

Caractérisation génétique de naissains et populations de pétoncles géants, *Placopecten magellanicus* (Gmelin), à Saint-Pierre et Miquelon dans le cadre d'études de réensemencement

Rapport de stage de master 2 Sciences Biologiques Marines

Par Benoît Guénoilé

Directeur de stage : Dr Jean-Marie Sévigny ;
Institut Maurice Lamontagne, Pêches et Océans Canada
Co-directrice : Dr Sylvie Lapègue ; IFREMER La Tremblade

Juin 2010

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-Marie Sévigny, sans qui je n'aurais pas eu l'opportunité de travailler sur ce projet. Merci pour, son intérêt, sa patience, son aide et le partage de ses connaissances.

Un grand merci également à ma co-directrice, le Dr Sylvie Lapègue, qui a fait le lien entre l'IFREMER et le MPO et qui a permis que j'obtienne du financement et que je réalise la mission d'échantillonnage à Saint-Pierre et Miquelon. Merci pour sa confiance et son implication.

Merci aussi à Éric Parent qui m'a initié au travail de laboratoire et qui a supporté mes frasques de novice avec beaucoup de patience.

Merci à Sébastien Detchevery et Alain Orsiny de l'ARDA de Saint-Pierre et Miquelon pour l'accueil chaleureux pendant les trois semaines de mon séjour sur leur île magnifique.

Pour finir un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet et au bon déroulement de mon séjour au Québec. Merci pour les échanges que nous avons eus, le partage de votre expérience, votre intérêt et votre amitié.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	2
Liste des tableaux	3
Liste des figures.....	3
1 Introduction	4
1.1 Contexte général de l'étude	4
1.2 Biologie du <i>Placopecten magellanicus</i>	6
1.3 L'outil génétique.....	7
1.4 Problématique et plan	9
2 Matériel et méthode.....	10
2.1 Échantillonnage	10
2.2 Extraction d'ADN	11
2.3 Analyses génétiques.....	12
2.4 Analyses statistiques.....	14
2.4.1 Statistiques descriptives et équilibre de Hardy-Weinberg	14
2.4.2 Structure des populations	15
3 Résultats	16
3.1 Résultats des amplifications PCR	16
3.2 Statistiques descriptives et équilibre de Hardy-Weinberg	17
3.3 Structure des populations	22
3.3.1 Approche conventionnelle par analyse des indices <i>Fst</i>	22
3.3.2 Approche bayésienne	22
4 Discussion.....	24
4.1 Différenciation génétique des sites géographique et temporelle	24
4.2 Quel apport pour le projet pectinicole ?	26
4.3 Perspectives.....	27
5 Conclusion.....	30
Bibliographie.....	30
Annexes	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des échantillonnages de <i>Placopecten magellanicus</i>	10
Tableau 2. Caractéristiques des marqueurs microsatellites.	12
Tableau 3. Nombre de loci dont l'amplification a échoué, pour chaque site. La mention 3A signifie que trois pics pouvant être apparentés à trois allèles ont été identifiés pour le locus.	16
Tableau 4. Statistiques décrivant les caractéristiques génétiques chez le pétoncle géant (<i>Placopecten magellanicus</i>) par locus et par site : effectif (N), nombre d'allèles (N_a , le nombre total d'allèles est indiqué entre parenthèse), intervalle de taille des allèles en paires de bases (Taille), allèle le plus fréquent (A_c) et sa fréquence (fréq A_c), richesse allélique calculée pour un échantillon de 38 individus (R_s), hétérozygoties observée (H_o) et attendue (H_e), coefficient de consanguinité (F_{is}) et probabilité (P) associée au F_{is} . Les abréviations correspondent aux mêmes sites que ceux identifiés au tableau 1.	18
Tableau 5. Causes possibles du déficit en hétérozygotes identifiées par le logiciel MicroChecker par locus et par population. Les abréviations correspondent aux sites identifiés au tableau 1.	21
Tableau 6. Valeurs des F_{st} par paires de populations (en dessous de la diagonale) et leurs probabilités respectives (au dessus de la diagonale).	22

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie de <i>Placopecten magellanicus</i> (Stewart et Arnold 1994)	7
Figure 2. Carte des sites d'échantillonnage. Cette carte donne un aperçu de la distance entre l'archipel de Saint-Pierre et Miquelon où a lieu le projet d'aquaculture et les sites d'importation de naissain (Nouvelle-Écosse -Cap Breton, Baie de Chedabucto- et les îles de la Madeleine). On visualise aussi les zones de semis et les différents sites de captage à proximité de Miquelon.	11
Figure 3. Nombre total et moyen (tous sites confondus) d'allèles par locus et richesse allélique.	20
Figure 4. Hétérozygoties attendue (H_e) et observée (H_o) et F_{is} moyens par sites (tous loci confondus). En A, les 5 loci ont été analysés, mais en B le locus Pma200 a été exclu.	20
Figure 5. Valeurs moyennes du coefficient de consanguinité (F_{is}) par locus tous sites confondus.	21
Figure 6. Moyennes du $L_{np}(d)$ et écarts-types des 15 itérations pour des K fixés de 1 à 5.	22
Figure 7. Probabilités qu'un individu appartienne à un des groupes hypothétiques pour $K=2$ (a), 3 (c), 4 (b) ou 5 (d). Les chiffres en abscisse correspondent aux sites d'échantillonnages (soit de 1 à 5 NS, IDM, SEM, AN et Mi). Chaque individu correspond à un trait vertical.	23
Figure 8. Exemple de ce qu'on obtient avec le logiciel Structure quand plusieurs populations sont identifiées.	24
Figure 9. Patrons généraux de circulation océanique de la côte Nord-Est Canadienne. (Issue de Kenchington <i>et al.</i> 2006).	26

1 Introduction

1.1 Contexte général de l'étude

L'archipel de Saint-Pierre et Miquelon, servait traditionnellement de comptoir pour l'exploitation et la commercialisation de la morue des grands bancs de Terre-Neuve vers l'Europe. Son économie est donc majoritairement tournée vers la pêche et l'exploitation des ressources maritimes. Depuis une vingtaine d'années, cette activité a subi de nombreux revers. Tout d'abord, en 1992, l'effondrement des stocks de morue et l'arrêt presque total de la pêche avec l'établissement d'un premier moratoire sur la pêche à la morue, a considérablement diminué l'activité principale de l'archipel et donc fortement diminué son activité économique. D'autre part, étant une petite enclave française en territoire canadien, la cohabitation est obligatoire mais parfois difficile. Le jugement international de 1992 sur l'attribution des eaux territoriales françaises et canadiennes a eu pour conséquence de diminuer les zones de pêches françaises (Dao 2000).

Afin de relancer l'économie de l'archipel en réinstaurant une activité de pêche, l'ARDA (Association pour la Recherche et le Développement de l'Aquaculture à Saint-Pierre et Miquelon) a décidé de s'intéresser à l'exploitation du pétoncle géant : *Placopecten magellanicus*. Cette espèce est naturellement présente dans les eaux territoriales environnantes : zones de la « boîte à pétoncle » et du « tunnel » (Foucher 2006), mais son abondance ne permet pas une activité de pêche intensive et durable. L'intérêt pour cette espèce s'est donc tourné vers l'aquaculture (pectiniculture) et le réensemencement de fonds sélectionnés, à l'exemple de ce qui a été entrepris au début des années 1990 aux îles-de-la-Madeleine (Vigneau et Hébert 1996).

Ce stage s'inscrit donc dans un projet plus vaste, visant à évaluer la faisabilité et la rentabilité du captage de naissain de pétoncle géant à Saint-Pierre et Miquelon, puis de réensemencement de juvéniles sur les fonds, afin de maintenir une activité de pêche rentable et durable. Ce projet se fait en collaboration avec différents organismes privés et publics. Il est à l'initiative de l'ARDA et est soutenu par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER), qui collabore en fournissant périodiquement du matériel et de la main d'œuvre scientifiques pour des missions précises telles que des études de courantologie ou l'observation vidéo des bancs de pétoncles. L'entreprise EDC (Exploitation Des Coquilles) basée à Miquelon, fournit des bateaux, de la main d'œuvre et des locaux. Des scientifiques de

l'Institut Maurice-Lamontagne (IML, Pêches et Océan Canada) collaborent avec des scientifiques de l'IFREMER dans le cadre d'un programme d'entente internationale. Les travaux effectués à l'IML portent sur les génétiques des populations.

Le projet de pectiniculture a débuté en 1996 à Miquelon, à l'origine entièrement financé par l'ARDA. Mais au début, sans connaissances réelles de l'aquaculture ni de l'espèce d'intérêt, les progrès ont été longs à venir. Actuellement, grâce aux différentes campagnes menées sur l'étude du milieu et sur la biologie du pétoncle, ainsi que grâce à l'expérience acquise au fil des ans, la pectiniculture à Miquelon semble pouvoir, dans les prochaines années, passer du stade expérimental au stade d'activité économique à part entière. Il y a deux types d'activités : l'élevage en paniers, et depuis 2005 une étude d'ensemencement sur le fond. Dans les deux cas, le naissain est mis un an en pré élevage dans des paniers de type *pearl net* japonais, puis transféré 2 à 3 ans en grossissement dans des paniers lanternes pour l'aquaculture ou ensemencé directement sur le fond.

Un des problèmes sérieux auquel doit faire face l'industrie pectinicole, aussi bien pour l'aquaculture en panier que pour l'ensemencement sur le fond, est l'approvisionnement en naissain de qualité (Coulombe 1996; Cyr 2006). En effet, c'est le matériel de base de l'activité pectinicole. Il y a deux manières de s'approvisionner en naissain. La première est le captage en milieu naturel, c'est de cette façon que s'approvisionnent la plupart des fermes aquacoles. La deuxième manière de procéder est de faire pondre des adultes en milieu contrôlé : c'est le principe de l'écloserie. Cela se fait déjà pour certains bivalves (exemple écloserie du Tinduff en rade de Brest pour *Pecten maximus*), mais pour *Placopecten magellanicus* c'est encore au stade expérimental (PECNORD écloserie de Blanc-Sablon; Bricelj *et al.* 2005). Actuellement, à Saint-Pierre et Miquelon, le naissain est importé des fermes pectinicoles des îles de la Madeleine et de Nouvelle Écosse, où il est capté directement dans le milieu. Un des enjeux majeurs du projet de l'ARDA est donc d'évaluer le potentiel local de captage de naissain. En effet, assurer un captage local permettrait de réduire les coûts dus à l'achat de naissain « étranger », ainsi que de réduire le risque d'un mauvais approvisionnement les années où les fournisseurs ne peuvent assurer la production, comme c'était le cas en 2009 avec la perte de la presque totalité du captage aux îles-de-la-Madeleine.

À Miquelon, une étude de captage de larves a commencé en 2008, elle permettra d'évaluer si le rendement du captage local est suffisant pour assurer l'approvisionnement en

naissain. Connaître la provenance du naissain pourrait permettre d'optimiser le captage (identifier les meilleurs sites pour la pose des collecteurs). C'est dans ce contexte que se situe le projet d'analyses génétiques. Pour cela on fait l'hypothèse qu'il y a deux « types » de pétoncles : des pétoncles dits locaux, qui sont des animaux vivants naturellement dans les eaux environnantes de Saint-Pierre et Miquelon et des pétoncles dits étrangers qui ont été importés des îles-de-la-Madeleine et de Nouvelle-Écosse. On peut donc émettre l'hypothèse qu'il existe trois populations distinctes sur le site de l'étude : celle des îles-de-la-Madeleine, de Nouvelle Écosse et une population locale.

1.2 Biologie du *Placopecten magellanicus*

Placopecten magellanicus, appelé pétoncle géant ou peigne du Canada est un bivalve filtreur, dioïque de la famille des *Pectinidae*. On le trouve exclusivement sur la côte américaine Nord Atlantique (du nord du golfe du Saint-Laurent au sud de la Caroline du nord), à des profondeurs de 25 à 200 m (Hart 2006). C'est une espèce d'une grande importance économique (Packer *et al.* 1999).

Les adultes forment des gisements, sur des fonds de sables, graviers ou cailloux. Ces gisements ont des caractéristiques et des dynamiques significativement différentes les uns des autres (Kenchington *et al.* 2006). La taille maximum atteinte est de 23 cm, mais les individus dépassent rarement 17 cm. Ils peuvent vivre plus de 20 ans. La taille commerciale (9 cm) est atteinte au bout de 4 à 5 ans en conditions naturelles (Hart 2006). Le pétoncle géant se nourrit principalement de phytoplancton, mais aussi de micro zooplancton et de matière en suspension (Hart et Chute 2004). Ces prédateurs principaux sont l'étoile de mer (*Asteria vulgaris*) et le crabe commun (*Cancer irroratus*) (ARDA 2009)

La maturité sexuelle est atteinte à l'âge de deux ans mais les individus âgés de moins de 4 ans contribuent peu à la production totale d'œufs (Hart 2006). Couramment, la ponte a lieu à la fin de l'été-début de l'automne, mais il arrive parfois qu'on observe une ponte printanière précoce (selon la latitude). La ponte est déclenchée par un choc thermique : diminution de la température de l'eau suite aux maxima de température estivaux (Naidu 1970).

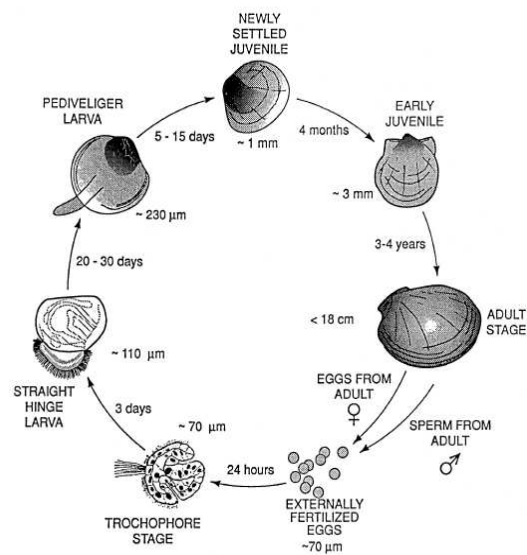


Figure 1 : Cycle de vie de *Placopecten magellanicus* (Stewart et Arnold 1994)

Le cycle de vie de cette espèce (Figure 1) est constitué de deux phases : une phase larvaire pélagique et une phase benthique. La phase larvaire dure de 4 à 7 semaines (Hart 2006) pendant lesquelles les larves sont véhiculées par les courants mais peuvent également se mouvoir de façon volontaire, grâce à des cils, effectuant ainsi des migrations verticales journalières (Manuel *et al.* 1996). En fin de stade pédivelligère, les larves se fixent sur un support grâce à leur pied et en sécrétant un byssus (Culliney 1974). On les appelle alors naissain. C'est le début de la phase benthique. Au bout d'environ un an et demi (pour une taille de 3 à 4 cm), la jeune coquille se détache. Elle peut alors se déplacer sur le fond par propulsion et grâce au courant, pour échapper à un prédateur ou à une perturbation (Packer *et al.* 1999, Barbeau *et al.* 1994).

L'importance de l'autorecrutement au niveau d'un gisement dépend de la rétention des larves sur le site, souvent liée à des courants giratoires (Packer *et al.* 1999).

1.3 L'outil génétique

Dans l'étude des organismes marins, la nécessité de différencier des populations est de plus en plus présente, notamment pour la gestion de l'exploitation et la conservation des espèces exploitées. Cependant, le milieu marin pose certains problèmes techniques. En effet, les observations directes des organismes sont plus difficiles que pour les organismes terrestres et les outils traditionnels (étude de capture marquage recapture, suivi de la dispersion larvaire et des migrations ...) sont très difficiles à mettre en place et très coûteux. C'est pourquoi, depuis quelques années, les outils moléculaires sont beaucoup utilisés. Ce sont des outils très puissants pour l'étude des structures de population (Selkoe *et al.* 2008) et ils ont permis dans de nombreux cas l'identification d'une structuration génétique de populations en contournant le problème majeur de la notion de « grande population marine homogène qui limite les adaptations locales et la spéciation » (Hauser et Carvahlo. 2008). La caractérisation génétique des populations est un de ces outils.

Toutefois, en ce qui concerne les espèces marines, on observe la plupart du temps une faible structuration des populations, maintenue par un flux de gène élevé (Waples 1998). Cela est dû en particulier à la grande capacité de ces organismes à se disperser, aussi bien grâce aux courants pendant le stade larvaire relativement long, que par des migrations actives au stade adulte. Mais dans les faits, cette dispersion larvaire à grande échelle ne se réalise pas entièrement (Cowen *et al.* 2007). Il y a de plus en plus d'évidences de structuration de populations à faible échelle géographique (Arnaud-Haond *et al.* 2008) et de variations temporelles de la structure génétique d'une même population (Hauser et Carvahlo. 2008). A certains endroits, des courants locaux (gires océaniques), certaines propriétés de la masse d'eau (stratification) et certaines caractéristiques topographiques et géographiques du milieu, créent des barrières à la dispersion, ce qui permet une certaine structuration des populations (Waples 1998). Chez *Placopecten magellanicus* en particulier, du fait de la longue durée de la phase larvaire (4 à 7 semaines) qui augmente considérablement les flux de gènes, le transport larvaire joue un rôle majeur dans l'élaboration des structures de populations (Kenchington *et al.* 2006).

Plusieurs outils de différenciation des populations de *P. magellanicus* ont déjà été employés mais la plupart du temps avec un succès mitigé. Kenchington et Full (1994) utilisent des analyses morphométriques (analyses de Fourier), mais les résultats obtenus sont trop dépendants de l'âge des individus et des conditions environnementales pour identifier une structure de populations fiable. Beaumont (1991) emploi des marqueurs allozymes, mais bien souvent la variabilité génétique détectée est trop faible pour permettre d'identifier des différences entre les populations (Hauser et Seeb 2008). L'utilisation de marqueurs RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) n'est pas non plus adéquate. Dans leur étude, Patwary *et al.* (1994) ne parviennent pas à différencier les populations de *Placopecten magellanicus* étudiées car le polymorphisme des marqueurs est stable entre les populations. Cette méthode peut être utilisée comme un outil additionnel pour comprendre la structure génétique de populations mais elle n'est pas assez précise pour être utilisée seule. De plus les RAPD sont un outil de plus en plus contesté à cause d'un problème de répétabilité des résultats, les profils RAPD obtenus pouvant être très différents en fonction des conditions d'amplification PCR (qualité de l'ADN, type de thermocycleur...) (Smith 2005). L'ADN mitochondrial (ADNmt) est également un outil moléculaire fréquemment utilisé pour décrire la structure génétique des populations. Mais malgré un polymorphisme de taille très important au niveau de l'ADN

mitochondrial de *Placopecten magellanicus*, Cook et Zouros (1994) jugent que l'outil n'est pas adéquat pour des études de discriminations de populations. Cela est dû au fait que le fort taux de mutations de l'ADN mitochondrial entraîne une homogénéisation des populations conspécifiques. Cependant, l'outil est intéressant pour les études de phylogénie. Ces outils génétiques n'étant pas adéquats pour notre étude, nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation des marqueurs microsatellites qui sont des marqueurs moléculaires très puissants.

Les microsatellites sont de courtes régions du génome constituées de répétitions d'une même séquence nucléotidique. Cette séquence appelée « motif » est composée d'une à cinq paires de bases. La variabilité génétique résulte de la variation du nombre de ces répétitions (Beaumont 2006). Ce sont des marqueurs nucléaires neutres très abondants dans le génome avec des fréquences de 10000 à 1000000 copies (Wright et Bentzen 1994). Ils possèdent plusieurs caractéristiques qui en font de bons outils pour étudier la structure de populations. Tout d'abord, le taux élevé de mutations aux loci microsatellite leur confère un polymorphisme de longueur élevé. Ensuite, les microsatellites sont codominants et d'héritabilité mendélienne, ils apportent donc une information supplémentaire sur la structure des populations (Wright et Bentzen 1994). Également, les microsatellites peuvent être analysés par PCR, ce qui ne nécessite qu'une petite quantité d'ADN (une dizaine de nanogrammes par microlitre) et permet donc d'analyser des individus de très petite taille (stades larvaires et juvéniles), ce qui est un atout important pour notre étude. Cependant, un inconvénient de l'utilisation des microsatellites est le coût élevé et la durée importante (2 à 3 mois) nécessaires à leur développement en comparaison d'autres marqueurs. Mais cet inconvénient est largement rattrapé par un gain d'efficacité dans les étapes suivantes, les analyses microsatellites sont plus rapides et on peut donc analyser un plus grand nombre d'échantillons.

1.4 Problématique et plan

Le but de l'étude génétique que j'ai réalisée est d'essayer d'identifier la provenance du naissain capté localement. Dans un premier temps, j'essayerai, en utilisant des loci microsatellites de caractériser génétiquement les individus issus des trois sites géographiques, à savoir les îles-de-la-Madeleine, la Nouvelle-Écosse et les individus locaux. Si ces sites montrent une signature génétique différente, on pourra dans un second temps, par génotypage du naissain, identifier sa provenance et quantifier la participation des stocks élevés et des

stocks sauvages au recrutement local. Pour cela, je testerai l'hypothèse nulle selon laquelle il n'y a aucune différenciation génétique pour entre les sites échantillonnés.

Dans un premier temps, je présenterai les techniques utilisées, suivi d'une présentation des résultats obtenus, pour finir par une discussion sur l'ensemble du projet.

2 Matériel et méthode

2.1 Échantillonnage

Il y a eu cinq échantillonnages au total (Tableau 1). Quatre des échantillons (NS, IDM, SEM et Mi) sont collectés par l'ARDA et le cinquième (AN) est collecté par un chalutier du MPO (Pêches et Océans Canada). J'ai personnellement participé à l'échantillonnage Mi à Miquelon.

Tableau 1. Caractéristiques des échantillonnages de *Placopecten magellanicus*.

nom	abréviations	date de prélèvement	site	origine	effectif	stade
Nouvelle-Écosse	NS	10-2009	semis Miquelon	Nouvelle-Écosse	86	adultes
Iles de la Madeleine	IDM	10-2009	semis Miquelon	Îles de la Madeleine	81	adultes
Terre-Neuve Saint-Pierre et Miquelon	AN	2009	Miquelon	Miquelon	138	adultes
Miquelon	SEM	2009	Miquelon	Miquelon	92	naissain
Miquelon	MI	03-2010	Miquelon	Miquelon	150	naissain

Les individus adultes sont échantillonnés par dragage. Pour chacun, un morceau de muscle adducteur est prélevé pour l'extraction de l'ADN, puis conservé dans l'éthanol 95%. Le naissain, collecté sur deux années consécutives, est prélevé directement dans les collecteurs placés en mer. Aucune mesure (taille de la coquille, sexe, âge) n'a été réalisée sur les individus. Les échantillons (congelés et dans l'éthanol) ont été expédiés à l'IML où les analyses génétiques ont été effectuées. Les sites d'échantillonnage apparaissent sur la figure 2. Le prélèvement de naissain s'inscrit dans le cadre d'une étude de captage réalisée à Miquelon à l'aide de stations pilotes, le but étant d'identifier aux deux échelles spatiale et temporelle les meilleures sites et périodes de captage. Pour cela deux protocoles expérimentaux ont été réalisés : l'un consistant, à une station, de placer des collecteurs tous les 15 jours de début juillet à fin août pour identifier la période la plus propice au captage des larves. L'autre protocole a pour but de localiser les sites de meilleur rendement du captage en

plaçant des collecteurs à la même date (mi septembre) mais à des sites différents le long de la côte est de Miquelon.

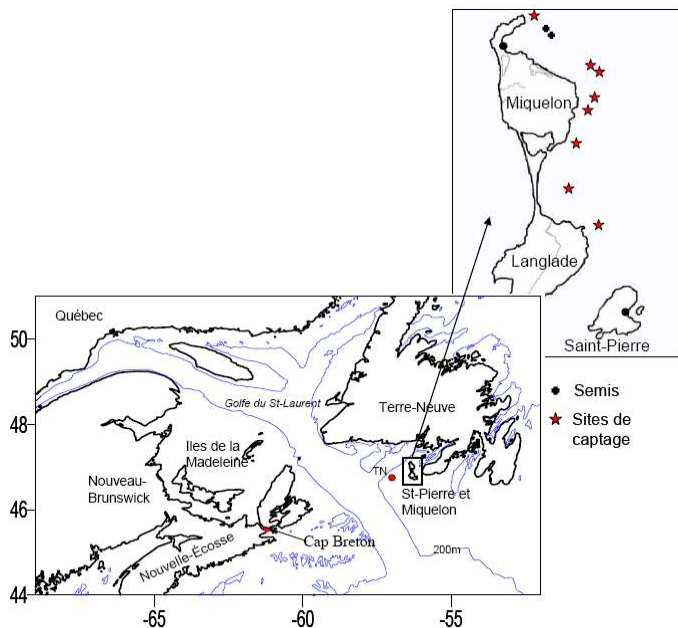


Figure 2. Carte des sites d'échantillonnage. Cette carte donne un aperçu de la distance entre l'archipel de Saint-Pierre et Miquelon où a lieu le projet d'aquaculture et les sites d'importation de naissain (Nouvelle-Écosse -Cap Breton, Baie de Chedabucto- et les îles de la Madeleine). On visualise aussi les zones de semis et les différents sites de captage à proximité de Miquelon.

Tous ces collecteurs sont relevés au début du mois de mars de l'année suivante puis congelés avant analyse du contenu. L'analyse consiste d'une part à identifier et compter les deux types de pétoncles présents dans cette zone. Soit l'espèce d'intérêt : *Placopecten magellanicus* et une autre espèce, le pétoncle d'Islande *Chlamys islandica*. Le comptage permet d'identifier l'efficacité du captage à ces stations. On relève également les autres espèces présentes sur les collecteurs ainsi que la quantité de *fooling* (algues et hydrozoaires). En effet, à certaines périodes, une quantité importante de moule (*Mytilus sp.*) et de hiatella (*Hiatella arctica*) se fixent également sur les sacs de captage créant une compétition pour l'espace et la nourriture et réduisant l'efficacité du captage. Les sacs sont nettoyés de leur contenu qui est récupéré et filtré sur une maille de 80 micromètres. Ce contenu est ensuite divisé pour faciliter le comptage. Une certaine fraction du sac est donc analysée sous loupe binoculaire. Ainsi, on compte le nombre de naissain de *C. islandica* et de *P. magellanicus* que l'on multiplie ensuite par le facteur de dilution pour obtenir l'intégralité du contenu du collecteur. Les individus identifiés ont une taille de 0,5 à 6,0 mm. C'est à ce stade que certains individus sont conservés pour les analyses génétiques.

2.2 Extraction d'ADN

L'ADN de chaque individu a été extrait à partir d'environ 15 mg de tissu musculaire (muscle adducteur) pour les individus assez gros et à partir de l'individu entier pour le naissain de petite taille. Le protocole d'extraction utilisé est celui proposé par la société

OMEGA bio-tek (protocole d'extraction pour tissu animal), il est employé avec un E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit. En premier lieu, l'échantillon de muscle est inséré dans un micro tube de 1,5 ml contenant 200 µl de tampon TL et 25 µl de protéase. Le tout incubé toute la nuit à une température de 52 °C (la protéase digère les cellules laissant libre l'ADN). Après la digestion, l'ADN est purifié sur une colonne de type HIBIND®DNA Mini Columns. La concentration d'ADN dans chaque échantillon est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre ND-1000 NanoDrop® (et du logiciel ND-1000 3.3) à une longueur d'onde de 260 nm. Les concentrations d'ADN obtenues varient de 22,7 ng/µl à 419,9 ng/µl selon les échantillons. Pour une meilleure réussite de l'amplification PCR, toutes les concentrations d'ADN sont ramenées à 50 ng/µl, par dilution dans de l'eau distillée. Les solutions d'ADN sont conservées à une température de 4°C.

2.3 Analyses génétiques

Afin de différencier les populations de pétoncle géant, des loci microsatellites développés par Gjetvaj *et al.* (1997) sont utilisés. Ces mêmes sept loci ont également été utilisés par Kenchington *et al.* (2006) et Roy (2005). Dans notre étude, seulement cinq sont utilisés : Pma212, Pma200, Pma275, Pma130 et Pma132. Les deux autres microsatellites développés par Gjetvaj *et al.* (Pma135 et Pma180) sont laissés de côté car ils ne sont pas entièrement satisfaisants. En effet, le locus Pma135 est lié avec le Pma130 (Gjetvaj *et al.* 1997) et un trop grand nombre d'allèles de grande taille ne sont pas amplifiés (*large allele drop out*) (Kenchington *et al.* 2006). D'autre part, le déficit en hétérozygotes au locus Pma180 est très important et ne permet pas son utilisation (Gjetvaj *et al.* 1997). Le tableau 2 présente les caractéristiques des cinq marqueurs microsatellites utilisés au cours de cette étude.

Tableau 2. Caractéristiques des marqueurs microsatellites.

Locus	Séquence des amorces (5'-3')	Motifs répétés	Marqueur fluorescent
<i>Pma130</i>	CCCGGATTGTATTTGAACTGCT CCATCCTGAATCCTCTTACGA	GA	VIC (fluorescence verte)
<i>Pma132</i>	GACGGTTTTGTTTACATCTCGG CCTATATTCATCATCATCCATTTAATCCA	GTT(-)GGT	NED (fluorescence jaune)
<i>Pma200</i>	TATACGCACTCAATCACCC GTTGCGTGATTCCNCCTG	GA	6FAM (fluorescence bleue)
<i>Pma212</i>	TAAACTGCTTTGTTGGGATG GAATTTGACCTAGAGACCAG	GA	6FAM (fluorescence bleue)
<i>Pma275</i>	GAGAAAGTTAGTGTGTGAATG AGAAATGCTTCTCGTCACC	GA	NED (fluorescence jaune)

Les loci microsatellites sont amplifiés par réaction PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Les réactifs utilisés sont : 1,5 mM de tampon avec MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (dinucléotides triphosphates), 0,035 unités par µl de Taq Polymérase (*Taq Expand High Fidelity*), 1 µl d'ADN pour chaque échantillon, des amorces sens (5'-3') et anti-sens (3'-5') pour chaque locus (0,9 µM pour les loci Pma130, 200 et 212 et 0.75 µM pour les loci Pma132 et 275), et le tout complété pour un volume final de 10 µl avec de l'eau nano pure. Les amplifications sont réalisées avec un thermocycleur (Mastercycler Eppgradient S). Les températures et la durée des différentes étapes du cycle PCR diffèrent en fonction de la séquence et de la longueur des amorces, mais comme elles sont identiques pour les loci Pma130, 212 et 275 et afin de limiter le nombre de manipulations, ces trois loci ont été amplifiés en même temps. Les conditions PCR sont les suivantes : pour les loci Pma130, 212 et 275 une phase de dénaturation initiale de 60 secondes à 94°C puis 25 cycles de 20 secondes à 94°C, 80 secondes à 50°C et 20 secondes à 72°C. Pour le locus Pma132 une phase de dénaturation initiale de 30 secondes à 94°C puis 25 cycles de 20 secondes à 94°C, 20 secondes à 50°C et 20 secondes à 72°C. Et pour le locus Pma200 une phase de dénaturation initiale de 60 secondes à 94°C puis 25 cycles de 20 secondes à 94°C, 80 secondes à 50°C et 20 secondes à 72°C.

Pour chaque série d'amplifications PCR et d'analyses sur le séquenceur, en plus des échantillons d'ADN à analyser, on rajoute un contrôle positif (contenant de l'ADN d'un échantillon pour lequel on a déjà les données) et un contrôle négatif (pour lequel l'ADN est remplacé par de l'eau). Ces contrôles servent à identifier une éventuelle pollution par un ADN non désiré, une erreur de manipulation ou une dérive du séquenceur.

Après amplification, 1 µl de chaque produit d'amplification PCR est mélangé avec 12 µl de formamide (qui empêche la réhybridation des brins complémentaires pendant le séquençage) et 0,1 µl de marqueur de poids moléculaire, le LIZ1200 (qui servira de référence pour mesurer la taille des fragments obtenus par PCR). Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse capillaire dans un séquenceur 3130 genetic analyzer (applied Biosystems Hitachi). Le logiciel d'acquisition des données est Run 3130 Data Collection V3.0. Les données brutes sont ensuite exportées dans le logiciel GeneMapper V4.0 qui permettra, à partir des électrophorégrammes, d'identifier pour chaque échantillon et pour chaque locus un ou deux allèles selon que l'individu est homozygote ou hétérozygote. La lecture des électrophorégrammes et l'identification des allèles sont effectuées par deux personnes pour

éviter au maximum les erreurs de lecture. Ensuite, grâce au logiciel Tandem (Matschiner et Salzburger 2009), des groupes d'allèles sont déterminés. En fait les fragments de tailles (en paires de bases) semblables sont regroupés sous un même nom d'allèle. On obtient donc le génotype de chaque individu. Un fichier donnant ces génotypes regroupés par sites d'échantillonnage constitue les données brutes qui serviront aux analyses statistiques permettant de savoir si oui ou non on peut différencier des populations.

2.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées uniquement avec les échantillons dont au moins quatre locus ont pu être amplifiés. En effet, parfois, pour certains individus l'amplification PCR d'un ou plusieurs locus échoue.

2.4.1 Statistiques descriptives et équilibre de Hardy-Weinberg

Dans un premier temps, un test a été effectué pour vérifier si les loci utilisés étaient liés (déséquilibre de liaison) à l'aide du logiciel FSTAT (Goudet, 2001). Ensuite, les statistiques décrivant les caractéristiques génétiques des échantillons ont été déterminées à l'aide des logiciels GENETIX 4.04 (Belkhir *et al.* 1996-2004), FSTAT (Goudet 2001) et ARLEQUIN (Excoffier et Lischer 2009). Les fréquences alléliques, le nombre d'allèles (N_a), la richesse allélique (R_s) (El Mousadik et Petit 1996), ainsi que les hétérozygoties observées (H_o) et attendues sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg (H_e) ont été calculés. La statistique F_{is} , une mesure de la déviation de H_o par rapport à H_e (coefficient de consanguinité), a été calculée selon la méthode de Weir et Cockerham (1984). L'hypothèse nulle $F_{is} = 0$ a été testée par permutation des données.

Ensuite, dans le cas où un déficit en hétérozygote est observé, le logiciel Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) a permis d'identifier les causes possibles de ce déficit. Il peut être lié à différents facteurs d'erreurs dus à la nature même des microsatellites. Les plus courants sont :

- le *stuttering* : il est souvent présent pour les motifs dinucléotides. Plusieurs fragments proches les uns des autres sont amplifiés lors de la PCR. Sur l'électrophorogramme on a donc plusieurs pics pouvant être identifiés comme des allèles potentiels. Dans ce cas, lors de l'étape d'identification des allèles on peut identifier le mauvais pic ou alors confondre un homozygote avec un hétérozygote. C'est particulièrement vrai dans le cas de deux allèles séparés uniquement par un ou deux nucléotides.

- les large allele drop-out : cela consiste à une amplification sélective des petits fragments, pendant la PCR, les fragments de grande taille sont amplifiés moins facilement que les petits. De ce fait certains fragments plus longs peuvent passer inaperçus. Sur l'électrophorégramme l'individu apparaît alors comme homozygote au lieu d'hétérozygote.

- Les allèles nuls : pendant la PCR, il peut arriver que l'amplification de certains allèles échoue. La plupart du temps cela est dû à une mutation dans la séquence de l'amorce (Reece *et al.* 2004). Une dégradation de l'ADN à cet endroit de la séquence peut aussi en être la cause. Une fois encore un individu hétérozygote peut être identifié comme homozygote.

Il est important d'identifier ces erreurs potentielles pour les prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

2.4.2 Structure des populations

La structure génétique des populations est investiguée à deux niveaux : un niveau spatial, par la comparaison des trois populations adultes (NS, IDM et AN) et un niveau temporel, en comparant les deux échantillons de naissains de Saint-Pierre et Miquelon (SEM et Mi) collectés en 2009 et 2010 respectivement et représentant donc deux cohortes différentes.

Deux approches sont utilisées pour investiguer la structure génétique et déterminer le niveau de différenciation entre les sites (Guillot *et al.* 2009 pour une revue). En premier lieu, la statistique F_{st} , un indice de la différenciation génétique, sera calculé et déterminé pour chaque paire de sites. L'hypothèse nulle $F_{st} = 0$ sera testée par permutation des données à l'aide du logiciel Arlequin (Excoffier et Lisher. 2009). Les probabilités des comparaisons multiples seront ajustées selon la méthode de Bonferroni (Rice 1989). La structure des populations sera également étudiée à l'aide d'analyses bayésiennes avec le logiciel Structure 2.3 (Pritchard *et al.* 2000). Cette approche diffère significativement des méthodes analytiques habituellement utilisées (ex F_{st} par paires) puisque les individus sont assignés à des populations à partir des génotypes individuels exclusivement sans tenir compte de la provenance des individus. Le nombre de populations présentes dans la région étudiée est déterminé de façon à réduire au minimum les déséquilibres de liaison et les déviations par rapport aux équilibres de Hardy-Weinberg. Les paramètres utilisés avec le logiciel Structure sont : le « *admixture model* » en ce qui concerne le choix du modèle de descendance (*the ancestry model*) et les « *fréquences alléliques corrélées* » pour ce qui est du modèle de fréquences alléliques. Le *burnin* est établi à 200000 et le MCMC (*Markov Chain Monte*

Carlo) à 100000. Quinze itérations sont effectuées pour chaque valeur population K de 1 à 5 (soit un total de 75 itérations). Le K maximum a été fixé à cinq qui est le nombre de sites échantillonnés.

3 Résultats

3.1 Résultats des amplifications PCR

Le nombre d'individus analysés à chaque site varie de 57 pour NS à 80 pour Mi. Ce nombre varie en fonction de la réussite des amplifications PCR. Plus il y a d'amplifications qui échouent, plus le nombre d'individus analysés est élevé, dans le but d'obtenir le plus de données complètes (c'est-à-dire le plus possible d'individus avec au moins quatre locus amplifiés). Le tableau 3 récapitule pour chaque site le nombre de loci dont l'amplification a échoué.

Tableau 3. Nombre de loci dont l'amplification a échoué, pour chaque site. La mention 3A signifie que trois pics pouvant être apparentés à trois allèles ont été identifiés pour le locus.

Locus		NS	IDM	SEM	AN	Mi	Total %
Pma130	3A	0	0	1	0	0	0,3
	non amplifié	0	0	28	3	11	12,4
Pma132	non amplifié	0	1	28	0	28	16,5
Pma200	3A	12	11	10	9	6	14,1
	non amplifié	2	5	30	6	35	22,9
Pma212	non amplifié	0	0	28	2	17	13,8
Pma275	non amplifié	0	0	28	2	12	12,4
total %	non amplifié	5,2	5,9	34,8	7,3	27,3	

Il y a trois problèmes au niveau de l'amplification PCR. Tout d'abord, c'est au niveau des sites SEM et Mi qu'il y a le plus d'échecs, avec respectivement 34,8 et 27,3% d'échec tous loci confondus. Tous les loci sont affectés à peu près également au site SEM (entre 30 et 28%) et de 11 à 35% pour Mi. Étant donné que tous les loci sont affectés, le problème doit se situer au niveau de la mauvaise conservation des échantillons résultant en une dégradation plus importante de l'ADN. Le matériel biologique utilisé pour ces deux échantillonnages est du naissain de petite taille qui est plus sensible à la dégradation. Lors de la récupération des dispositifs de captage en bateau, le naissain reste 5 à 6 heures à l'air libre avant d'être congelé. Après la décongélation nécessaire pour l'identification du naissain, celui-ci reste encore plusieurs heures à l'air libre avant d'être conservé dans l'éthanol. La deuxième difficulté se trouve au niveau du locus Pma200 qui présente le plus fort taux d'échec

d'amplification, soit 22,9% alors que pour les autres loci ce taux d'échec est en dessous de 17%. Une des causes de ce problème pourrait être la présence de mutations dans la séquence des amorces de ce locus. Le troisième problème n'est pas un échec d'amplification, mais la présence chez certains individus de trois allèles au locus Pma200 (un seul cas est observé pour le locus Pma130). Ce phénomène pourrait s'apparenter à la polysomie (voir la discussion).

3.2 Statistiques descriptives et équilibre de Hardy-Weinberg

Le déséquilibre de liaison est testé par paires de locus et par site pour identifier si certains locus sont liés sur un même chromosome. Si deux locus sont liés, alors ils réagissent de la même manière et donc donnent deux fois la même information, ce qui biaise les résultats. Seulement trois combinaisons sur une possibilité de 60 sont positives. En effet, des résultats positifs ont été obtenus pour les comparaisons Pma132 vs Pma200 pour le site NS ($P=0,032$), Pma130 vs Pma132 pour le site AN ($P=0,045$) et Pma212-Pma275 pour le site MI ($P=0,043$). Mais il faut noter qu'aucun test n'est significatif après application de la correction de Bonferroni ($\alpha=0,0008$). On en conclut que les cinq locus ne sont pas liés entre eux et peuvent tous être utilisés sans la suite des analyses.

Les statistiques qui décrivent les caractéristiques génétiques des échantillons sont présentées au tableau 5. Le nombre d'individus analysés varie selon les sites, de 57 pour NS à 80 pour Mi ; mais aussi selon les loci (en fonction du nombre d'amplification réussis), de 38 pour Pma200 (au site MI) à 59 pour Pma212 et 275 (au site SEM).

Tableau 4. Statistiques décrivant les caractéristiques génétiques chez le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) par locus et par site : effectif (N), nombre d'allèles (N_a , le nombre total d'allèles est indiqué entre parenthèse), intervalle de taille des allèles en paires de bases (Taille), allèle le plus fréquent (Ac) et sa fréquence (fréq Ac), richesse allélique calculée pour un échantillon de 38 individus (R_s), hétérozygoties observée (Ho) et attendue (He), coefficient de consanguinité (Fis) et probabilité (P) associée au Fis . Les abréviations correspondent aux mêmes sites que ceux identifiés au tableau 1.

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma130					
N	54	57	57	57	51
N_a (34)	20	25	24	21	22
Taille	130-188	116-184	128-180	118-168	114-170
Ac	132	150 & 142	142	142	142
Fréq Ac	0,130	0,105	0,140	0,114	0,157
R_s	18,1	22,3	21,7	19,1	20,3
Ho	0,944	0,930	0,930	0,930	0,843
He	0,933	0,946	0,938	0,938	0,929
Fis W&C	-0,013	0,017	0,008	0,009	0,093
P	0,690	0,412	0,460	0,460	0,034
Pma132					
N	54	57	59	58	51
N_a (18)	13	9	10	14	12
Taille	179-227	179-224	188-230	170-227	179-224
Ac	191	191	191	191	191
Fréq Ac	0,574	0,561	0,661	0,672	0,618
R_s	11,5	8,6	8,6	12,3	10,9
Ho	0,593	0,702	0,559	0,603	0,451
He	0,645	0,656	0,544	0,542	0,603
Fis W&C	0,082	-0,07	-0,028	-0,115	0,254
P	0,168	0,918	0,742	0,988	0,002
Pma200					
N	40	42	47	43	38
N_a (28)	18	21	23	19	21
Taille	128-178	128-176	126-192	122-176	126-170
Ac	132-144	132	146	132	132
Fréq Ac	0,125	0,19	0,138	0,128	0,211
R_s	17,8	20,4	22,2	18,6	21,0
Ho	0,575	0,333	0,553	0,512	0,395
He	0,931	0,930	0,945	0,938	0,924
Fis W&C	0,385	0,644	0,417	0,458	0,576
P	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

Tableau 4 (suite)

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma212					
<i>N</i>	54	57	59	49	51
<i>Na</i> (41)	27	28	28	26	30
Taille	83-139	79-145	85-163	85-217	87-171
<i>Ac</i>	113	103	101	107-113	121
Ffréq <i>Ac</i>	0,111	0,105	0,119	0,112	0,078
<i>Rs</i>	25,4	25,9	25,4	23,8	27,7
<i>Ho</i>	0,944	0,895	0,898	0,898	0,804
<i>He</i>	0,959	0,958	0,953	0,946	0,964
<i>Fis</i> W&C	0,015	0,067	0,058	0,051	0,168
<i>P</i>	0,376	0,028	0,048	0,140	0,002
Pma275					
<i>N</i>	54	57	59	58	51
<i>Na</i> (26)	21	21	17	18	18
Taille	79-131	77-119	81-121	75-117	81-117
<i>Ac</i>	95	91-97	103	93	95
Fréq <i>Ac</i>	0,102	0,123	0,144	0,138	0,157
<i>Rs</i>	19,5	19,5	15,5	16,8	16,6
<i>Ho</i>	0,889	0,860	0,949	0,931	0,922
<i>He</i>	0,939	0,937	0,917	0,930	0,921
<i>Fis</i> W&C	0,054	0,083	-0,036	-0,002	-0,001
<i>P</i>	0,116	0,020	0,904	0,604	0,566
Tous les loci					
<i>Na</i>	19,8	20,8	20,6	19,8	21,6
<i>Ho</i>	0,789	0,744	0,78	0,778	0,687
<i>He</i>	0,881	0,885	0,862	0,859	0,869
<i>Fis</i>	0,106	0,161	0,095	0,099	0,216
<i>P</i>	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

Le polymorphisme des microsatellites est élevé. En effet, le nombre total d'allèles varie de 18 à 41 allèles pour les loci Pma132 et pma212 respectivement (Tableau 4 et Figure 3). Pour chaque locus on trouve des allèles privés qui n'apparaissent qu'à un seul site, mais leur fréquence, inférieure à 0,021, est très faible (Tableau 1 en annexe). La fréquence de l'allèle le plus fréquent varie de 0.078 (Pma212 au site Mi) à 0.672 (Pma132 au site AN). On remarque que pour le locus Pma132 l'allèle 191 apparaît avec une fréquence supérieure à 50% (de 0.561 à 0.672) à tous les sites (Tableau 4). Avec un total de 18 allèles, le locus Pma132 est beaucoup moins polymorphe que les quatre autres, alors que le locus Pma212 possède le plus grand nombre d'allèles (41 allèles). La richesse allélique calculée pour 38 individus évolue entre 8,6 et 27,7 (respectivement pour le locus Pma132 aux sites IDM et SEM et le locus Pma212 au site MI) (Tableau 4).

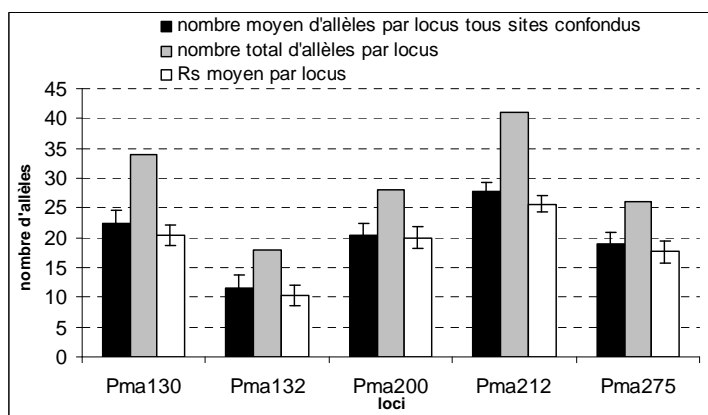


Figure 3. Nombre total et moyen (tous sites confondus) d'allèles par locus et richesse allélique.

Les hétérozygoties attendues (He) sont très élevées mais toujours supérieures aux hétérozygoties observées (Ho) (Figure 4).

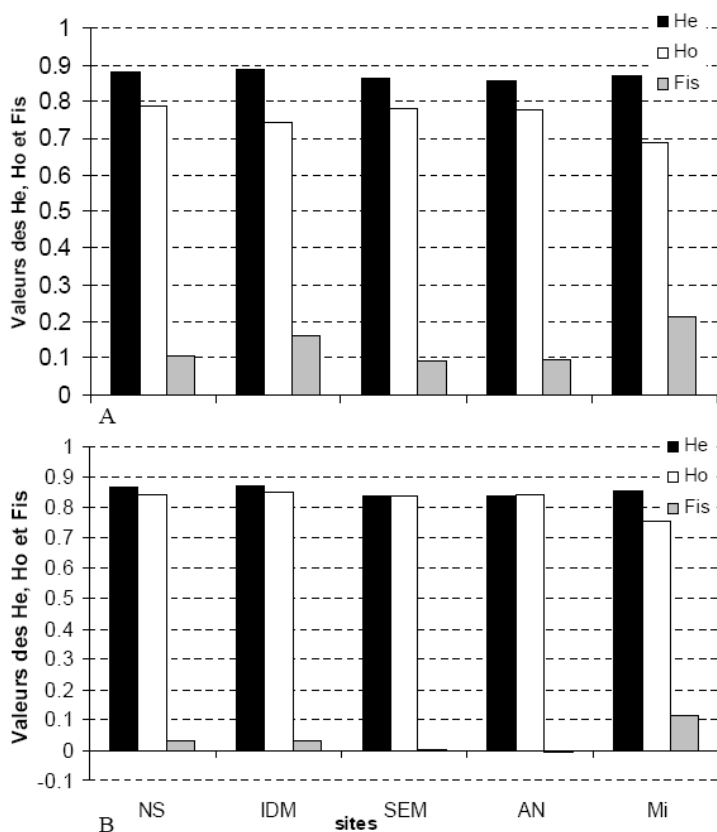


Figure 4. Hétérozygoties attendue (He) et observée (Ho) et Fis moyens par sites (tous loci confondus). En A, les 5 loci ont été analysés, mais en B le locus Pma200 a été exclu.

L'hétérozygotie observée (Ho) varie de 0,33 (pour le locus Pma200 au site IDM) à 0,94 (pour le locus Pma130 au site NS) (Tableau 5). Les valeurs moyennes d'hétérozygotie observée (Ho) varient de 0,69 à 0,79. L'hétérozygotie attendue (He) varie de 0,54 (pour le locus

Pma132 au site AN) à 0,96 (pour le locus Pma212 au site Mi). L'hétérozygotie moyenne attendue (He) est supérieure à Ho à tous les sites et varie de 0,86 à 0,88. Mais quand on exclut le locus Pma200 (Figure 3b), les valeurs de Ho (de 0,75 à 0,85) sont très proches de celles des He (de 0,84 à 0,87) excepté pour le site Mi (où $Ho=0,75$ et $He=0,85$).

Les valeurs moyennes de la statistique Fis sont positives, entre 0,09 et 0,22 (Tableau 4 et Figure 3A) ce qui indique un déficit en hétérozygotes à tous les sites. Mais quand on exclut le locus Pma200, les Fis sont non significatifs pour tous les sites sauf pour Mi (où le Fis est

de 0,12) (Figure 4B) qui est donc le seul à présenter un déficit en hétérozygotes. Donc quand on exclut le locus Pma200, tous les sites sauf Mi sont à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Il semble que le déséquilibre en hétérozygotes observé à chacun des sites soit en grande partie dû au locus Pma200. Ceci est d'ailleurs illustré par la figure 5. Le locus Pma200, avec un *Fis* de 0,49 présente un fort déséquilibre en hétérozygotes, alors que les autres loci ont un *Fis* inférieur à 0,07.

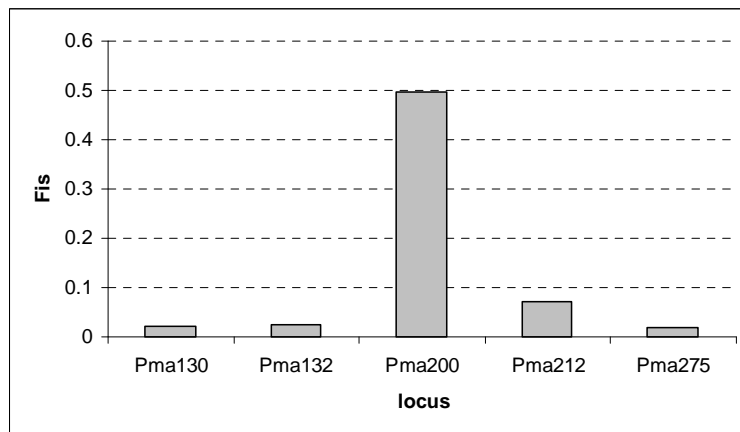


Figure 5. Valeurs moyennes du coefficient de consanguinité (*Fis*) par locus tous sites confondus.

Des analyses ont été effectuées avec le logiciel Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) pour identifier les causes du déficit en hétérozygotes. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Causes possibles du déficit en hétérozygotes identifiées par le logiciel MicroChecker par locus et par population. Les abréviations correspondent aux sites identifiés au tableau 1.

Population	locus	déficit en hétérozygotes	allèles nuls	<i>stuttering</i>	<i>large allele drop out</i>
NS	Pma200	oui	oui	non	non
IDM	Pma200	oui	oui	non	non
	Pma275	oui	oui	non	non
SEM	Pma200	oui	oui	oui	non
AN	Pma200	oui	oui	non	non
	Pma132	oui	oui	oui	non
Mi	Pma200	oui	oui	non	non
	Pma212	oui	oui	non	non

La cause la plus souvent identifiée du déficit en hétérozygotes est la présence d'allèles nuls. Quelques effets de *stuttering* sont également observés mais il ne semble pas y avoir de *large allele drop out*. Le locus Pma200 montre systématiquement un déficit en hétérozygotes quel que soit le site. D'après ces informations, le locus Pma200 possède un déficit en

hétérozygotes trop élevé, il a donc été retiré des analyses car il ne présente pas les prérequis pour les tests statistiques suivants. Dans leur étude, Kenchington *et al.* (2006) ont également supprimé ce locus pour les mêmes raisons.

3.3 Structure des populations

Les tests pour décrire une structure de populations sont réalisés sur le jeu de données duquel ont été exclues les données du locus Pma200.

3.3.1 Approche conventionnelle par analyse des indices F_{st}

Pour la plupart des paires de sites, la valeur du F_{st} est inférieure à 0, ne démontrant aucune différenciation entre les sites. Mais même les F_{st} supérieurs à 0 ne dépassent pas le seuil de significativité de 0,05 (Tableau 6). Donc le test statistique F_{st} ne différencie aucun des sites d'étude. De même, aucune différence n'est identifiée entre les deux échantillonnages de naissain (SEM et Mi), ne montrant aucune différenciation génétique temporelle.

Tableau 6. Valeurs des F_{st} par paires de populations (en dessous de la diagonale) et leurs probabilités respectives (au dessus de la diagonale).

	NS	IDM	SEM	AN	MI
Nouvelle-Écosse (NS)	0	0.9	0,724	0,617	0,986
Îles-de-la-Madeleine (IDM)	-0,002	0	0,278	0,268	0,996
Saint-Pierre et Miquelon (SEM)	-0,001	0,001	0	0,439	0,846
Terre-Neuve (AN)	-0,001	0,001	0	0	0,352
Miquelon (Mi)	-0,004	-0,004	-0,002	0,001	0

3.3.2 Approche bayésienne

Afin d'estimer le nombre potentiel de populations K présentes dans le jeu de données, celles-ci sont analysées avec le logiciel Structure (Pritchard *et al.* 2000). L'indice de probabilité du nombre K de populations utilisé est le $Lnp(D)$, soit une estimation du logarithme de la probabilité que K soit vrai. On retrouve les valeurs moyennes de $Lnp(d)$ à la figure 6.

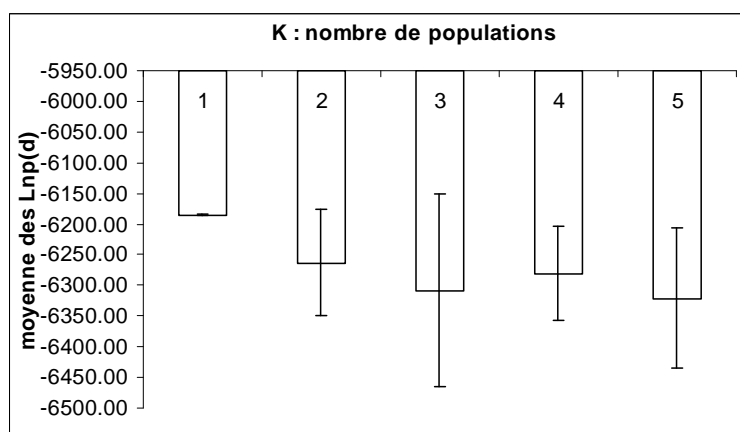


Figure 6. Moyennes du $Lnp(d)$ et écarts-types des 15 itérations pour des K fixés de 1 à 5.

Pour une valeur moyenne la plus petite du $Lnp(d)$ de -6185 et un écart type presque nul, le nombre le plus probable de populations calculé par le logiciel est une seule. Ce résultat est corroboré par le graphique de la figure 7.

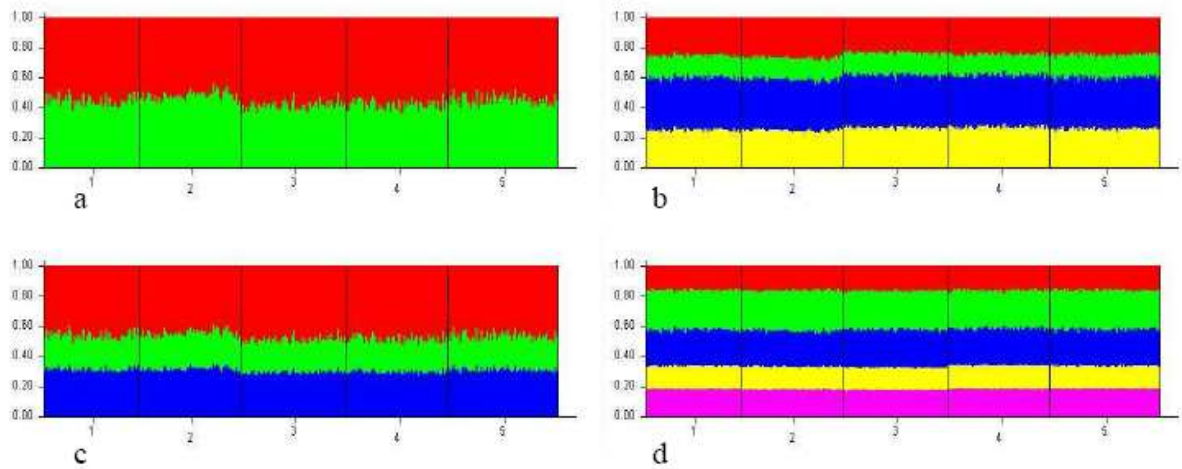


Figure 7. Probabilités qu'un individu appartienne à un des groupes hypothétiques pour $K=2$ (a), 3 (c), 4 (b) ou 5 (d). Les chiffres en abscisse correspondent aux sites d'échantillonnages (soit de 1 à 5 NS, IDM, SEM, AN et Mi). Chaque individu correspond à un trait vertical.

Pour n'importe quelle valeur de K variant de 2 à 5, les probabilités qu'un individu soit admis dans chaque groupe sont à peu près égales. Aucune tendance particulière ne semble se démarquer, même si on tient compte des sites d'échantillonnage. On peut donc en conclure que les individus échantillonnés proviennent d'une seule et même population, il n'y a pas de différenciation entre les sites.

Pour comparer avec des résultats positifs, la figure 8 montre une structure de population établie pour un jeu de données chez le crabe des neiges (*Chionoectes opilio*), issu de la thèse de Puebla (2003).

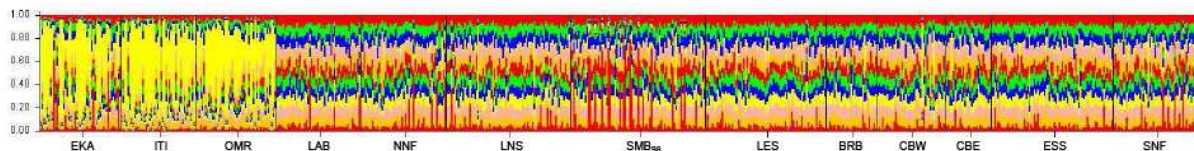


Figure 8. Exemple de ce qu'on obtient avec le logiciel Structure quand plusieurs populations sont identifiées.

Ici K a été fixé à 13, on voit bien que la structure aux trois premiers sites se démarque du reste des sites d'échantillonnages. En effet, les trois premiers sites sont structurés par la dominance du groupe représenté par la couleur jaune. Pour le reste des sites par contre aucune tendance ne se dégage. Les échantillons peuvent donc être différenciés en deux populations caractérisées par des fréquences alléliques différentes.

4 Discussion

4.1 Différenciation génétique des sites géographique et temporelle

Le jeu de données est hiérarchisé à différents niveaux : un niveau spatial, à savoir trois sites géographiquement éloignés (Îles-de-la-Madeleine, Nouvelle-Écosse et Saint-Pierre et Miquelon), et un niveau temporel. En effet les échantillonnages AN, SEM et Mi ont tous été réalisés dans la même zone géographique de Saint-Pierre et Miquelon. Cependant les individus AN sont des adultes et les naissains SEM et Mi ont été échantillonnées à un intervalle d'un an (2009 et 2010 respectivement). La variabilité génétique géographique est testée sur les adultes et la variabilité temporelle à un même site est testée sur les individus échantillonnés à Saint-Pierre et Miquelon. Au vu de l'homogénéité des fréquences alléliques entre les sites, il semble qu'il n'y ait aucune différence génétique aussi bien au niveau spatial que temporel. Étudier la variabilité temporelle est important car certaines études indiquent une variabilité génétique entre les classes d'âge à un même site (ex : Launey *et al.* 2002), ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats sur la différenciation géographique (il faut tenir compte dans l'échantillonnage des classes d'âge des individus, si on échantillonne une seule ou plusieurs cohortes). Il semblerait que pour les espèces marines à très forte fécondité, le succès reproducteur puisse dépendre uniquement d'un petit groupe d'individus (Arnaud-Haond *et al.* 2008 ; Hauser et Carvahlo 2008). En effet, pour ces espèces, la survie des larves dépend des conditions environnementales du milieu (hypothèse du *match-mismatch* de

Cushing 1990) et il est possible que parmi tous les individus de la population (soit la taille totale de la population), seul un petit groupe de géniteurs (que l'on appelle taille efficace de la population) rencontrera des conditions du milieu optimales pour la ponte et la survie des larves (théorie du *sweepstakes reproductive success* : loterie du succès reproducteur) (Hedgecock *et al.* 2007). Dans ce cas, la majorité des juvéniles sera issue de ces reproducteurs qui seront les seuls à transmettre leur patrimoine génétique, on détectera alors une signature particulière dans la cohorte de juvéniles. Seulement, l'année suivante ce ne sera peut être pas les mêmes individus qui se reproduiront avec succès et il y aura une signature génétique de la cohorte différente, d'où, à un site donné, l'observation d'une variabilité génétique entre les classes d'âge. Ce phénomène n'a pas été détecté chez nos pétoncles, puisqu'il n'y a aucune signature génétique parmi tous les échantillons étudiés.

On ne peut pas discriminer les individus provenant des trois sites géographiques et il n'est donc pas possible d'identifier génétiquement la provenance du naissain capté dans la baie de Miquelon. De toute manière, les échantillons de naissain ne montrent pas non plus de signature génétique particulière. Il est donc probable que tous ces individus constituent une seule et même population dont l'homogénéité est maintenue par la dispersion des individus au stade larvaire. Il faudrait évaluer la cohérence de ce résultat avec des données courantologiques précises de la zone. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études menées sur cette espèce, qui ont déjà montré une très faible voir une absence de structuration des populations de *P. magellanicus* à différentes échelles spatiales. À l'échelle du golfe du Saint Laurent, Roy (2005) n'arrive à identifier que trois populations : deux très proches l'une de l'autre sur la Basse Côte Nord et une troisième qui regroupe le reste de la zone d'étude. Les études à plus petites échelles géographiques ne montrent pas de différenciation entre les populations. Dans cette même étude il n'y a pas non plus de différenciation entre les classes d'âge étudiées sur le site de Chandler. De même, Kenchington *et al.* (2006), dans leur étude à l'échelle de la zone de répartition de l'espèce, ne trouvent de différences qu'entre trois régions également éloignées les unes des autres. Donc, dans le triangle géographique constitué des Îles-de-la-Madeleine, de la Nouvelle-Écosse et de Saint-Pierre et Miquelon (qui constitue une zone d'étude plus petite que celles des études mentionnées auparavant), il n'est pas contradictoire de ne trouver aucune différence génétique entre les sites. De plus, il se trouve que dans cette même région du golfe du Saint-Laurent, des études sur d'autres invertébrés (Addison et Hart 2004 pour l'oursin, *Strongylocentrotus droebachiensis* ; Sévigny *et al.* 2000 pour la crevette nordique, *Pandalus borealis* ; Puebla *et al.* 2005 pour le crabe des neiges,

Chionoecetes opilio) ont également montré que la connectivité démographique était assez importante pour prévenir la différenciation génétique des populations. Cela peut s'expliquer par la présence des grands axes courantologiques qui caractérisent le golfe du Saint-Laurent (Figure 8), assurant ainsi une forte connectivité entre les sites d'étude.

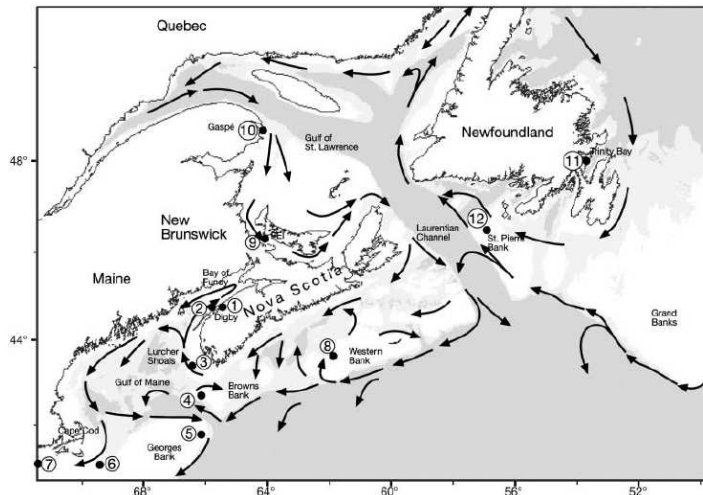


Figure 9. Patrons généraux de circulation océanique de la côte Nord-Est Canadienne. (Issue de Kenchington *et al.* 2006).

4.2 Quel apport pour le projet pectinicole ?

Finalement qu'est-ce que ces résultats apportent comme précisions pour le captage larvaire à Saint-Pierre et Miquelon ? L'objectif de l'étude était, en identifiant la provenance du naissain présent dans les collecteurs, de pouvoir optimiser le captage local, à savoir surtout de mieux placer les collecteurs en fonction de la provenance des larves. L'étude génétique n'ayant pas permis d'élucider cette question de l'origine des larves, nous n'avons pas de conseils à apporter pour le captage larvaire. Néanmoins, cette absence de différenciation génétique des individus apporte tout de même une information intéressante dans le fait que, finalement, il n'y a pas à s'inquiéter de la pollution génétique que peut engendrer l'introduction de naissain étranger, tout au moins à l'échelle étudiée. Cette inquiétude n'est probablement pas une priorité dans le cadre d'un tel projet, mais on sait bien maintenant que l'homogénéisation génétique engendrée par le déplacement d'individus (notamment dans un contexte d'aquaculture) peut avoir, au même titre que l'introduction d'espèces dites invasives, des conséquences importantes sur l'environnement. En effet, d'un point de vue de la diversité génétique, l'introduction de nouveaux génotypes peut provoquer une homogénéisation génétique de l'espèce. Au bout de quelques générations, le mélange des génotypes va provoquer la disparition de nombreux allèles conduisant à une diminution de la diversité génétique de l'espèce. Cet appauvrissement génétique, en diminuant le potentiel adaptatif de

l'espèce la rend plus fragile à d'éventuelles perturbations du milieu. De nombreuses activités humaines peuvent réduire la diversité génétique d'une espèce, la pêche et l'aquaculture entre autres. Dans le cas des écloséries par exemple, où les individus produits sont issus d'un petit nombre de géniteurs fortement sélectionnés pour certaines capacités physiologiques (croissance plus rapide, fécondité plus grande...), la diversité génétique des individus est fortement réduite. Mais cet impact des activités humaines sur la diversité génétique des populations sauvages dépend aussi du degré de structuration de ces populations (ex : Sévigny 1994). C'est pourquoi dans notre cas, la question semble ne pas devoir se poser puisqu'il n'y a apparemment pas de différences génétiques entre les sites. On peut donc sans s'inquiéter des conséquences importer du naissain de la plupart des sites pectinicoles, tout en gardant quand même à l'esprit que d'autres espèces non présentes dans la région de Saint-Pierre et Miquelon et potentiellement invasives peuvent être introduites en même temps que le naissain.

4.3 Perspectives

L'étude avec les microsatellites n'a pas permis de différencier génétiquement les trois populations hypothétiques de base. Lors de cette étude, nous avons rencontré quelques problèmes avec l'un des microsatellites utilisés, le locus Pma200. Tout d'abord, la présence de nombreux allèles nuls, ce qui est un problème récurrent des marqueurs microsatellites, notamment chez les bivalves. Par exemple, Launey *et al.* (2002) en trouvent chez l'huître plate *Ostrea edulis* et Reece *et al.* (2004), chez *Crassostrea virginica*. Ces allèles nuls sont souvent la cause d'un important déficit en hétérozygotes des populations, c'est pourquoi le locus Pma200 a été retiré de nos analyses. L'autre problème du locus Pma200 est la présence d'un troisième allèle chez certains individus. Ce phénomène pourrait s'apparenter à de la polysomie, qui correspond à l'addition au nombre diploïde de chromosomes, d'un ou de plusieurs chromosomes supplémentaires. La polysomie existe à l'état naturel mais chez des individus dont tout le génome est polyploïde (chez l'esturgeon par exemple : King *et al.* 2001). Dans notre cas, ce phénomène est présent uniquement pour le locus Pma200 (une seule observation pour le locus Pma130). Ce phénomène de polysomie à un seul locus est également observé chez la mye (*Mya arenaria*) (communication personnelle de Philippe Saint-Onge, étudiant en doctorat). Les causes en sont encore mal connues. Il est possible que cela soit dû à des mutations dans le génome, ce qui permettrait la fixation des amorces à d'autres endroits du génome, conduisant ainsi à l'amplification de plusieurs fragments d'ADN différents. Pour le cas de la mye la polysomie à certains sites géographiques uniquement pourrait être liée à une pollution de l'eau (mais cela n'a pas encore été prouvé). Ces

problèmes liés au locus Pma200 pourraient éventuellement être corrigés en retravaillant (en changeant la séquence) les amorces de ce locus pour optimiser son étude.

Comme il n'existe actuellement pas d'autres marqueurs microsatellites pour *P. magellanicus* que ceux proposés par Gjetvaj *et al.* (1997), il pourrait être envisageable de développer d'autres microsatellites afin d'augmenter la précision de cet outil. En effet, nous n'en utilisons que cinq, dont un (Pma200) qui a été rejeté, alors qu'habituellement une étude avec des marqueurs microsatellites se déroule avec une dizaine de loci (Evanno *et al.* 2005). Cependant, et au vu des résultats des autres études réalisées sur la structure des populations naturelles de *P. magellanicus* (Roy 2005, Kenchington *et al.* 2008), il est peu probable que d'autres marqueurs permettent de différencier les pétoncles de nos sites d'étude. De plus, l'ajout de loci tend généralement à augmenter la puissance d'un signal déjà identifiable avec 3 ou 4 loci. Par exemple, dans son étude sur le crabe des neiges, Puebla (2005) identifiait déjà la structure des populations avec trois loci, les suivants ayant juste permis d'augmenter la puissance du signal. Néanmoins, au vu du développement des écloséries de pétoncle, le développement de nouveaux marqueurs microsatellites pourrait être très utile pour le suivi des individus produits en éclosérie et ensemencés en milieu naturel. Ces familles, produites à partir de seulement quelques individus, possèdent une signature génétique différente de celle des populations naturelles ce qui permettra de déterminer le succès du repeuplement.

Plusieurs autres options, différentes des microsatellites, peuvent être envisagées pour répondre à la question de la provenance des larves. Pour poursuivre dans la génétique, il pourrait être intéressant d'envisager l'utilisation de marqueurs soumis à la sélection (contrairement aux microsatellites qui sont des marqueurs neutres). En effet l'utilisation de marqueurs soumis à sélection, en permettant d'étudier les adaptations locales, pourrait apporter des informations sur la structuration des populations en terme de divergence adaptative de ces populations (Hemmer-Hansen *et al.* 2007). Il semble que peu d'études avec des marqueurs sélectionnés aient été réalisées sur les bivalves mais il y en a quelques unes sur les poissons. Par exemple, dans leur étude sur le *Platichthys flesus L.* dans l'atlantique nord, Hemmer-Hansen *et al.* 2007 mettent en évidence une différenciation génétique entre plusieurs populations en utilisant comme marqueur le gène de la *Heat-shock cogante proteine* (Hsc70), alors que l'utilisation de marqueurs microsatellite n'avait mis en évidence aucune différence entre ces populations. L'étude sur la morue Atlantique de Skarsteine *et al.* (2007) montre que les différences de structures observées entre les populations ne se situent pas aux mêmes

échelles selon que l'on utilise les microsatellites ou le marqueur sélectionné PanI. En effet, les microsatellites montrent une forte relation entre les distances génétiques et géographiques, ils différencient donc la plupart du temps deux populations très éloignées (isolation par la distance) alors que le marqueur PanI, possédant un polymorphisme beaucoup plus faible (seulement deux allèles), ne détectera pas obligatoirement de différences si les conditions environnementales des deux sites sont identiques. Inversement, à plus fine échelle, le marqueur soumis à sélection peut détecter plus de différences que les microsatellites, si il y a une variation des conditions environnementales. Les deux types de marqueurs, sélectionnés ou neutres, n'apportent pas les mêmes informations. Théoriquement, les marqueurs sélectionnés ne sont pas employés dans les études de structure de populations car la forte sélectivité d'un locus limite sa capacité à estimer les flux de gènes de manière fiable (Holderegger *et al.* 2006). Mais utilisés ensemble il peuvent être complémentaire pour mieux comprendre la structure, plus complexe que ce à quoi on pouvait s'attendre, de certaines populations.

Il est également possible de combiner plusieurs outils. Comme il est fréquemment reporté dans la littérature, les approches multi disciplinaires donnent généralement de meilleurs résultats pour l'étude de la structure des populations. Que ce soit l'utilisation de plusieurs marqueurs moléculaires différents (Patwary 1994, Pogson et Zouros 1994) ou alors par une approche intégrée, c'est-à-dire la combinaison d'outils moléculaires et non moléculaires (Selkoe *et al.* 2008). Chaque outil apporte des informations complémentaires qui ne sont pas accessibles par les autres. Ce genre d'approche intégrée est très utilisé dans les études de dispersion larvaire et de connectivité. Dans notre cas, une approche génétique combinée avec un suivi de la dispersion larvaire et des études de courantologie précises pourrait être une solution pour obtenir de meilleures informations sur la structure des populations. C'est ce qu'ont fait Kenchington *et al.* (2006). Ils ont intégré les données génétiques avec des tests statistiques sur les distances spatiales. Le problème étant que dans notre cas les échantillons étudiés sont très proches les uns des autres et donc les distances spatiales ne sont d'aucune utilité. Ils ont utilisé également un outil de modélisation de la dispersion larvaire pour évaluer la concordance avec les études courantologiques. Ainsi parmi leurs 12 sites d'échantillonnage ils identifient trois populations génétiquement différentes, lesquelles se trouvent dans chacune des trois régions géographiques établies grâce à l'identification de barrières hydrographiques et courantologiques.

De plus, en ce qui concerne le suivi larvaire et la connectivité des populations, on peut aussi utiliser d'autres outils non moléculaires. L'un de ces outils consiste en l'utilisation des techniques isotopiques. En effet, lors de la croissance de la larve, certains éléments chimiques du milieu (métaux traces) sont enregistrés dans la structure calcaire de la coquille laissant ainsi une signature isotopique du milieu (Thorrold *et al.* 2007). Si on est capable d'analyser les rapports isotopiques des structures calcifiées de la larve, on obtient alors une signature isotopique de son milieu d'origine. Alors on peut avoir une idée du trajet parcouru par la larve. La difficulté étant de relier la signature de la larve à une zone géographique précise. Dans son étude sur les moules, Becker (2005) a été capable de retracer l'itinéraire de moules à l'état larvaire en analysant la composition isotopique d'individus de moins de 2.5 mm.

5 Conclusion

Nous avons donc montré ici que les marqueurs microsatellites ne permettent pas de différencier génétiquement les populations hypothétiques de *P. magellanicus*, aussi bien à une échelle spatiale que temporelle. Cette absence de différenciation étant probablement due à la forte connectivité entre les sites d'études, assurée par les courants océaniques qui transportent les larves de pétoncles sur de très longues distances. Les études génétiques n'apportent donc pas d'information susceptible d'améliorer le rendement du captage larvaire de *P. magellanicus* à Miquelon. Cependant pour l'étude de la dispersion larvaire, d'autres outils sont disponibles qui pourraient mieux convenir que les marqueurs génétiques et notamment, dans une approche intégrée, l'emploi de plusieurs outils simultanément.

Bibliographie

- ARDA, 2009. Rapports d'activités Association Recherche Développement Aquaculture. J. Rodriguez & J. G. Orsiny (eds). Convention Ifremer/ARADA.
- Arnaud-Haond, S., V. Vonau, C. Rouxel, F. Bonhomme, J. Prou, E. Goyard & P. Boudry. 2008. Genetic structure at different spatial scales in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesian lagoons: beware of sampling strategy and genetic patchiness. *Mar. Biol.* 155: 147-157.
- Barbeau, M.A. & R.E. Scheibling. 1994. Behavioral mechanisms of prey size selection by sea stars (*Asterias vulgaris*, Verrill) and crabs (*Cancer irroratus*, Say) preying on juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus* (Gmelin)). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180: 103-136.
- Beaumont, A.R. 1991. Allozyme data and scallop stock identification. *J. Cons. Int. Mer*, 47 : 333-338.
- Beaumont, A. 2006. Scallops : Genetics of Scallops. Dans : *Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway, S. E (ed). Elsevier Amsterdam : 543-581.

- Becker, B. J. 2005. Spatial and temporal variation in trace elemental fingerprints of mytilid mussel shells : A precursor to invertebrate larval tracking. *Limnol. Oceanogr.* 50: 48–61.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste. & F. Bonhomme. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interaction, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bricelj, V. M., F. Pernet & C.C. Parrish. 2005. Optimisation de la production de juvéniles de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* : effet de l'utilisation des antibiotiques en relation avec la composition lipidique et analyse des stéroïdes dans des microalgues utilisées dans la nutrition des pétoncles. Dossier n° 710.31. Rapport commandité par la SODIM. Septembre 2005.
- Cook, D. I. & E. Zouros. 1994. The highly variable and highly mutable mitochondrial DNA molecule of the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Nautilus*, 108: 85-90.
- Coulombe, F. 1996. L'écloserie expérimentale de production de bivalves du centre aquicole marin de Grande Rivière. Compte rendu de la cinquième réunion annuelle de transfert de technologie du programme REPERE. 6 et 7 mars 1996. Îles-de-la-Madeleine, Québec, Canada.
- Cowen, R. K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S. R. Thorrold & F. E. Werner. 2007. Population connectivity in marine systems: an overview. *Oceanography*, 20: 14-21.
- Culliney, J.L. 1974. Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol. Bull.* 147: 321-332.
- Cushing, D.H. 1990. Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Adv. Mar. Biol.* 26: 250-293.
- Cyr, C. 2006. Amélioration de la qualité de la collecte du pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* (Gmelin 1791) par un meilleur contrôle de la période d'immersion des collecteurs aux îles-de-la-Madeleine, Québec. Dossier n°710.28. Rapport commandité par la SODIM. Décembre 2006.
- Dao, J. C., 2000. Aquaculture de la coquille *Placopecten magellanicus*, à St Pierre et Miquelon : expertise du projet de l'ARDA (Association pour la recherche et le développement de l'aquaculture) du 27/06/2000 au 09/07/2000. Rapport de contrat ODEADOM n° 2000- 005/3 : 20p.
- El Mousadik, A. & R.J. Petit. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832-839.
- Evanno, G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. et H. Lisher. 2009. Manual Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis. 175p.
- Foucher, E., 2006. Evaluation du stock de pectinidés (Pétoncle d'Islande *Chlamys islandica* et Peigne du Canada *Placopecten magellanicus*) du gisement du banc de Saint-Pierre (Subdivision 3Ps de l'OPANO) : évolution entre 1998 et 2005. Résultats de la campagne de prospection effectuée sur le CCGS W. Templeman, 3 au 8 Septembre 2005. Rapport de contrat Ifremer - MOM n°05/1215612/MF : 32p.
- Gjetvaj, B., R. M. Ball, S. Burbridge, C. J. Bird, E. Kenchington & E. Zouros. 1997. Amount of Polymorphism at microsatellite loci in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Shell. Res.* 16: 547-553.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity*, 86: 485-486.
- Guillot, G., R. L. Leblois, A. L. Coulon & A. C. Frantz. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Mol. Ecol.* 18: 4734–4756.

- Hart, D. 2006. Atlantic Sea Scallops.
http://www.nefsc.noaa.gov/sos/spsyn/iv/scallop/archives/36_AtlanticSeaScallop_2006.pdf.
- Hart, D. & A. S. Chute. 2004. Sea scallop, *Placopecten magellanicus*, life history and habitat characteristics (second edition). NOAA, Essential Fish Habitat Source Documents.
- Hauser, L. & G. R. Carvalho. 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, 9: 333–362.
- Hauser, L. & J. E. Seeb. 2008. Advances in molecular technology and their impact on fisheries genetics. *Fish and Fisheries*, 9: 473–486.
- Hedgecock, D., P. H. Barber & S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*, 20: 70–79.
- Kenchington, E.L., M.U. Patwary, E. Zouros & C. J. Bird. 2006. Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusc (*Placopecten magellanicus*). *Mol. Ecol.* 15: 1781–1796.
- Kenchington, E.L & W. E. Full. 1994. Fourier analysis of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) shells in determining population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 358–356.
- Launey, S., C. Ledu, P. Boudry, F. Bonhomme & Y. Naciri-Graven. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *J. Heredity*, 93: 331–338.
- Manuel, J.L., S. Burbridge, E.L. Kenchington, M. Ball & R.K. O’Dor. 1996. Veligers from two populations of scallop *Placopecten magellanicus* exhibit different vertical distributions in the same mesocosm. *J. Shell. Res.* 15: 251–257.
- Matschiner, M. & W. Salzburger. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25: 1982–1983.
- Naidu, K.S. 1970. Reproduction and breeding cycle of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) in Port au Port Bay, Newfoundland. *Can. J. Zool.* 48: 1003–1012.
- Packer, D.B., L.M. Cargnelli, S.J. Griesbach & S.E. Shumway. 1999. Essential fish habitat source document: sea scallop, *Placopecten magellanicus*, life history and habitat characteristics. NOAA Technical Memorandum NMFS-NE No.134, 21 p.
- Patwary, M. U., E. L. Kenchington, C. J. Bird & E. Zouros. 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1971). *J. Shell. Res.* 13: 547–553.
- Pogson, G. H & E. Zouros. 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: A test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, 137: 221–231.
- Pritchard, J.K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Puebla, O. 2003. Structure génétique des populations de crabe des neiges (*Chionoecetes opilio*) à l’échelle de l’Atlantique du nord-ouest: analyse par l’utilisation de microsatellites. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Rimouski, Canada. 74 p.
- Reece, K. S., W. L. Ribeiro, P. M. Gaffney, R. B. Carnegie & S. K. Allen. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the raster oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *J. Heredity*, 95: 346–352.
- Roy, M. A. 2005. Caractéristiques génétiques des principaux gisements de pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) à l’échelle du golfe du Saint-Laurent: Analyse à l’aide de marqueurs microsatellites. Mémoire de maîtrise. Univ. du Québec à Rimouski, Canada, 123p.
- Selkoe, K. A., C. M. Henzler & S. D. Gaines. 2008. Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. *Fish and Fisheries*, 9: 363–377.

- Sévigny, J. M. 1994. Conservation of genetic diversity of marine organisms. Dans: The development of underutilized invertebrate fisheries in Eastern Canada. Gendron, L. & S. Robinson (eds). Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci 2247: vii +129p. Pp. 103-108.
- Smith, P. J. 2005. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Dans: Stock Identification Methods: Application in Fishery Science. Cadrin, S. X., K. D. Friedland & J. R. Waldman (eds). Elsevier. Pp 371-387.
- Stewart, P.L., et S.H. Arnold. 1994. Besoins environnementaux et réactions aux activités humaines du pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) dans l'est du Canada. Rapp. Tech. can. Sci. halieut. m aquat. 2005 : ix + 39p.
- Thorrold, S. R., D. C. Zacherl & L. A. Levin. 2007. Population connectivity and larval dispersal using geochemical signatures in calcified structures. *Oceanography*, 20: 80-89.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, & P. Shipley. 2004. MicroChecker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Vigneau, S., & D. Hébert. 1996. Compte rendu des opérations réalisées dans le cadre du projet-pilote de l'association des pêcheurs de pétoncles des Îles-de-la-Madeleine (APPIM). Dans le compte rendu de la cinquième réunion annuelle de transfert de technologie du programme REPERE. 6 et 7 mars 1996. Îles-de-la-Madeleine, Québec, Canada.
- Waples, R. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. Heredity*, 89: 439–450.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wright, J. M. & P. Bentzen. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 384-388.

Annexes

Tableau 1. Fréquences alléliques estimées pour tous les individus de l'étude, avec l'effectif (N) et le nombre d'allèles Na (le nombre total d'allèles est indiqué entre parenthèse). Les caractères en gras indiquent les allèles privés.

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma130					
<i>N</i>	54	57	57	57	51
<i>Na</i> (34)	20	25	24	21	22
114	0	0	0	0	0,01
116	0	0,009	0	0	0
118	0	0	0	0,009	0
120	0	0	0	0,009	0,01
124	0	0	0	0,009	0
126	0	0,009	0	0	0,01
128	0	0,009	0,009	0	0
130	0,037	0,035	0,018	0,053	0,02
132	0,13	0,044	0,061	0,096	0,029
134	0,009	0,035	0,035	0,044	0,069
136	0,056	0,044	0,044	0,053	0,039
138	0,065	0,061	0,079	0,061	0,069
140	0,093	0,07	0,123	0,088	0,118
142	0,093	0,105	0,14	0,114	0,157
144	0,074	0,079	0,079	0,096	0,069
146	0,093	0,079	0,053	0,088	0,069
148	0,083	0,053	0,035	0,053	0,118
150	0,056	0,105	0,07	0,07	0,039
152	0,037	0,07	0,044	0,035	0,039
154	0,074	0,018	0,035	0,035	0,029
156	0,009	0,035	0,035	0,026	0,029
158	0	0,018	0,035	0	0
160	0,009	0,044	0,009	0	0,029
162	0,037	0	0,018	0,026	0,01
164	0,009	0,026	0,009	0,009	0,01
166	0	0,009	0	0,009	0,02
168	0,009	0,018	0,018	0,018	0
170	0	0,009	0	0	0,01
172	0,019	0	0,018	0	0
174	0	0,009	0,009	0	0
176	0	0	0,018	0	0
180	0	0	0,009	0	0
184	0	0,009	0	0	0
188	0,009	0	0	0	0

Tableau suite

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma132					
<i>N</i>	54	57	59	58	51
<i>Na</i> (18)	13	9	10	14	12
170	0	0	0	0.009	0
179	0.009	0.009	0	0.009	0.01
182	0.019	0.035	0	0	0.01
185	0.009	0	0	0	0
188	0	0	0.008	0.017	0
191	0.574	0.561	0.661	0.672	0.618
194	0.019	0.026	0.008	0.034	0.059
197	0.093	0.105	0.119	0.043	0.088
200	0.019	0	0	0	0.02
206	0	0	0	0.017	0
209	0.009	0	0.008	0.009	0.01
212	0	0	0	0.026	0.01
215	0.019	0.044	0.042	0.043	0.039
218	0.056	0.088	0.042	0.034	0.049
221	0.037	0.026	0.042	0.043	0.02
224	0.13	0.105	0.059	0.034	0.069
227	0.009	0	0	0.009	0
230	0	0	0.008	0	0
Pma200					
<i>N</i>	40	42	47	43	38
<i>Na</i> (28)	18	21	23	19	21
122	0	0	0	0.012	0
126	0	0	0.011	0	0.013
128	0.088	0.012	0.064	0.047	0.079
130	0.05	0.024	0.011	0	0
132	0.125	0.19	0.106	0.128	0.211
134	0.013	0.071	0.043	0.058	0.026
136	0.063	0.06	0.032	0.047	0.026
138	0	0.048	0.043	0.035	0.013
140	0.05	0.06	0.064	0	0.053
142	0.05	0.06	0.064	0.093	0.039
144	0.125	0.083	0.064	0.07	0.039
146	0.063	0.012	0.138	0.105	0.118
148	0.113	0.048	0.074	0.047	0.039
150	0.088	0.06	0.032	0.07	0.066
152	0.038	0.036	0.043	0.093	0.039
154	0.05	0.024	0.032	0.058	0.053
156	0.038	0.012	0.021	0.035	0.026
158	0	0.012	0.021	0.023	0.039
160	0	0.024	0	0	0.013
162	0.013	0.071	0.021	0.012	0.039
164	0	0.012	0.021	0	0.026
166	0	0.012	0.032	0.035	0.026
168	0.013	0	0.011	0	0

Tableau suite

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma200 suite					
170	0.013	0	0	0	0.013
174	0	0	0	0.012	0
176	0	0.071	0.032	0.023	0
178	0.013	0	0	0	0
192	0	0	0.021	0	0
Pma212					
<i>N</i>	54	57	59	49	51
<i>Na</i> (41)	27	28	28	26	30
79	0	0.009	0	0	0
81	0	0.018	0	0	0
83	0.009	0	0	0	0
85	0.009	0.009	0.017	0.02	0
87	0	0	0.017	0	0.01
89	0.019	0.009	0.017	0	0.029
91	0.019	0.035	0	0	0.039
93	0.009	0.035	0.025	0.02	0.029
95	0.037	0.035	0.051	0.01	0.069
97	0.028	0.035	0.017	0.041	0.02
99	0.056	0.018	0.034	0.01	0.029
101	0.065	0.079	0.119	0.041	0.049
103	0.028	0.105	0.008	0.092	0.049
105	0.056	0.053	0.076	0.082	0.069
107	0.046	0.035	0.059	0.112	0.039
109	0.056	0.044	0.034	0.051	0.059
111	0.046	0.053	0.068	0.041	0.039
113	0.111	0.079	0.076	0.112	0.039
115	0.046	0.026	0.068	0.061	0.049
117	0.046	0.018	0.034	0.031	0.059
119	0.028	0.018	0.051	0.061	0.029
121	0.056	0.044	0.051	0.041	0.078
123	0.046	0.035	0.025	0.051	0.039
125	0.028	0.053	0.025	0.031	0.029
127	0.028	0.035	0.025	0.02	0.01
129	0.009	0.035	0.017	0.01	0.02
131	0.046	0.035	0.025	0.01	0.01
133	0.028	0	0	0.01	0.01
135	0	0.018	0	0	0.02
137	0.019	0.009	0	0	0.039
139	0.028	0	0.008	0	0
145	0	0.026	0.017	0	0
147	0	0	0.017	0	0
149	0	0	0	0	0.01
155	0	0	0	0.01	0

Tableau suite

Locus	Sites				
	NS	IDM	SEM	AN	Mi
Pma 212 suite					
157	0	0	0	0.01	0
159	0	0	0.008	0	0.01
163	0	0	0.008	0	0
169	0	0	0	0.01	0.01
171	0	0	0	0	0.01
217	0	0	0	0.01	0
Pma275					
<i>N</i>	54	57	59	58	51
<i>Na</i> (26)	21	21	17	18	18
75	0	0	0	0.009	0
77	0	0.009	0	0	0
79	0.019	0	0	0	0
81	0	0.026	0.008	0	0.01
83	0.009	0.009	0	0.017	0.01
85	0	0.018	0	0.026	0.039
87	0.028	0.053	0.025	0.06	0.02
89	0.028	0.044	0.042	0.043	0.01
91	0.074	0.123	0.076	0.078	0.088
93	0.074	0.088	0.093	0.138	0.078
95	0.102	0.088	0.093	0.078	0.157
97	0.093	0.123	0.11	0.095	0.118
99	0.083	0.053	0.076	0.086	0.059
101	0.074	0.053	0.136	0.069	0.059
103	0.093	0.07	0.144	0.078	0.118
105	0.093	0.061	0.068	0.095	0.069
107	0.056	0.053	0.042	0.052	0.049
109	0.037	0.035	0.025	0.009	0.069
111	0.037	0.026	0.034	0.026	0.029
113	0.019	0.026	0.008	0	0.01
115	0.028	0.018	0.008	0.034	0
117	0.028	0.018	0	0.009	0.01
119	0.009	0.009	0	0	0
121	0	0	0.008	0	0
127	0.009	0	0	0	0
131	0.009	0	0	0	0

Résumé

Afin de relancer l'activité économique de Saint-Pierre et Miquelon, un projet d'élevage du pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) en filières suspendues et d'ensemencement de juvéniles sur des fonds sélectionnés a été développé dans l'archipel. L'approvisionnement en naissain de bonne qualité est une condition indispensable au succès d'un tel projet. A l'aide de cinq marqueurs microsatellites nous étudions la structure génétique des populations de *Placopecten magellanicus* dans le but de déterminer si les caractéristiques génétiques permettraient d'identifier la provenance du naissain. Est-ce qu'il y a une population source dominante ? Aucune différenciation génétique n'est identifiée à une échelle spatiale entre les trois sites de l'étude ni à l'échelle temporelle entre les deux cohortes de naissain échantillonné en 2009 et 2010 respectivement. A l'échelle de la zone d'étude il ne semble pas y avoir de structuration de l'espèce en plusieurs populations mais plutôt une seule population panmictique maintenue par un flux de gène important provoqué par l'importance de la dispersion au stade larvaire, comme cela a déjà été suggéré dans des études précédentes sur la structure des populations de *Placopecten magellanicus*.

Abstract

In order to improve the Saint-Pierre and Miquelon's economy, a aquaculture project consisting in rearing giant scallop (*Placopecten magellanicus*) in suspended lantern nets and in seeding of selected sites with juveniles was initiated in the archipelago. Securing a supply of high quality spat is a condition essential for the success of such a project. Five microsatellite markers were used to assess the population genetic structure of *Placopecten magellanicus* and to determine if the genetic characteristics would allow addressing the question of the origin of the spat collected in Saint-Pierre and Miquelon. Is there a main source population in the area of interest? No genetic difference was detected between the three geographic locations studied. On the temporal scale, there was also no genetic difference between two spat cohorts collected in 2009 and 2010 respectively. The results of the present study suggest the existence of one population in the study area rather than the presence of several genetically differentiated populations. Gene flow associated with the dispersal of the pelagic larvae over broad areas is most likely important enough to prevent genetic differentiation of *Placopecten magellanicus* populations in the area. The results are in agreement with those of previous studies.