contrôlés; ces dernières ont servi à l'établissement d'un modèle théorique sur le déterminisme du sexe et la DUI chez *Mytilus* (Yusa *et al.*, 2013; Zouros, 2020), ce qui laisse présager la nécessité de réviser ce modèle à l'aide d'études supplémentaires. Il y a un lien clair entre le sexe et le patron d'héritabilité mitochondrial chez les bivalves (DUI), mais ce qui n'est pas clair c'est s'il existe un lien de causalité entre eux. Certaines hypothèses mentionnent la possibilité que le système de transmission DUI soit le premier exemple où des gènes mitochondriaux influenceraient le déterminisme du sexe chez les animaux (Breton *et al.*, 2011). Cela dit, deux modèles récemment proposés impliquent des mécanismes moléculaires pour expliquer le déterminisme du sexe et gardent les deux phénomènes isolés (Zouros, 2013; Zouros, 2020). Par contre, ces modèles reposent sur deux principales observations. La première étant que les femelles moules puissent toutes être classées selon les trois types présentés précédemment et deuxièmement que le mâle ne joue aucun rôle dans le déterminisme du sexe (Saavedra *et al.*, 1997; Zouros, 2013; Zouros, 2020). Selon nos résultats, ces deux principes doivent être retravaillés, car certaines femelles n'ont pas maintenu les mêmes proportions dans leur progéniture selon le traitement de température ou le mâle avec lequel elles étaient croisées. C'est pourquoi les informations que nous avons désormais remettent en question la fiabilité de ces modèles.

Afin de réviser ces modèles adéquatement, il serait préférable d'éclaircir si le génome mitochondrial joue un rôle dans le déterminisme du sexe chez *Mytilus* ou non. Il existe déjà dans la nature des cas où le déterminisme du sexe implique une interaction entre les gènes nucléaires et les gènes mitochondriaux, ceci est d'ailleurs grandement étudié chez les plantes angiospermes (Chase, 2007). Il est connu que ce phénomène est affecté par des changements de température, pouvant même être complètement inhibé (Abdel-Ghani *et al.*, 2012). Donc, le déterminisme du sexe lui-même peut être influencé par la température, mais la transmission des mitochondries peut elle aussi être affectée (Yan *et al.*, 2007; Hsu et Chou, 2017). Toutes ces hypothèses et possibilités indiquent clairement la nécessité de faire plus d'expérimentations avec des croisements contrôlés, mais surtout ayant des facteurs environnementaux spécifiques comme la température. C'est de cette façon que nous arriverons à perfectionner les modèles du déterminisme du sexe et de la DUI chez *Mytilus spp.*

4.3 Effet parental sur le rapport des sexes chez *Mytilus edulis*

Nos résultats suggèrent que les variations annuelles dans l'environnement affectent la gamétogenèse chez les parents produisant ainsi un effet sur le rapport des sexes (et sur probablement autre chose aussi) des générations à venir chez *Mytilus*. L'effet sur les futures générations peut autant être positif que négatif sur la valeur adaptative des descendants. Cela dit, il est clair que les conditions environnementales fluctuent d'année en année, avec une tendance de la température et l'acidification des océans à augmenter. Néanmoins, les données de température moyennes des différentes années testées, ne semblaient pas varier de façon importante entre celle-ci (Annexe A. Données supplémentaires, Tableau 3). Ceci n'illustre qu'un seul facteur auquel il est possible d'avoir facilement accès, malheureusement, il n'est pas possible d'obtenir tous les facteurs pouvant avoir joué un rôle dans ce cas précis. Il existe une grande variété de stimuli externes comme la température, la photopériode, la pollution ou même certains facteurs sociaux qui peuvent affecter la progéniture directement ou indirectement via l'effet parental (Bachtrog *et al.*, 2014; Schwanz *et al.*, 2020; Ritchie et Marshall, 2013). Aussi, il est de plus en plus important de prendre en considération les effets de transmission intergénérationnelle comme ils peuvent jouer un rôle clé dans le futur de certaines espèces. À notre connaissance,

notre étude est la première à prendre en compte la possibilité qu'une influence provenant des conditions environnementales des parents affecte le rapport des sexes de la génération suivante. Jusqu'à maintenant, la grande majorité des études sur les effets de transmission intergénérationnelle chez les bivalves ont exposé les parents à des conditions d'acidifications ou encore à une augmentation de la température durant le processus de formation des gamètes (gamétogenèse) et ont observé des variations de fitness (survie et croissance) chez les larves (revues dans Spencer *et al.*, 2020). Ces études ont été réalisées en conditions contrôlées, cependant les effets interannuels n'ont pas été pris en compte. Sachant qu'en nature il existe une étendue de facteurs biotiques et abiotiques pouvant contribuer à la transmission intergénérationnelle, et que les moules de notre étude proviennent d'environnement naturels, il devient pratiquement impossible de déterminer exactement quelle condition explique le plus nos résultats ou encore quel mécanisme est impliqué. Nous ne pouvons pas non plus savoir pour combien de générations l'effet intergénérationnel reste transmissible, car cette transmission non génétique agit côte à côte avec des facteurs génétiques. De plus, les facteurs non génétiques ont plus d'un mécanisme permettant leur transmission (transmission de marques épigénétiques, transmission de facteurs cytoplasmiques ou somatique, etc.). En d'autres mots, le phénotype d'un individu ne dépend pas seulement des gènes qu'il reçoit de ses parents ou de l'environnement dans lequel il se développe, mais aussi du phénotype de ses ancêtres et de l'environnement dans lequel ils ont vécu (Head *et al.*, 2016; Salinas *et al.*, 2013). Même si les effets parentaux non génétiques sont souvent associés à la mère, il existe aussi certains cas où les conditions environnementales du père produisent des changements transmissibles via les spermatozoïdes (Schwanz, 2016; Ritchie et Marshall, 2013). D'ailleurs, il a été observé chez un ver polychète, *Galeolaria gemineoa*, que l'environnement des spermatozoïdes affecte la survie de la progéniture (Ritchie et Marshall, 2013). Chez les invertébrés marins, les spermatozoïdes font face à une énorme diversité de conditions. L'une des conditions environnementales majeures affectant tous les organismes vivants est la température ambiante (Gamble et Zarkower, 2012; Gunter, 1957). Les bivalves ne font pas exception; plusieurs travaux ont déjà relevé divers effets chez la progéniture de parents exposés à différentes températures (Salinas *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2020). D'ailleurs, un effet parental de la température sur le rapport des sexes a déjà été observé chez le lézard, *Amphibolurus muricatus*. Même si ce lézard ovipare a généralement un mode de déterminisme du sexe dépendant de la température, il est possible de modifier le rapport des

sexes obtenu en manipulant le temps d'exposition à la chaleur des parents seulement (Schwanz, 2016). Lorsque tout est pris en considération, on comprend qu'il faut inclure les facteurs intergénérationnels afin de prédire comment les populations de *Mytilus edulis* varieront pendant les prochaines générations. Il va sans dire que d'autres études contrôlant l'environnement des parents seront nécessaires pour établir quels facteurs ont un rôle dominant dans le déterminisme du sexe de cette espèce.

4.4 Effet des conditions environnementales et de la température sur les embryons

Notre étude prend aussi en compte l'effet direct possible sur l'embryon de *M. edulis* en développement face à trois températures différentes. Bien qu'aucun effet généralisé de la température sur le rapport des sexes des embryons n'ait été observé, nous avons pu découvrir que chaque croisement pris individuellement répond selon une norme qui lui est propre. De cette façon, un effet de la température lors du développement des embryons ne peut être ignoré. En soi, l'effet de la température tôt dans le développement varie selon l'information génétique qui a été transmise des parents. Cela dit, il est important de mentionner que ce que nous observons ici ne peut pas être expliqué seulement par la température. En effet, il est bien connu que le métabolisme basal des ectodermes est affecté par la température, et que plus elle augmente, plus l'animal mange (Clarke et Fraser, 2004). De ce fait, il nous est impossible de dissocier l'effet de l'alimentation et celui de la température. Dans tous les cas, ce n'est pas tout à fait ce à quoi nous nous attendions sachant que plusieurs espèces d'huîtres affichent un effet généralisé de la température sur le rapport des sexes (Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Coe, 1936; Santerre *et al.*, 2013; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016). Dans notre cas, même si une tendance vers une plus grande proportion de mâles à une plus grande température est observée, elle n'est pas significative. Cela dit, le déterminisme du sexe chez la plupart des bivalves semble impliquer à la fois des facteurs génétiques et environnementaux (Revu dans Breton *et al.*, 2018). Nos tests réalisés sur chaque croisement individuellement mettent en évidence l'effet de facteurs génétiques provenant des parents, car plusieurs étaient significatifs. Par contre, nos résultats ne

sont pas en mesure d'aider à prédire l'effet du réchauffement climatique sur le rapport des sexes des populations *Mytilus*.

4.5 Enjeux et perspectives

Les Nations Unies projettent que la population humaine atteindra près de 9,5 billions d'individus d'ici 2050. Cette augmentation créera certainement une pression sur tous types de cultivateurs provoquant une hausse dans la demande et les aliments provenant de la mer ne feront pas exceptions (Naylor *et al.*, 2000). Dans le but de maximiser la production et la croissance des bivalves il est indispensable d'en apprendre plus sur les facteurs impliqués dans le déterminisme du sexe, la différenciation du sexe, la maturation des gonades et le développement (Devauchelle, 2000; López-Landavery *et al.*, 2017). Certains facteurs sont déjà bien établis pour ce qui est de *Mytilus edulis* (cycle de reproduction, maturation, développement), mais d'autres sont encore grandement incompris. Des baisses significatives du nombre d'individus dans les populations ont déjà été relevées récemment dans les provinces de l'Atlantique et des États-Unis (Jansen *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Sorte *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces déclin, mais celles-ci ne semblent pas avoir été confirmées. Les moules et autres bivalves sont des espèces sessiles, ils font donc directement face à toutes les modifications qui se présentent dans leur environnement sans pouvoir y échapper. C'est pourquoi ces mollusques pourraient devenir facilement à risque d'extinction locale dans l'éventualité qu'un changement important survienne dans leur environnement, causant directement l'extinction, ou indirectement par le biais de modifications drastiques des rapports des sexes des populations. Nous savons maintenant que les conditions environnementales auxquelles les parents font face peuvent affecter ces derniers, ajoutant une difficulté supplémentaire quant à notre capacité d'agir pour la conservation de cette espèce marine. *Mytilus edulis* représente une des espèces de bivalves les plus cultivées dans le monde, sa disparition aurait un impact économique majeur sur l'économie, par exemple au Canada ainsi qu'en Europe, et ce sans parler des autres impacts que cela pourrait causer (Coe et Fox, 1942; Pêches et Océans Canada, 2003; Robert *et al.*, 2013).

5. Conclusion

Notre étude a permis de mettre en avant l'importance de considérer les possibles effets intergénérationnels dans les expérimentations futures. Les différentes conditions environnementales doivent donc être évaluées minutieusement afin de fournir des réponses aux multiples hypothèses et questionnements qui planent encore au sujet du déterminisme du sexe chez *M. edulis*. Quels sont les facteurs environnementaux subits par les parents et pouvant affecter le rapport des sexes de la génération future ? Est-ce que cet effet provient de la mère, du père, ou des deux parents ? Est-ce que l'exposition des parents à ce facteur doit spécifiquement être durant la gamétogenèse ou est-ce que l'effet est présent si l'exposition au facteur n'est pas durant cette période ? Quels sont réellement les facteurs génétiques jouant un rôle dans le déterminisme du sexe ? La DUI est-elle impliquée dans le mécanisme de déterminisme du sexe ? Toutes ces questions ne font qu'accentuer certains mystères concernant *Mytilus* et font se développer un intérêt grandissant pour ces mollusques si particuliers.

Références

- Abdel-Ghani, A. H., Frey, F. P. et Parzies, H. K. (2012). Effect of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility in cultivated barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant Breed*, 132, 42-47. doi:10.1111/pbr.12012
- Anantharaman, S. et Craft, J. A. (2012). Annual variation in the levels of transcripts of sex-specific genes in the mantle of the common mussel, *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 7(11), e50861. doi: 10.1371/journal.pone.0050861
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T.-L., ... (2014). Sex determination: Why so many ways of doing it? *PLoS Biology*, 12, e1001899. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D. T. et Blier, P. U. (2006). Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus spp.*). *Genetics*, 172(2), 1107-1119. doi: 10.1534/genetics.105.047159
- Breton, S., Beaupre, H. D., Stewart, D. T., Hoeh, W. R. et Blier, P. U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. *Trends Genetics*, 23(9), 465-474. doi: 10.1016/j.tig.2007.05.011
- Breton, S., Stewart, D. T., Shepardson, S., Trdan, R. J., Bogan, A. E., Chapman, E. G., ... (2011). Novel protein genes in animal mtDNA: a new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Molecular Biology and Evolution*, 28, 1645-1659.

- Breton, S., Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Stewart, D. T., Passamonti, M. (2014). A resourceful genome: updating the functional repertoire and evolutionary role of animal mitochondrial DNAs. *Trends Genetics*, 30, 555-64.
- Breton, S. et Stewart, D. T. (2015). Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes. *Genome*, 58(10), 423-431. doi: 10.1139/gen-2015-0090
- Breton, S., Bouvet, K., Auclair, G., Ghazal, S., Sietman, B. E., Johnson, N., ... Guerra, D. (2017). The extremely divergent maternally- and paternally-transmitted mitochondrial genomes are co-expressed in somatic tissues of two freshwater mussel species with doubly uniparental inheritance of mtDNA. *PLoS ONE*, 12(8), e0183529. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183529>
- Breton, S., Capt, C., Guerra, D. et Stewart, D. (2018). Sex Determining Mechanisms in Bivalves. *Preprints*. doi: 10.20944/preprints201706.0127.v1
- Beukeboom, L. et Perrin, N. (2014) The evolution of sex determination. *Oxford University Press*, Oxford
- Cao, L., Kenchington, E. et Zouros, E. (2004). Differential Segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel. *Genetics*, 166, 883-894.
- Chase, C. D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics*, 23(2), 81-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.12.004>
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M. R. et Mazón-Suástegui, J. M. (2008). Prospective Culture of the Cortez Oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, Gametogenic Activity, and Condition Index. *Journal of Shellfish Research*, 27(4), 711-720. doi: 10.2983/0730-8000(2008)27[711:Pcotco]2.0.Co;2
- Clarke, A et Fraser, K. P. P. (2004). Why Does Metabolism Scale with Temperature? *Functional Ecology*, 18(2), 243-251, Repéré le 05-11-2020 à <http://www.jstor.org/stable/3599364>
- Coe, W. R. (1936). Environment and Sex in the Oviparous Oyster *Ostrea virginica*. *The Biological Bulletin*, 71(2), 353-359. doi: 10.2307/1537440
- Coe, W. R. et Fox, D. L. (1942). Biology of the California sea-mussel (*Mytilus californianus*). *The Journal of Experimental Zoology*, 90(1), 1-30.
- CRC Bretagne Sud. (2010). Mytiliculture. Repéré le 04-07-2019 à <http://www.huitres-de-bretagne.com/mytiliculture>
- Dalziel, A. C. et Stewart, D. T. (2002). Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Genome*, 45(2), 348-355. doi: 10.1139/g01-159
- Devauchelle, N. (2000). Facteurs naturels de l'environnement et reproduction de poissons téléostéens et de mollusques bivalves en aquaculture, en zone tempérées. Le milieu aquatique : interactions des facteurs environnementaux et impacts sur les organismes vivants, Brest, septembre 1999. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00043/15470/>
- Doherty, S. D., Brophy, D. et Gosling, E. (2009). Synchronous reproduction may facilitate introgression in a hybrid mussel (*Mytilus*) population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 378(1-2), 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.04.022>
- F.A.O. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis, Release: 3.04.5, Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Global aquaculture production: Quantity 1950–2016; Value 1950–2016; Global capture production: 1950–2016; 2018-03-16.

- Fisher, C. et Skibinski, D. O. F. (1990). Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proceedings of the Royal Society*, 242(1305). doi: <http://doi.org/10.1098/rspb.1990.0118>
- Fisheries and Oceans Canada (2003). Profil de la moule bleue (*Mytilus edulis*). Direction des politiques et des services économiques, Région du Golfe. Ministère des Pêches et des Océans. Moncton, Nouveau-Brunswick. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/270029-f.pdf>
- Gamble, T. et Zarkower, D. (2012). Sex determination, *Current Biology*, 22(8). doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.054>.
- Garrido-Ramos, M. A., Stewart, D. T., Sutherland, B. W. et Zouros, E. (1998). The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome*, 41(6), 818-824. doi: 10.1139/gen-41-6-818
- Ghiselli, F., Milani, L. et Passamonti, M. (2011). Strict Sex-Specific mtDNA Segregation in the Germ line of the DUI Species *Venerupis philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Molecular Biology and Evolution*, 28(2), 949-961. doi: 10.1093/molbev/msq271
- Gunter, G. (1957). *Temperature*. Treatise on Marine Ecology and Paleocology, Vol.1 : Ecology The Geological Society of America Memoir 67. New York. p.159-184
- Gusman, A., Lecomte, S., Stewart, D. T., Passamonti, M. et Breton, S. (2016). Pursuing the quest for better understanding the taxonomic distribution of the system of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *PeerJ*, 4, e2760.
- Haag, E. S. et Doty, A. V. (2005). Sex Determination across Evolution: Connecting the Dots. *PLoS Biology*, 3(1). doi: e21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030021>
- Head, M. L, Jennions, M. D. et Zajitschek, S. R. K. (2016). Sexual selection : incorporating non-genetic inheritance. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 12, 129-137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.10.005>
- Hsu, Y. Y. et Chou, J. Y. (2017). Environmental Factors Can Influence Mitochondrial Inheritance in the Saccharomyces Yeast Hybrids. *PLoS ONE*, 12(1), e0169953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169953>
- Jansen, J. M., Pronker, A. E., Kube, S., Sokolowski, A., Sola, J. C., Marquiegui, M. A., . . . Hummel, H. (2007). Geographic and seasonal patterns and limits on the adaptive response to temperature of European *Mytilus spp.* and *Macomma balthica* population. *Oecologia*, 154, 23-34.
- Jones, S. J., Mieszkowska, N. et Wetthey, D. S. (2009). Linking Thermal Tolerances and Biogeography: *Mytilus edulis* (L.) at its Southern Limit on the East Coast of the United States. *The Biological Bulletin*, 217(1), 73-85. doi: <https://doi.org/10.1086/BBLv217n1p73>
- Kenchington, E., MacDonald, B., Cao, L., Tsagkarakis, D. et Zouros, E. (2002). Genetics of Mother-Dependent Sex Ratio in Blue Mussels (*Mytilus spp.*) and Implications for Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA. *Genetics*, 161, 1579-1588.
- Kenchington, E. L., Hamilton, L., Cogswell, A. et Zouros, E. (2009). Paternal mtDNA and maleness are co-inherited but not causally linked in mytilid mussels. *PLoS ONE*, 4(9), e6976. doi: 10.1371/journal.pone.0006976
- Kong, H., Jiang, X., Clements, J. C., Wang, T., Huang, X., Shang, Y., . . . Wang, Y. (2019). Transgenerational effects of short-term exposure to acidification and hypoxia on early developmental traits of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 145, 73-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.02.011>

- Kyriakou, E., Zouros, E. et Rodakis, G. C. (2010). The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Research Notes*, 3, 222. doi: 10.1186/1756-0500-3-222
- Legendre, P. et Legendre, L. (2012). Chapter 11 – Canonical analysis, *Developments in Environmental Modelling*, 24, 625-710. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53868-0.50011-3>
- López-Landavery, E. A., Portillo-López, A., Gallardo-Escárate, C. et Del Río-Portilla, M. A. (2017). Sex-related genes expression in juveniles of red abalone, *Haliotis rufescens* (Swanson, 1822). *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(1), 58-69. doi: 10.1080/07924259.2017.1282383
- Miglioli, A. et Kapsenberg, L. (2017). Spawning Protocol - *Mytilus galloprovincialis*. Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, France . [http://lbdv.obs-
vlfr.fr/resources/recherche/teamdougall/protocoles/Spawning%2520Protocol%2520-
%2520Mytilus%2520galloprovincialis.pdf?download=true](http://lbdv.obs-vlfr.fr/resources/recherche/teamdougall/protocoles/Spawning%2520Protocol%2520-%2520Mytilus%2520galloprovincialis.pdf?download=true)
- Mills, S. et Côté, I. M. (2003). Sex-related differences in growth and morphology of blue mussels, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83, 1053-1057. doi: 10.1017/S0025315403008269h
- Ministère de l'agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec. (2019). Fiche technique 1 : La moule bleue *Mytilus edulis*. Repéré le 04-07-2019 à https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Divers/moule_bleue.pdf
- Nations Unies. La population. Repéré le 22-10-2018 à [http://www.un.org/fr/sections/issues-
depth/population/index.html](http://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html)
- Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., . . . Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024. doi: 10.1038/35016500
- Obata, M., Kamiah, C., Kawamura, K. et Komaru, A. (2006). Sperm mitochondrial DNA transmission to both male and female offspring in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Development, Growth & Differentiation*, 48, 253-261. doi: 10.1111/j.1440-169X.2006.00863.x.
- Obata, M., Sano, N., Kawamura, K. et Komaru, A. (2007). Inheritance of two M type mitochondrial DNA from sperm and unfertilized eggs to offspring in *Mytilus galloprovincialis*. *Development, Growth & Differentiation*, 49, 335-44.
- Passamonti, M. et Ghiselli, F. (2009). Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA and Cell Biology*, 28(2), 79-89. doi:10.1089/dna.2008.0807
- Pêches et Océans Canada. (2003). Profil de la moule bleue (*Mytilus edulis*). Repéré le 22-10-2018 à <http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/270029-f.pdf>
- Pêches et Océans Canada. (2003). Moules d'élevage. Repéré le 04-07-2019 à [https://www.dfo-
mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/mussels-moules-fra.htm](https://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/mussels-moules-fra.htm)
- Penney, R. W., Hart, M. J. et Templeman, N. D. (2008). Genotype-dependent Variability in Somatic Tissue and Shell Weights and Its Effect on Meat Yield in Mixed Species [*Mytilus edulis* L., *M. trossulus* (Gould), and Their Hybrids] Cultured Mussel Populations. *Journal of Shellfish Research*, 27(4), 827-834.
- Quesada, H., Skibinski, D. A. G. et Skibinski, D. O. F. (1996). Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Current Genetics*, 29, 423-426.

- R Core Team. (2016) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Rawson, P. D., Secor, C. L. et Hilbish, T. J. (1996). The effect of natural hybridization on the regulation of doubly uniparental mtDNA inheritance in blue mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics*, 144, 241-248.
- Riginos, C., Hickerson, M.J., Henzler, C.M. et Cunningham, C.W. (2004). Differential patterns of male and female mtDNA exchange across the Atlantic Ocean in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Evolution*, 58, 2438-2451. doi:10.1111/j.0014-3820.2004.tb00873.x
- Ritchie, H. et Marshall, D. J. (2013). Fertilisation is not a new beginning: sperm environment affects offspring developmental success. *Journal of Experimental Biology*, 216(16), 3104-3109. doi:10.1242/jeb.087221
- Robert, R., Sánchez, L. S., Pérez-Parallé, L., Ponis, E., Kamermans, P. et O'Mahoney, M. (2013). A glimpse on the mollusc industry in Europe. *Aquaculture Europe*, 38(1), 5-11.
- Saavedra, C., Reyero, M.-I. et Zouros, E. (1997). Male-Dependent Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA and Female-Dependent Sex-Ratio in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, 145, 1073- 1082.
- Salinas, S., Brown, S. C., Mangel, M. et Munch, S. B. (2013). Non-genetic inheritance and changing environments. *Non-genetic inheritance*, 1, 38-50. doi: 10.2478/ngi-2013-0005
- Santerre, C., Sourdain, P., Marc, N., Mingant, C., Robert, R. and Martinez, A. S. (2013). Oyster sex determination is influenced by temperature - first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 165(1), 61-69. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.02.007.
- Schwanz, L. E. (2016). Parental thermal environment alters offspring sex ratio and fitness in an oviparous lizard. *Journal of Experimental Biology*, 219, 2349-2357. doi: 10.1242/jeb.139972
- Schwanz, L. E., Georges, A., Holleley, C. E. et Sarre, S. D. (2020) Climate change, sex reversal and lability of sex-determining systems. *Journal of Evolutionary Biology*, 33, 270-281. doi: <https://doi.org/10.1111/jeb.13587>
- [Sea temperature. \(2020\). Water temperature in North Rustico. Repéré le 11-11-2020 à https://seatemperature.info/prince-edward-island-water-temperature.html](https://seatemperature.info/prince-edward-island-water-temperature.html)
- Sedik, W. F., Dempsey, K. E., Meng, X. et Craft, J. A. (2010). Temporal expression of sex-specific genes in the mantle of the common mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Biology*, 157(3), 639-646. doi: 10.1007/s00227-009-1349-0
- Seed, R. (1972). Morphological variation in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Cahiers de Biologie Marine*, 13, 357-384.
- Shumway, S. E. (2011). *Shellfish Aquaculture and the Environment*. Wiley-Blackwell.
- Smith, J. R., Fong, P. et Ambrose, R. F. (2006). Dramatic declines in mussel bed community diversity: response to climate change?. *Ecology*, 87(5), 1153-1161.
- Sorte, C. J., Etter, R. J., Spackman, R., Boyle, E. E. et Hannigan, R. E. (2013). Elemental fingerprinting of mussel shells to predict population sources and redistribution potential in the Gulf of Maine. *PLoS ONE*, 8(11), e80868. doi: 10.1371/journal.pone.0080868
- Spencer, L. H., Venkataraman, Y. R., Crim, R., Ryan, S., Horwith, M. J. et Roberts, S. B. (2020). Carryover effects of temperature and pCO₂ across multiple *Olympia oyster* populations. *Ecological Applications*, 30(3), e02060.
- Sprung, M. (1938). Reproduction and fecundity of the mussel *Mytilus edulis* at helgoland (North Sea). *Helgolander Meeresunters*, 36, 243–255. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01983629>

- Stewart, D. T., Saavedra, C. Stanwood, R. R., Ball, A. O. et Zouros, E. (1995). Male and female mitochondrial lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Molecular Biology Evolution*, 12, 735-747.
- Stewart, D. T., Sinclair-Waters, M., Rice, A., Bunker, R. A., Robicheau, B. M. et Breton, S. (2018). Distribution and frequency of mitochondrial DNA polymorphisms in blue mussel (*Mytilus edulis*) populations of southwestern Nova Scotia (Canada). *Canadian Journal of Zoology*, 96(6), 608-613. doi: 10.1139/cjz-2017-0212
- Sunila, I. (1981). Reproduction of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in a brackish water area, the Gulf of Finland. *Annales Zoologici Fennici*, 18(2), 121-128. doi: www.jstor.org/stable/23734069
- Sutherland, B. W., Stewart, D., Kenchington, E. et Zouros, E. (1998). The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondria DNA. *Genetics*, 148(1), 341-347.
- Teaniniuraitemoana, V., Lepretre, 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*, 325(1), 13-24. doi: 10.1002/jez.1992
- Theologidis, I., Saavedra, C. et Zouros, E. (2007). No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from pair matings of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, 176(2), 1367-1369. doi: 10.1534/genetics.106.069930.
- Toro, J. E., Thompson, R. J. et Innes, D. J. (2002). Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. *Marine Biology*, 141, 897-909. doi: <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0897-3>
- United Nations. (2019). 2019 Revision of World Population Prospects. United Nations. <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/keyfindingswpp2015.pdf>.
- Villalba, A. (1995). Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, 130(2-3), 269-277. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00213-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00213-8)
- Wenne, R. et Skibinski, D. O. F. (1995). Mitochondrial DNA heteroplasmy in European populations of mussel *Mytilus trossulus*. *Marine Biotechnology*, 122, 619-625.
- Wong, N. L. et Arshad, A. (2013). Induced Spawning and Early Development of *Modiolus philippinarum* (Hanley, 1843) (Bivalvia: Mitilidae). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(1), 100-107. doi: 10.3923/ajava2013.100.107
- Yan, Z., Sun, S., Shahid, M. et Xu, J. (2007). Environment factors can influence mitochondrial inheritance in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics Biology*, 44(5), 315-322. doi: 10.1016/j.fgb.2006.10.002
- Young, R. T. (1945). Stimulation of spawning in the mussel (*Mytilus californianus*). *Ecology*, 26(1), 58-69.
- Yusa, Y., Breton, S. et Hoeh, W. R. (2013). Population genetics of sex determination in *Mytilus* mussels: reanalyses and a model. *Journal of Heredity*, 104(3), 380-385. doi: 10.1093/jhered/est014
- Zabrzeńska, S., Smolarz, K., Hallmann, A., Konieczna, L., Bączek, T. et Wołowicz, M. (2015). Sex-related differences in steroid concentrations in the blue mussel (*Mytilus edulis trossulus*) from the southern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*

A: Molecular & Integrative Physiology, 183, 14-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.029>.

Zouros, E., Ball, A. O., Saavedra, C. et Freeman, K.R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91(16), 7463-7467. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7463>

Zouros, E. (2013). Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, 40, 1-31. doi: 10.1007/s11692-012-9195-2

Zouros, E. (2020). Doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA: Might it be simpler than we thought?, *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(2), 624-631. doi: 10.1111/jzs.12364

Annexe A. Données supplémentaires

Tableau 3. Moyennes de température en degrés Celsius pour chaque mois de l'année 2016, 2018 et 2019 dans la région de North Rustico à l'île du Prince Édouard.

	2016	2018	2019
<i>Janvier</i>	-0,1°C	-0,7°C	-1,3°C
<i>Février</i>	-1,5°C	-1,2°C	-1,5°C
<i>Mars</i>	-1,5°C	-1,2°C	-0,9°C
<i>Avril</i>	0,3°C	0,1°C	0,9°C
<i>Mai</i>	5,9°C	5,9°C	5,6°C
<i>Juin</i>	11,4°C	10,9°C	12,3°C
<i>Juillet</i>	17,9°C	18,3°C	18,1°C
<i>Août</i>	19,5°C	21,5°C	20,6°C
<i>Septembre</i>	17,5°C	18,4°C	16,5°C
<i>Octobre</i>	12,9°C	11,5°C	12,0°C
<i>Novembre</i>	8,8°C	5,9°C	7,1°C
<i>Décembre</i>	4,1°C	0,8°C	2,0°C

Données provenant de : <https://seatemperature.info/prince-edward-island-water-temperature.html>