

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**DÉTERMINATION DES CONTRAINTES MÉTABOLIQUES
EN FONCTION DU NIVEAU D'HYPOXIE CHEZ DES
ESPÈCES COMMERCIALEMENT EXPLOITÉES DANS LE
SAINT-LAURENT**

MÉCANISMES BIOCHIMIQUES ET GÉNOMIQUES

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en Océanographie

en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor

PAR

© MARION PILLET

Mai 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

Composition du jury :

Philippe Archambault, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Céline Audet, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski

Denis Chabot, codirecteur de recherche, Ministère des Pêches et Océans Canada

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

Mery Martínez Garcia, examinateur externe, Université Laurentienne

Dépôt initial le 20 décembre 2012

Dépôt final le 10 mai 2013

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisable et finalisée sans le soutien, tant professionnel que personnel, de nombreuses personnes, que je tiens à remercier dans ces quelques lignes.

Tout d'abord, je remercie ma directrice de thèse, **Céline Audet**, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible et grâce à qui j'ai appris le travail de laboratoire et compris ce qu'était "faire de la recherche". Merci pour ta disponibilité, tes relectures attentives et aussi pour avoir trouvé des solutions en période de crise. Finalement, merci aussi pour les contrats à la station qui m'ont permis de mettre un peu les mains dans l'eau.

Mes sincères remerciements à mes deux co-directeurs, **Denis Chabot** et **Réjean Tremblay**, qui malgré leurs avis parfois différents, ont toujours été là quand j'en avais besoin. Merci d'avoir su relativiser les choses quand je paniquais face à des résultats bizarres, pour votre disponibilité et vos explications limpides.

Je tiens aussi à remercier tout spécialement **Philippe Archambault** et **Mery Martínez-Garcia**, en tant respectivement que président du jury et membre externe, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour leurs précieux conseils et suggestions.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Guy Claireaux**, membre de mon comité de thèse, qui a eu la gentillesse de suivre l'évolution de mon doctorat au cours de ces dernières années. Merci pour tes conseils et tes idées sur le présent travail, mais aussi sur ce qui m'attend pour la suite.

Je souhaite remercier les autres chercheurs du projet "Hypoxie", **Yvan Lambert** et **Denis Gilbert** qui m'ont fourni du matériel indispensable à mes expériences et présentations (des flétans du Groenland aux cartes géographiques) et grâce à qui les aspects connexes du projet sont devenus plus clairs.

Mes expériences avec les animaux ayant eu lieu à l'Institut Maurice Lamontagne, je remercie ceux qui ont été sur place pour préparer les montages, s'occuper des organismes et/ou m'aider aux échantillonnages. **Jérôme Gagnon, Mario Péloquin, Linda Girard, Martial Armand, Tanya Hanssen, Aurélie Dupont-Prinet, Marie Vagner** et **Luc Beaudin**, votre présence m'a été d'une grande aide et je vous en suis reconnaissante.

Ce doctorat aurait été infiniment plus compliqué pour la néophyte que j'étais si je n'avais pas bénéficié de la formation et des conseils de plusieurs personnes pour le travail de laboratoire et l'analyse des données qui en découlait. J'adresse ma profonde gratitude à **Bertrand Genard, Benjamin de Mongolfier, Marie Vagner, Andrée-Anne Lemieux, Eric Parent, Robert Saint-Laurent** et **Amélie Crespel**.

Merci aussi à **Karine Lemarchand** et à **Jean-Marie Sévigny** pour m'avoir laissé utiliser leur laboratoire.

Bien évidemment, il y a les collègues qui sont là au quotidien, pour les petits conseils, scientifiques ou autres, les discussions de tous les jours dans les bureaux, grâce à qui la vie à l'ISMER est rendue plus sympathique encore. Merci à vous, **Souad, Wahiba, Mélanie, Andrée-Anne, Ben, Sahar, Nassim, Renée, Marie, Aurélie, Mathieu, Marine, Adriano, Amin...**

Je n'oublie pas non plus les amis, qui de près ou de loin, m'accompagnent pour les fous rires, les craquages et les lundis dessert, mais aussi dans les coups durs, qui m'ont supporté ces dernières années, comprenant plus ou moins les difficultés de la vie au

doctorat, mais présents quand j'en avais besoin, sans condition. Je ne serai pas ici sans vous à mes côtés. Merci d'être là, **Anouck, Souad, Audrey, Charline, Célie, Wahiba, Tarik, Sarah-Jane, Lyria, Thomas, Claire, Julie, Cécile, Rémi, Julien, Sophie, Oliv, Cassandre, Yann, Lucie, Elisabeth, Nico, Manuela, Joanna, Alice, Andrée-Anne, Aurélia, Nassim, Thomas, Hugues...**

Avant de terminer, un énorme merci à **ma famille**, tout spécialement à **mes parents**, qui m'ont toujours soutenue. Je vous aime.

Finalement, merci à ceux que j'oublie mais qui ont été là...

AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat a été réalisée dans le cadre d'un projet en partenariat entre l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER, Université du Québec à Rimouski), l'Institut Maurice Lamontagne (Ministère des Pêches et Océans Canada) et l'Association des Capitaines Propriétaires.

Cette thèse fait partie d'un projet de recherche plus large mené sur les réponses à l'hypoxie de deux espèces d'intérêt commercial dans l'estuaire et le Golfe du Saint-Laurent : la crevette nordique et le flétan du Groenland. Ce projet comprend plusieurs volets : l'étude sur le terrain de l'impact de l'hypoxie sur la distribution et la croissance du flétan du Groenland, l'étude en laboratoire du développement des œufs de flétans du Groenland sous différentes conditions hypoxiques, l'analyse des réponses métaboliques des flétans du Groenland et des crevettes nordiques par respirométrie et finalement, l'identification des réponses à l'hypoxie au niveau enzymatiques chez ces deux espèces. Au cours de mon doctorat, j'ai eu la responsabilité de mener à bien ce dernier volet, en analysant les réponses enzymatiques, en étudiant celles-ci dans différents tissus et chez deux stades de développement pour ces deux organismes. Ce projet de recherche a été financé par le programme stratégique du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) du Canada.

Cette thèse, rédigée en français sous forme de dissertation, se compose d'une introduction générale, d'un matériel et méthodes général, de 4 chapitres détaillant les résultats obtenus au cours de ce travail, d'une discussion générale et d'une conclusion générale, ainsi que d'une partie référencée. Les chapitres 1 et 2 portent sur les réponses métaboliques à l'hypoxie aiguë et chronique de la crevette nordique et les chapitres 3 et 4 portent sur ces mêmes réponses chez le flétan du Groenland.

Les résultats de ce doctorat ont fait l'objet de plusieurs présentations orales et affiches lors de congrès nationaux, tels que la réunion scientifique annuelle du Réseau Aquaculture Québec (RAQ) en 2010 et 2012, le congrès annuel de la Société canadienne d'Écologie et d'Évolution en 2010 et le Forum québécois en sciences de la mer en 2012 ou internationaux tels que le congrès de la Society for Experimental Biology en 2012. Je tiens à remercier le Réseau Aquaculture Québec (RAQ) pour ses contributions financières qui m'ont permis de participer à ces congrès.

RÉSUMÉ

L'hypoxie est un phénomène ayant de nombreux impacts sur les espèces aquatiques, allant parfois jusqu'à menacer leur survie. Dans la couche d'eau profonde de l'estuaire et du Golfe du Saint-Laurent, les niveaux d'oxygène dissous sont très faibles tout au long de l'année et peuvent atteindre 18 % de saturation. Les populations de crevettes nordiques et de flétans du Groenland, deux espèces d'intérêt commercial, y restent cependant très abondantes, notamment dans les différents chenaux (Laurentien, Esquiman et Anticosti) où les conditions d'oxygène sont les plus faibles. Le but de cette recherche était d'étudier les contraintes métaboliques chez ces deux espèces, en utilisant des indicateurs biochimiques et génomiques. En observant les impacts de la diminution en oxygène dissous sur ces deux espèces, j'ai amélioré la compréhension des mécanismes d'acclimatation mis en place face à cette contrainte. J'ai étudié des indicateurs du métabolisme aérobie et anaérobie chez la crevette nordique (mâles et femelles) et chez le flétan du Groenland (adultes et juvéniles) sous différentes intensités et durées d'hypoxie, en se basant sur l'hypothèse qu'à partir d'un certain niveau d'oxygène, les organismes allaient passer progressivement de l'utilisation du métabolisme aérobie à celle du métabolisme anaérobie. Les niveaux de défenses antioxydantes ont été analysés en se basant sur l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie engendre une diminution du stress oxydatif et que des mécanismes de défense vont s'ajuster à l'intensité de celui-ci. Finalement, j'ai essayé de comprendre l'implication des différents gènes intervenant dans la transcription des indicateurs enzymatiques étudiés pour vérifier si des modifications de transcription étaient corrélées aux modifications d'activité enzymatique.

Pour ce travail, deux expériences ont été réalisées : 1) les organismes ont été exposés à une hypoxie aigüe pendant quelques heures ; 2) les organismes ont été exposés à l'hypoxie chronique pour une durée d'une semaine, à des niveaux d'oxygène de 40 %, 30 % et 20 % de saturation. Ces expériences ont été réalisées sur des crevettes nordiques mâles et femelles et des flétans du Groenland juvéniles et, pour la première, des flétans du Groenland adultes ont aussi été utilisés. Suite à ces expériences, la capacité maximale aérobie, anaérobie et antioxydante a été analysée en mesurant l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme aérobie (citrate synthase et cytochrome c oxydase), anaérobie (lactate déshydrogénase, pyruvate kinase et phosphoenolpyruvate carboxykinase) et dans les défenses antioxydantes (glutathion peroxydase, catalase et superoxyde dismutase) dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques et dans le muscle et le foie des flétans du Groenland. Chez les flétans du Groenland juvéniles, des mesures de l'expression des gènes codant pour ces mêmes enzymes ont aussi été réalisées.

Dans le muscle, l'hypoxie aiguë et chronique provoquent des réponses variées mais entraînent soit une absence de réponse, soit une diminution de l'activité enzymatique étudiée. Chez les crevettes nordiques, bien que les mâles et les femelles répondent de la même façon à l'hypoxie chronique (diminution des capacités maximales aérobie et anaérobie et augmentation des défenses antioxydantes), les mâles semblent plus résistants que les femelles à l'hypoxie aiguë car on observe beaucoup moins de modifications enzymatiques chez ces derniers. Chez les flétans du Groenland, les adultes et les juvéniles répondent différemment à l'hypoxie aiguë. Bien que tous deux conservent leur capacité maximale aérobie et que la capacité maximale anaérobie diminue dans le muscle, les adultes augmentent leur capacité antioxydante, contrairement aux juvéniles. En hypoxie chronique, les capacités maximales aérobie et anaérobie diminuent chez les juvéniles et leur capacité antioxydante est maintenue. La comparaison des résultats d'activité enzymatique et d'expression génique montre que les réponses à ces deux niveaux sont différentes ; soit l'hypoxie inhibe la traduction, soit la différence de temps de réponse des deux processus empêche de mesurer un effet au niveau enzymatique. D'autres analyses seraient nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

En conclusion, mes résultats montrent que ces deux organismes sont résistants à l'hypoxie, ce qui explique leur présence et leur abondance dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent malgré les baisses d'oxygène dissous enregistrées entre les années 30 et 80. Cependant, si les niveaux d'oxygène diminuent encore dans les années à venir, ce que laissent présager les changements climatiques anticipés, la survie des crevettes nordiques femelles et des flétans du Groenland juvéniles pourrait être affectée, ainsi que celle des deux populations dans leur ensemble.

Mots clefs : hypoxie, crevette nordique, flétan du Groenland, métabolisme, aérobie, anaérobie, antioxydant, enzymes, gènes

ABSTRACT

Hypoxia is a phenomenon known to have many impacts on aquatic species, sometimes threatening their survival. Dissolved oxygen levels in the deep water layer of the Estuary and Gulf of St.-Lawrence are very low all year long, and can reach 18 % of saturation. Northern shrimp and Greenland halibut, two species of commercial interest, are abundant in this area, including the Laurentian, Esquiman and Anticosti channels, where oxygen levels are the lowest. This research aims to study the metabolic constraints imposed by low dissolved oxygen levels on these two species using biochemical and genomic indicators, in order to enhance our understanding of their acclimation mechanisms allowing them to cope with such environmental conditions. Aerobic and anaerobic metabolism indicators were studied in the northern shrimp (males and females), and the Greenland halibut (adults and juveniles) under several intensity and durations of hypoxia. This was based on the assumption that organisms would gradually use anaerobic metabolism instead of aerobic metabolism when oxygen levels decreased. The antioxidant defense levels were analyzed under the same hypoxic conditions, based on the assumption that hypoxia would decrease oxidative stress, and that the antioxidant defense levels will be adjusted to the intensity of the stress. Finally, to check if the transcription modifications were linked to the enzymatic activity variations, the different genes involved in the transcription of these enzymatic indicators were also analyzed.

Two experiments were conducted. In the first one, organisms were exposed to acute hypoxia for several hours. In the second one, they were exposed to chronic hypoxia for one week, with 40 %, 30 % and 20 % of oxygen saturation. The second experiment used male and female northern shrimp and juvenile Greenland halibut, and the first also used adult Greenland halibut. At the end of the experiments, maximal metabolic capacities were measured using enzymes involved in the aerobic metabolism (citrate synthase and cytochrome c oxidase), in the anaerobic metabolism (lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase) and in the antioxidant defenses (glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase) in the northern shrimp muscle and hepatopancreas and in the muscle and liver of Greenland halibut. The expression of genes coding for these enzymes was also analyzed in juvenile Greenland halibut.

In muscle tissue, the response to acute and chronic hypoxia was variable but it was characterized either by the absence or a decrease in enzymatic activity. Male and female northern shrimp respond similarly to chronic hypoxia (a decrease in the maximal aerobic and anaerobic capacities, and an increase in the antioxidant defense). Less modifications of enzymatic activity were observed in males, suggesting they are more tolerant to hypoxia than females. Adult and juvenile Greenland halibuts had different responses facing acute

hypoxia. They maintained similar level of maximal aerobic capacity but their maximal anaerobic capacity decreased in muscle. Adults enhanced their antioxidant capacity unlike the juveniles. Facing chronic hypoxia, maximal aerobic and anaerobic capacities of juveniles decreased while their antioxidant capacity was stable. The comparison between enzymatic activity and genomic expression results shows different responses for these two levels of analysis. These results can be explained by the fact that hypoxia inhibited translation; or the time response of these two processes is different. Further analyzes would be needed to test these hypothesis.

To conclude, our results show that both organisms are resistant to hypoxia, explaining their presence and abundance in the Estuary and Gulf of St. Lawrence, despite the decrease of oxygen levels between the 1930s and the 1980s. However, if oxygen levels fall further in the future due to climate changes, the survival of female northern shrimp and Greenland halibut juveniles could be affected, as well as their whole population.

Keywords: hypoxia, northern shrimp, Greenland halibut, metabolism, aerobic, anaerobic, antioxidant, enzymes, genes

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	vii
AVANT-PROPOS.....	xi
RÉSUMÉ	xiii
ABSTRACT.....	xv
TABLE DES MATIÈRES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xxix
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
L'HYPOXIE DANS L'ESTUAIRE ET LE GOLFE DU SAINT-LAURENT.....	3
RÉPONSES DES ORGANISMES A L'HYPOXIE.....	5
LE CAS DE LA MORUE.....	13
PRÉSENTATION DES ESPÈCES	15
Crevette nordique	15

Flétan du Groenland	18
OBJECTIFS	20
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
CAPTURE ET MAINTIEN DES ORGANISMES À L'ÉTUDE.....	23
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	24
EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE HYPOXIE AIGÛE	24
EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE HYPOXIE CHRONIQUE	28
ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	29
PRÉPARATION DES HOMOGÉNATS DE TISSU	30
ANALYSES ENZYMATIQUES.....	30
EXPRESSION GÉNIQUE	33
EXTRACTION ET TRANSCRIPTION INVERSE	33
SÉQUENÇAGE	35
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL	38
TESTS STATISTIQUES	42
CHAPITRE 1 IMPACTS DE L'HYPOXIE AIGÛE SUR LE MÉTABOLISME DE LA CREVETTE NORDIQUE <i>PANDALUS BOREALIS</i>	47
1.1 RÉSULTATS.....	47
1.1.1 CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES FEMELLES	47

1.1.1.1	Métabolisme aérobie.....	48
1.1.1.2	Métabolisme anaérobie.....	49
1.1.1.3	Enzymes antioxydantes	49
1.1.2	CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES MÂLES	50
1.1.2.1	Protéines	50
1.1.2.2	Métabolisme aérobie.....	51
1.1.2.3	Métabolisme anaérobie.....	51
1.1.2.4	Enzymes antioxydantes	51
1.2	DISCUSSION	53
 CHAPITRE 2 IMPACTS DE DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE SUR LE MÉTABOLISME DE LA CREVETTE NORDIQUE <i>PANDALUS BOREALIS</i>.....		61
2.1	RÉSULTATS.....	61
2.1.1	PROTÉINES.....	61
2.1.2	MÉTABOLISME AÉROBIE.....	62
2.1.3	MÉTABOLISME ANAÉROBIE	63
2.1.4	ENZYMES ANTIOXYDANTES	64
2.2	DISCUSSION.....	67
 CHAPITRE 3 IMPACTS DE L'HYPOXIE AIGÛE SUR LE MÉTABOLISME DU FLÉTAN DU GROENLAND <i>REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES</i>.....		75

3.1	RÉSULTATS	75
3.1.1	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	75
3.1.1.1	Flétans du Groenland adultes	75
3.1.1.2	Flétans du Groenland juvéniles	76
3.1.2	EXPRESSION GÉNIQUE.....	77
3.1.2.1	Dans le muscle.....	78
3.1.2.2	Dans le foie	79
3.2	DISCUSSION	80
CHAPITRE 4 IMPACTS DE DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE SUR LE MÉTABOLISME DES FLÉTANS DU GROENLAND JUVÉNILES <i>REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES</i>		
		89
4.1	RÉSULTATS	89
4.2	DISCUSSION	94
DISCUSSION GÉNÉRALE.....		
		103
RÉPONSES DE LA CREVETTE NORDIQUE À L'HYPOXIE		
		103
RÉPONSES DU FLÉTAN DU GROENLAND À L'HYPOXIE.....		
		113
DANS LE MILIEU NATUREL		
		121
IMPACTS SUR LES PÊCHERIES.....		
		127
VARIABILITÉ DES RÉPONSES		
		128

VARIABILITÉ INTER-INDIVIDUELLE.....	128
VARIABILITÉ INTER-TISSUS.....	129
PERSPECTIVES	130
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	133
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	135
ANNEXES	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des données métaboliques de la crevette nordique et du flétan du Groenland obtenues par respirométrie par Dupont-Prinet <i>et al.</i> en normoxie	20
Tableau 2 : Traits morphologiques des organismes utilisés pour l'expérience en hypoxie aigüe	26
Tableau 3 : Amorces utilisées chez le flétan du Groenland et numéro de référence GenBanq des séquences utilisées pour les dessiner	36
Tableau 4 : Amorces et sonde TaqMan [®] dessinées avec le logiciel Primer Express et utilisées pour la PCR quantitative en temps réel.....	39
Tableau 5 : Concentration tissulaire en protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie	48
Tableau 6 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie	49
Tableau 7 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie .	50
Tableau 8 : Concentration tissulaire en protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie	50

Tableau 9 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie.....	51
Tableau 10 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie.....	52
Tableau 11 : Activité de lactate déshydrogénase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces	55
Tableau 12 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes et des juvéniles exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie	76
Tableau 13 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie....	76
Tableau 14 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie	77
Tableau 15 : Activité de citrate synthase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces de poissons	81
Tableau 16 : Activité de lactate déshydrogénase et de pyruvate kinase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces de poissons	83
Tableau 17 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours	90
Tableau 18 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours.....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pourcentage de saturation d'oxygène dans le fond de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent durant les étés 2004 et 2005	4
Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de la phosphorylation oxydative, illustrant le rôle de la cytochrome c oxydase	8
Figure 3 : Représentation schématique du cycle de Krebs illustrant le rôle de la citrate synthase	8
Figure 4 : Représentation schématique de la glycolyse illustrant le rôle de la pyruvate kinase.....	10
Figure 5 : Représentation schématique de la fermentation lactique illustrant le rôle de la lactate déshydrogénase	10
Figure 6 : Représentation schématique, en parallèle de la glycolyse, du processus de néoglucogenèse illustrant le rôle de la phosphoénolpyruvate carboxykinase	11
Figure 7 : Distribution de la biomasse (kg/km ²) obtenue par krigeage par bloc de 25 km ² dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent en 2011 pour les crevettes nordiques mâles (M) et femelles (F)	17
Figure 8 : Distribution des taux de capture (kg/trait de 15 minutes) de flétans du Groenland dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent lors de la mission d'évaluation du Téléost de 2008	19

Figure 9 : Montage de respirométrie par flux intermittent tel qu'utilisé lors de l'expérience en hypoxie aigüe	25
Figure 10 : Exemple d'une session de respirométrie (a) et de la méthode de mesure d'O _{2crit} (b)	27
Figure 11 : Courbe de suivi d'oxygène dans les bassins en hypoxie lors de l'exposition d'une semaine des flétans du Groenland juvéniles à différents niveaux de saturation d'oxygène	29
Figure 12 : Exemple de mesure d'absorbance sur 5 min à 340 nm représentant la consommation de NADH pour un individu.....	33
Figure 13 : Gel d'agarose à 2 % avec marquage au bromure d'ethidium (500 µg/mL) permettant de vérifier la qualité de l'ARN extrait des tissus.....	34
Figure 14 : Gel d'agarose à 2 % avec marquage au bromure d'ethidium (500 µg/mL) permettant de vérifier la longueur des produits amplifiés	37
Figure 15 : Exemple de courbe standard de PCR de la GAPDH dans le foie permettant de vérifier l'efficacité de la RT à 100 %	42
Figure 16 : Activité spécifique de citrate synthase dans le muscle des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie	48
Figure 17 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle (A) et dans l'hépatopancréas (B) des crevettes mâles exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours.....	62
Figure 18 : Activité totale de la citrate synthase dans le muscle des crevettes nordiques femelles et mâles exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours.....	63

- Figure 19 : Activité totale de la lactate déshydrogénase dans le muscle des crevettes nordiques femelles et mâles exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours64
- Figure 20 : Activité enzymatique totale de la glutathion peroxydase (A) et de la superoxyde dismutase (B) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles et mâles exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours65
- Figure 21 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin des gènes codant pour la citrate synthase, la cytochrome c oxydase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe78
- Figure 22 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin des gènes codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase dans le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe79
- Figure 23 : Activité enzymatique spécifique et totale de la citrate synthase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours90
- Figure 24 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin des gènes codant pour la citrate synthase, la cytochrome c oxydase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours91
- Figure 25 : Activité enzymatique totale de la lactate déshydrogénase et de la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours92
- Figure 26 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin des gènes codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la catalase, la superoxyde dismutase et la

glutathion peroxydase dans le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours.....	93
Figure 27 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à l'hypoxie aigüe ou chronique	104
Figure 28 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à l'hypoxie aigüe ou chronique	107
Figure 29 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes exposés à l'hypoxie aigüe	115
Figure 30 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques et génomiques observées dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à l'hypoxie aigüe ou chronique	117
Figure 31 : Processus menant à la formation d'une protéine à partir d'un brin d'ADN.....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

% sat.	Saturation en oxygène relative à celle de l'eau en équilibre avec l'air à 101,325 kPa.
18S	18S ribosomique
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Quantité relative de gène exprimée par rapport aux gènes de référence et au groupe témoin
Acétyl-CoA	Acétylcoenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ANOVA	Analyse de variances
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
Cat	Catalase
COX	Cytochrome c oxydase
CS	Citrate synthase
Ct	Nombre de cycles requis pour que la fluorescence du signal soit supérieure au seuil défini de façon arbitraire

DFO	<i>Fisheries and Oceans Canada</i> - Ministère des Pêches et Océans Canada
DTNB	Acide 2-nitrobenzoïque
EDTA	Acide éthylène diamine-tétra-acétique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	L-glutathion réduit
GS-SG	Disulfure de glutathion
H⁺	Ion hydronium
H₂O	Molécule d'eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HNa₂PO₄	Phosphate de sodium dibasique
IML	Institut Maurice Lamontagne, Ministère des Pêches et Océans Canada
KCl	Chlorure de potassium
CL₀₅	Concentration létale pour 5 % de la population testée après une période de temps donnée
CL₅₀	Concentration létale pour 50 % de la population testée après une période de temps donnée
LDH	Lactate déshydrogénase
MDH	Malate déshydrogénase
MgSO₄	Sulfate de magnésium
MMR	Métabolisme maximum (souvent associé à un effort intense)

MnCl₂	Manganèse (II) chloride
MS-222	Sulfonate de tricaïne méthane
NADH	β-nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Adénine dinucléotide phosphate
NaH₂PO₄	Phosphate de sodium monobasique
NaHCO₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NCBI	Centre national d'informations en biotechnologie
NTB	Acide 5-thiobenzoïque
O₂⁻	Anion superoxyde
O₂	Molécule d'oxygène
O_{2crit}	Niveau d'oxygène à partir duquel l'organisme n'est plus capable de soutenir son métabolisme standard
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PK	Pyruvate kinase
ROS	De l'anglais <i>Reactive Oxygen Species</i> = dérivés réactifs de l'oxygène
RT	Transcription inverse
SMR	Métabolisme standard (métabolisme minimum pour maintenir la vie chez un organisme à jeun et au repos)
SOD	Superoxyde dismutase

Tris-HCl Tampon Trizma[®] hydrochloride

U Unité enzymatique (1 μ M de substrat transformée/min)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans l'environnement aquatique, l'oxygène de l'atmosphère et celui produit par la photosynthèse du phytoplancton se dissout dans les eaux de surface. L'oxygène de l'eau est alors en équilibre avec l'atmosphère et on parle d'eau parfaitement saturée en oxygène (100 % de saturation). La saturation en oxygène est relative à celle de l'eau en équilibre avec l'air à 101,325 kPa et est appelée % sat. dans le reste du document. Elle est utilisée car, représentant un rapport de pression partielle, c'est l'unité la plus pertinente pour représenter la pression partielle d'oxygène entre sang et eau qui contrôle le taux de diffusion de l'oxygène vers le sang de l'organisme (Hofmann *et al.*, 2011 ; Seibel, 2011). En conditions optimales, l'oxygène de la couche de surface est ensuite mélangé avec les couches d'eau plus profondes pour approvisionner tous les organismes en oxygène. Cependant, l'environnement aquatique est caractérisé par une hétérogénéité spatiale et temporelle des conditions de salinité, température et d'hydrodynamisme, ainsi que par la variabilité de l'activité photosynthétique, de la respiration des organismes, des phénomènes d'eutrophisation, ... etc. (Kramer, 1987 ; Diaz, 2001 ; Nikinmaa et Rees, 2005 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006). Tous ces processus peuvent produire des gradients horizontaux et verticaux de concentration en oxygène. Quand le niveau d'oxygène devient plus faible qu'en surface, on parle d'hypoxie, en particulier quand la teneur en oxygène dissous commence à avoir des effets mesurables sur les espèces aquatiques (physiologie, comportement, changements de distribution, de croissance, survie... etc.), et d'anoxie quand l'absence d'oxygène est totale (Diaz, 2001). Certains milieux présentent donc des paramètres hydrodynamiques ou physico-chimiques qui favorisent l'apparition de conditions hypoxiques. Les causes de l'hypoxie en milieu aquatique sont diverses et peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Les principaux facteurs responsables de telles

conditions sont la stratification de la colonne d'eau, qui empêche les échanges d'oxygène entre les différentes couches, la décomposition de la matière organique au fond de la colonne d'eau, qui diminue le niveau d'oxygène, particulièrement dans les couches profondes, et le faible renouvellement de l'eau (Diaz, 2001). Ainsi, les environnements où la circulation est restreinte, tels que les estuaires, les baies et les zones côtières, sont particulièrement propices à l'apparition de phénomènes hypoxiques (Gilbert *et al.*, 2005 ; Nikinmaa et Rees, 2005).

Depuis les 50 dernières années, l'oxygène dissous est le paramètre qui a varié le plus rapidement et de la façon la plus importante dans les eaux mondiales (Diaz, 2001). Les zones hypoxiques apparaissent plus fréquemment, de façon plus intense et durent plus longtemps, entraînant un fort déclin de la qualité des habitats estuariens et côtiers (Diaz et Rosenberg, 1995 ; Brouwer *et al.*, 2004). Dans les zones côtières, on attribue souvent cette diminution du niveau d'oxygène à des facteurs anthropiques tels que le développement de l'agriculture et de l'urbanisation (Diaz, 2001 ; Wu, 2002). L'augmentation des apports nutritifs suite aux rejets agricoles (essentiellement nitrates et phosphates) accroît la productivité des eaux de surface et favorise le développement algal (Richmond *et al.*, 2006). Le phytoplancton de surface se retrouve donc en plus grande abondance et ce qui n'est pas consommé chute dans la colonne d'eau et se dépose sur le fond où il est dégradé *via* la décomposition bactérienne, processus qui entraîne une importante consommation de l'oxygène au fond de la colonne d'eau et qu'on appelle eutrophisation (Rabalais *et al.*, 2010).

Dans les années à venir, les zones hypoxiques risquent d'apparaître encore plus fréquemment et de toucher de plus grandes étendues, notamment suite à l'augmentation de la densité des populations humaines et aux changements climatiques globaux (Diaz, 2001 ; Wu, 2002 ; Gewin, 2010 ; Rabalais *et al.*, 2010) car l'augmentation de la température des eaux diminue la solubilité de l'oxygène (Richmond *et al.*, 2006).

REVUE DE LITTÉRATURE

L'HYPOXIE DANS L'ESTUAIRE ET LE GOLFE DU SAINT-LAURENT

L'estuaire et le golfe du Saint-Laurent forment un grand système estuarien de 230 000 km² caractérisé par des chenaux profonds (300-540 m) et une stratification permanente en deux couches l'hiver et trois couches l'été (Koutitonsky et Bugden, 1991). La couche de surface et la couche intermédiaire froide sont saturées en oxygène. La couche d'eau profonde ne peut pas se mélanger aux couches supérieures plus oxygénées (Chabot, 2004) à cause de la barrière physico-chimique créée par la présence d'une halocline et d'une thermocline. Dans le détroit de Cabot où les eaux profondes pénètrent dans le golfe, elles sont légèrement hypoxiques (50-60 % sat.) et le deviennent de plus en plus lors de leur progression vers l'estuaire (20-30 % sat. ; Chabot, 2004 ; Gilbert *et al.*, 2005) suite à la respiration des animaux marins et à la reminéralisation de la matière organique lorsque le plancton chute dans la colonne d'eau (D'Amours, 1993 ; Gilbert *et al.*, 2005 ; Gilbert *et al.*, 2007 ; Genovesi *et al.*, 2011). À la tête des trois principaux chenaux de l'estuaire et du golfe (Laurentien, Esquiman et Anticosti), le niveau de saturation de la couche profonde est typiquement de 20 à 30 % sat. (figure 1) (Gilbert *et al.*, 2007). Comme le niveau de saturation diminue quand la profondeur augmente, l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent présentent des diminutions des niveaux d'oxygène dès 150 m de profondeur tout au long de l'année. Les zones sous les 300 m présentent des valeurs minimales d'oxygène atteignant moins de 20 % sat. (Thibodeau *et al.*, 2006).

Entre les années 1930 et 1980, le niveau d'oxygène dans les eaux de l'estuaire a diminué de moitié (passant d'environ 38 % sat. dans les années 1930 à environ 21 % sat. entre 1984 et 2003). Cette diminution est due avant tout à l'augmentation de la proportion des eaux chaudes en provenance de l'Atlantique nord dans le mélange pénétrant dans le chenal Laurentien (Gilbert *et al.*, 2005 ; Thibodeau *et al.*, 2006 ; Gilbert *et al.*, 2007). Ce phénomène explique environ les deux tiers de la baisse en oxygène dissous. Le reste serait dû à une augmentation des flux de matière organique marins et terrigènes, suite à des

floraisons massives de diatomées. L'intensification de l'agriculture et donc l'augmentation des concentrations de nitrates dans les eaux de surface seraient responsables de ces floraisons massives (Gilbert *et al.*, 2007).

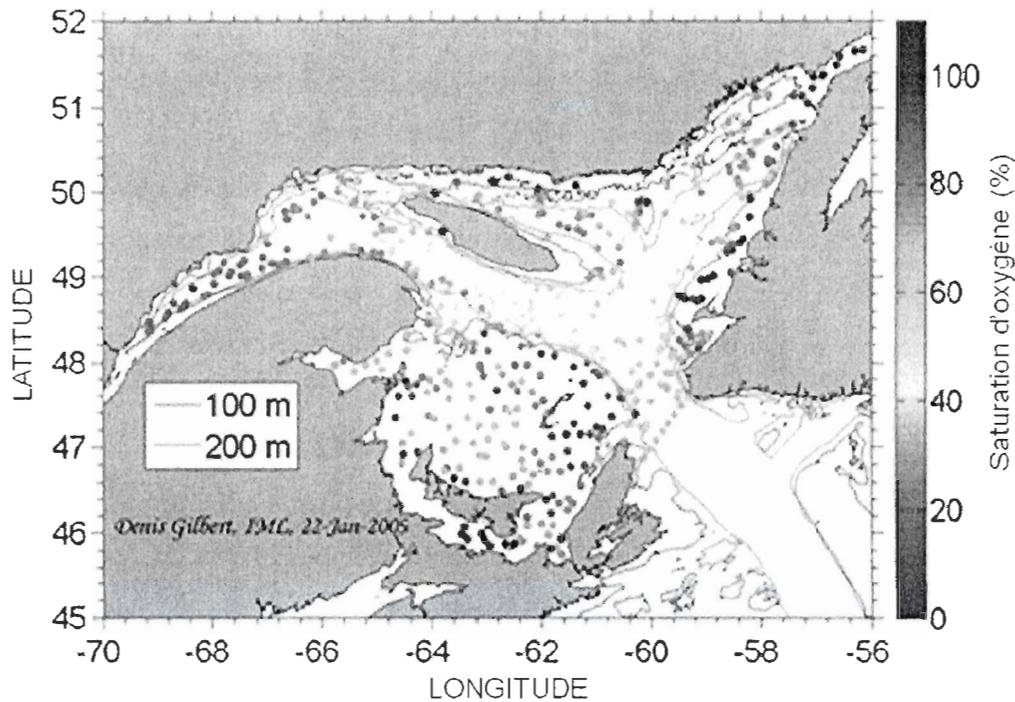


Figure 1 : Pourcentage de saturation d'oxygène dans le fond de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent durant les étés 2004 et 2005. Carte issue de Rabalais *et al.* (2010) adaptée à partir de Gilbert *et al.* (2007)

Dans les années à venir, l'hypoxie pourrait devenir plus sévère dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent et s'étendre à des zones plus grandes (de Vernal *et al.*, 2011 ; Genovesi *et al.*, 2011). En effet, la hausse des températures prédite par les modèles (Thibodeau *et al.*, 2010) augmenterait encore la stratification des différentes couches d'eau, ce qui limiterait le mélange et la ventilation hivernale. Les eaux pénétrant dans l'estuaire seraient encore moins oxygénées qu'actuellement. Le pourcentage d'eau chaude et moins oxygénée, en provenance du *Gulf Stream*, entrant dans le golfe pourrait devenir plus important à cause de la possible migration vers le nord du *Gulf Stream*. Finalement,

l'augmentation de température des eaux ne diminuerait pas uniquement la solubilité de l'oxygène dans l'eau, mais elle provoquerait également une hausse du taux de respiration des organismes (Gillooly *et al.*, 2001 ; Genovesi *et al.*, 2011), et donc une consommation plus importante d'oxygène dans la couche d'eau profonde lors de sa progression vers l'estuaire.

RÉPONSES DES ORGANISMES À L'HYPOXIE

Les phénomènes hypoxiques peuvent être continus, saisonniers, journaliers ou même influencés par les marées selon les milieux. Ainsi, tous les organismes marins ou estuariens sont à même de rencontrer une diminution d'oxygène au cours de leur vie (Storey, 1996 ; Brown-Peterson *et al.*, 2008). Il est nécessaire de comprendre l'impact d'une rencontre avec de telles conditions environnementales sur l'organisme, ses réponses face à celles-ci et les conséquences à long terme sur la biodiversité.

Les effets de l'hypoxie chronique, cyclique ou intermittente ont été étudiés chez de nombreuses espèces estuariennes ou marines. Face à cette contrainte, des changements comportementaux, physiologiques et cellulaires à long terme ont été observés chez beaucoup d'organismes, par exemple chez les crustacés en général (Burke, 1979 ; McMahon, 2001), chez le crabe bleu *Callinectes sapidus* (Brouwer *et al.*, 2004 ; Brown-Peterson *et al.*, 2005) ou chez des poissons démersaux, tels que la morue franche *Gadus morhua* (Claireaux et Dutil, 1992 ; Herbert et Steffensen, 2005 ; Johansen *et al.*, 2006 ; Chabot et Claireaux, 2008), le tambour croca *Leiostomus xanthurus* (Cooper *et al.*, 2002) ou le fondule *Fundulus grandis* (Martínez *et al.*, 2006). Les conditions hypoxiques peuvent entraîner une mortalité massive chez les invertébrés et les poissons (Gewin, 2010), des déplacements d'espèces ou une baisse de biodiversité. Ainsi, au niveau écosystémique, la productivité diminue et les relations proies-prédateurs sont modifiées (Diaz et Rosenberg, 1995 ; Diaz, 2001 ; Chabot et Claireaux, 2008). La tolérance à l'hypoxie varie selon les espèces et les plus tolérantes se sont adaptées, ce qui leur permet de faire face à ces

conditions (McMahon, 2001 ; Nikinmaa et Rees, 2005 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006). Par exemple, les crustacés pourraient survivre à des pourcentages de saturation d'oxygène très faibles en ajustant leur consommation d'oxygène (e.g. McMahon, 2001).

Lorsqu'un organisme mobile se retrouve dans une zone où les conditions d'oxygène ne sont plus optimales, sa première réaction sera de se déplacer vers un milieu où les conditions lui sont plus favorables. Cependant, cette option nécessite qu'un autre milieu présentant des conditions de vie plus appropriées soit disponible (Kramer, 1987 ; Wu, 2002 ; Chabot et Claireaux, 2008). Or un autre habitat n'est pas toujours disponible. Se déplacer vers une zone où le niveau de saturation d'oxygène est plus élevé peut aussi être défavorable si d'autres conditions abiotiques (température, salinité...) et biotiques (prédation, compétition...) sont défavorables (Kramer, 1987 ; Chabot et Claireaux, 2008). L'organisme doit donc faire un compromis et il est parfois plus intéressant au niveau énergétique de demeurer dans un milieu hypoxique si les autres conditions sont favorables, et ce malgré le stress associé à la baisse du niveau de saturation d'oxygène (Kramer, 1987).

Si un organisme ne peut pas ou choisit de ne pas fuir hors de la zone hypoxique, il doit faire face à des conditions physiologiques plus ou moins contraignantes car son registre aérobie diminue. Ce registre aérobie est défini comme le cadre métabolique aérobie disponible entre le métabolisme standard (SMR) et le métabolisme maximum (MMR). Le SMR est défini par Fry (1971) comme le métabolisme minimum pour maintenir la vie chez un organisme à jeun et au repos. Le MMR est défini comme le métabolisme généralement associé avec un effort intense, et durant lequel l'organisme doit répondre à ses besoins (Bennett, 1978). Lorsque la contrainte hypoxique devient importante et que le niveau de saturation d'oxygène se rapproche d'un seuil critique pour l'organisme, celui-ci doit s'acclimater physiologiquement pour augmenter ses chances de survie. Ainsi, le transport d'oxygène peut être amélioré par une augmentation des rythmes cardiaque et ventilatoire, la perfusion des branchies et la capacité de transport du sang *via* une augmentation de la concentration en globules rouges, en hémoglobine et une modifications de l'affinité des

pigments respiratoires pour l'oxygène (Czyzyk-Krzeska, 1997 ; McMahon, 2001 ; Wu, 2002). En parallèle, la demande énergétique peut être réduite en régulant le métabolisme (Hochachka, 1986 ; Boutilier, 2001 ; McMahon, 2001 ; Wu, 2002 ; Nikinmaa et Rees, 2005), ce qui permet d'étendre la durée de survie sur la base des mêmes réserves énergétiques (Storey, 1996). Cette diminution va avoir des impacts sur la locomotion et les performances de nage, la croissance, la prise de nourriture ou la reproduction (Chabot et Claireaux, 2008). La limitation de l'alimentation et de la digestion serait à l'origine de la diminution de la croissance en conditions d'hypoxie (Kramer, 1987 ; Chabot et Dutil, 1999 ; Wu, 2002). La réduction du métabolisme peut aussi affecter les défenses immunitaires des individus, augmentant leur risque de maladies et de mortalité (Brouwer *et al.*, 2007). L'étude des paramètres physiologiques de l'animal en relation avec les paramètres environnementaux, tels que le niveau de saturation d'oxygène de l'eau, peut permettre de mieux comprendre la distribution et les causes des migrations à petite échelle chez ces espèces (Claireaux et Dutil, 1992).

Au niveau métabolique, les organismes aérobies utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie en quantité suffisante grâce à la phosphorylation oxydative (figure 2) (Czyzyk-Krzeska, 1997). Ce processus est associé à la réduction des molécules d'oxygène en eau par la cytochrome c oxydase (COX) qui utilise 90 % de l'oxygène inspiré par l'organisme (Storey, 1996) et à l'utilisation du cycle de Krebs (figure 3) dont la citrate synthase (CS) régule l'entrée.

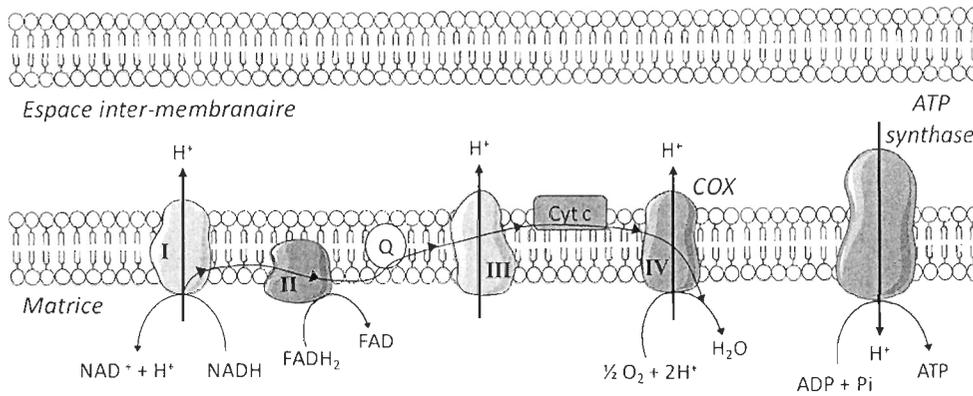


Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de la phosphorylation oxydative, illustrant le rôle de la cytochrome c oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire). Inspiré de Voet et Voet (1995)

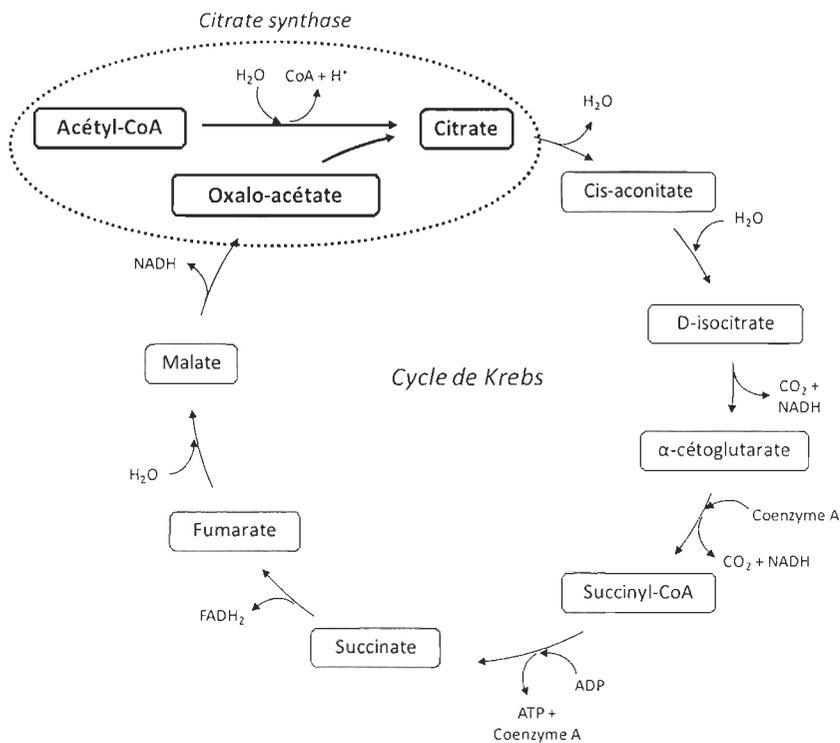


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de Krebs illustrant le rôle de la citrate synthase (encerclé en pointillés). Inspiré de Voet et Voet (1995)

Lorsque le niveau d'oxygène ne permet plus le fonctionnement du métabolisme aérobie malgré les mécanismes mis en place, le métabolisme anaérobie prend le relais pour compléter l'apport énergétique (Hochachka, 1986 ; Czyzyk-Krzeska, 1997 ; Plante *et al.*, 1998 ; Boutilier, 2001 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Wu, 2002 ; Nikinmaa et Rees, 2005). Ainsi, plus la contrainte hypoxique va devenir importante, plus l'organisme va favoriser l'utilisation du métabolisme anaérobie par rapport au métabolisme aérobie (Hochachka et Lutz, 2001).

Le métabolisme anaérobie se caractérise par la formation de pyruvate par la glycolyse (figure 4), lequel est alors transformé en lactate par l'action de la lactate déshydrogénase (= LDH ; figure 5) (Childress et Somero, 1979 ; Ton *et al.*, 2002). La mise en place du métabolisme anaérobie n'est pas une réponse sur le long terme car elle produit peu d'énergie (2 ATP par molécule de glucose comparativement à 36 ATP *via* la phosphorylation oxydative). Cette voie entraîne l'accumulation de produits finaux (tels que le lactate) toxiques à forte concentration (Boutilier, 2001) et pouvant induire la mort par suffocation (Wu, 2002). La néoglucogenèse, synthèse du glucose à partir de substrats non-glucidiques tels que le pyruvate, est aussi utilisée (figure 6). La taille des individus est aussi un facteur à prendre en compte dans la régulation métabolique. Chez une même espèce, les individus de grande taille utilisant la respiration anaérobie à des niveaux de saturation d'oxygène plus élevés que les petits poissons (Cooper *et al.*, 2002). Une meilleure connaissance des mécanismes de mise en place de la respiration anaérobie par rapport à la respiration aérobie sous de faibles niveaux de saturation d'oxygène dissous permettrait de mieux comprendre la réponse des espèces à de telles conditions environnementales.

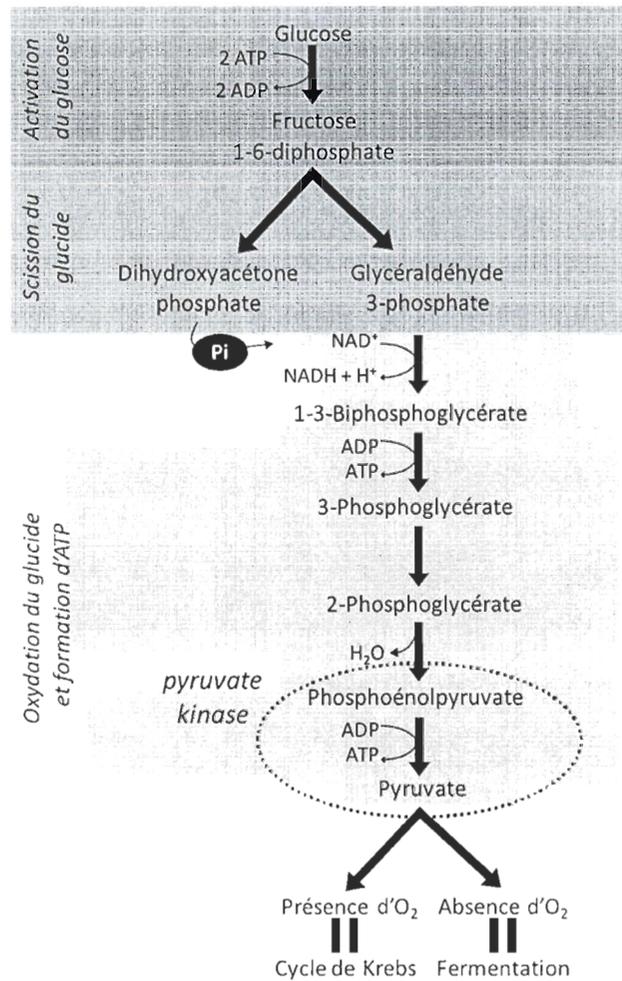


Figure 4 : Représentation schématique de la glycolyse illustrant le rôle de la pyruvate kinase (encerclé en pointillés). Inspiré de Voet et Voet (1995)

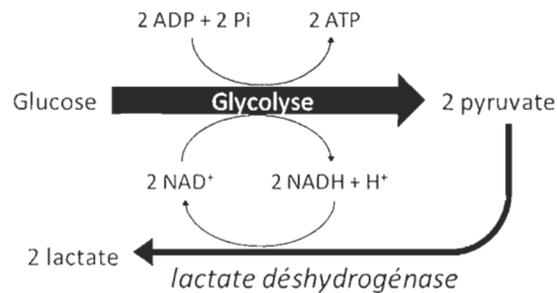


Figure 5 : Représentation schématique de la fermentation lactique illustrant le rôle de la lactate déshydrogénase. Inspiré de Voet et Voet (1995)

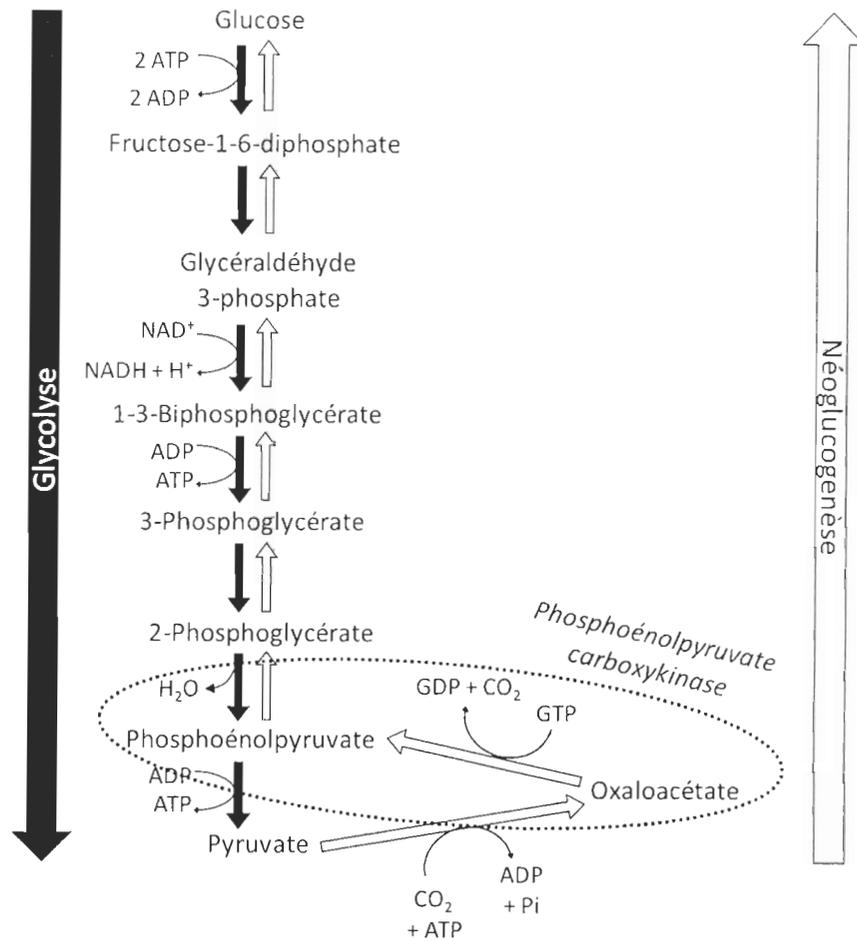
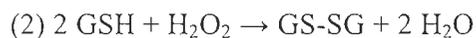
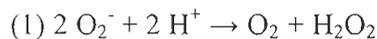


Figure 6 : Représentation schématique, en parallèle de la glycolyse, du processus de néoglucogénèse illustrant le rôle de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (encerclé en pointillés). Inspiré de Voet et Voet (1995)

Une exposition à l'hypoxie modifie la régulation des gènes au niveau moléculaire, ce qui provoque une cascade de réponses au niveau biochimique, notamment au niveau de l'activité des enzymes antioxydantes (Choi *et al.*, 2000 ; Brouwer *et al.*, 2004). Lors de la respiration aérobie, des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* = ROS) sont produits suite à la formation d'électrons libres dans la chaîne respiratoire (Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006). Ainsi, le taux de ROS est dépendant de la consommation d'oxygène et de la quantité de mitochondries présente dans

les tissus (Storey, 1996). Si le taux de production des ROS devient supérieur à leur dégradation, il y a apparition de stress oxydatif (Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006 ; Lushchak, 2011a). Les ROS peuvent endommager les composants cellulaires, ciblant particulièrement les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques, et ainsi causer des dommages tissulaires (Storey, 1996 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006). Les ROS doivent donc être éliminés le plus rapidement possible pour limiter leur pouvoir destructeur (Storey, 1996).

Pour se protéger contre les effets du stress oxydatif, les organismes ont développé un système antioxydant. Ce système comprend des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD) qui catabolise l'anion superoxyde (O_2^- ; équation 1) et la glutathion peroxydase (GPx ; équation 2) ou la catalase (Cat ; équation 3) qui dégradent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (produit induisant la formation des ROS ; Storey, 1996 ; Demple, 1999 ; Choi *et al.*, 2000 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006 ; Lushchak, 2011a).



Les cellules ajustent leur taux d'enzymes antioxydantes en fonction de la quantité de ROS pour se protéger de dommages éventuels (Storey, 1996 ; Demple, 1999 ; Lushchak et Bagnyukova, 2006). En hypoxie, la respiration aérobie est moins utilisée donc la production de ROS est plus faible. Cependant, il peut quand même y avoir une production de ROS *via* l'auto-oxydation de certaines enzymes (Cooper *et al.*, 2002 ; Olsvik *et al.*, 2006). Le système antioxydant, et donc la quantité d'enzymes, doit alors s'ajuster pour éliminer ces ROS au besoin (Cooper *et al.*, 2002). Ainsi, Choi *et al.* (2000) ont démontré

chez une espèce de diptère (*Chironomus riparius*) que les conditions hypoxiques entraînaient une augmentation de l'activité de la SOD. Cependant, toutes les enzymes ne sont pas régulées de la même façon et ces auteurs ont observé chez *C. riparius* une diminution de l'activité de la GPx en hypoxie (Choi *et al.*, 2000). Il serait donc intéressant de comprendre comment l'activité des différentes enzymes est exprimée selon le niveau de saturation d'oxygène de l'eau.

Au niveau moléculaire, la régulation des gènes est la première réponse physiologique face à des changements environnementaux, tels que l'hypoxie. L'expression différentielle des gènes sous des conditions hypoxiques va former une cascade de réponses biochimiques ou physiologiques, permettant à l'organisme de survivre sous de telles conditions (Wu, 2002). Ainsi, l'étude de l'expression génique permet de mieux comprendre comment les organismes répondent à l'hypoxie au niveau moléculaire et quelles sont les relations entre expression des gènes et conditions environnementales (Ton *et al.*, 2002).

LE CAS DE LA MORUE

Chez les poissons marins de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, les impacts de l'hypoxie ont été étudiés principalement chez la morue franche car au moins deux stocks (celui du nord du golfe du Saint-Laurent et celui de la mer Baltique) font régulièrement face à l'hypoxie. Beaucoup de données biologiques, physiologiques et comportementales sont disponibles sur cette espèce (Schurmann et Steffensen, 1992 ; Plante *et al.*, 1998 ; Schurmann *et al.*, 1998 ; Petersen et Steffensen, 2003 ; Chabot, 2004 ; Herbert et Steffensen, 2005 ; Johansen *et al.*, 2006 ; Jordan et Steffensen, 2007 ; Chabot et Claireaux, 2008 ; Hall *et al.*, 2009 ; Methling *et al.*, 2010 ; Petersen et Gamperl, 2010a, b ; Petersen et Gamperl, 2011).

Plante *et al.* (1998) ont montré qu'après 96 h d'exposition, les valeurs de CL₅₀ (concentration létale pour 50 % de la population testée après une période de temps donnée)

et de CL_{05} (concentration létale pour 5 % de la population testée) de la morue franche sont de 21,2 % et 27,7 % sat. respectivement. Ainsi, cette espèce ne peut pas vivre longtemps dans des zones dont le niveau d'oxygène est inférieur à 20 % sat. (Chabot et Claireaux, 2008) et elle évite les zones où il est inférieur à 30 % sat. La croissance de la morue est affectée par des niveaux d'oxygène compris entre 30 et 70 % sat. (Chabot et Dutil, 1999) et sa locomotion et son mécanisme de digestion sont fortement inhibés dès 50 % sat. (Chabot et Claireaux, 2008). Malgré cela, Plante *et al.* (1998) ont démontré qu'elle peut faire des incursions rapides dans des zones où le niveau d'oxygène descend jusqu'à 15 % sat., pour aller se nourrir par exemple, sans que cela n'ait de conséquences négatives, ce qui a été démontré en laboratoire (Claireaux *et al.*, 1995) ainsi que sur le terrain (Neuenfeldt *et al.*, 2009).

Au niveau physiologique, Claireaux et Dutil (1992) ont constaté que sous des conditions hypoxiques moyennes (38 % sat.), la morue modifiait en premier lieu son taux de ventilation et que cette seule modification lui permettait d'éviter d'autres réponses physiologiques plus importantes. Cependant, Petersen et Gamperl (2010a) ont montré qu'à 40-45 % sat., la vitesse maximale de nage de la morue franche diminue, ce paramètre étant associé à une diminution de la consommation maximum d'oxygène et du registre aérobie de l'organisme. À des conditions hypoxiques plus importantes (19 % sat.), une augmentation de la concentration en lactate dans le muscle, le cœur et le foie est enregistrée (Claireaux et Dutil, 1992 ; Hall *et al.*, 2009), ce qui est la conséquence du passage au métabolisme anaérobie et indique un état temporaire qu'il n'est pas possible de maintenir sur le long terme.

Au niveau génique, Hall *et al.* (2009) ont montré que l'exposition à des niveaux d'oxygène dissous inférieurs à 45 % sat. durant environ trois semaines augmentait la transcription du gène de la COX dans les branchies de la morue franche. Olsvik *et al.* (2006) ont quant à eux montré que dans le foie l'hypoxie modifiait la transcription des gènes impliqués dans le système antioxydant, et ce même après six semaines d'exposition à

de faibles niveaux d'oxygène (46 % sat.). En effet, chez la morue franche, les gènes codant pour la GPx et la SOD sont sous-régulés en conditions hypoxiques. L'hypoxie affectant le taux de croissance spécifique de cette espèce, les auteurs émettent l'hypothèse que l'hypoxie affecterait le niveau de transcription de ces deux gènes. En effet, leurs résultats montrent que le taux de croissance spécifique est positivement corrélé au taux de transcription de ces deux gènes et négativement corrélé à l'index de stress oxydatif (Olsvik *et al.*, 2006).

Ainsi, les quelques études précédentes permettent d'affirmer que de grandes parties du golfe du Saint-Laurent ne sont plus des habitats favorables à la morue franche (Plante *et al.*, 1998). En particulier, la tête des trois principaux chenaux, donc l'estuaire maritime, ont des teneurs en oxygène dissous inférieures au CL₀₅ de la morue franche.

PRÉSENTATION DES ESPÈCES

Contrairement à la morue, la crevette nordique (*Pandalus borealis*, Krøyer, 1838) et le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*, Walbaum, 1792) sont deux espèces exploitées commercialement et encore abondantes dans des zones profondes et hypoxiques de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (Gilbert *et al.*, 2007). Leur distribution géographique semble indiquer que ces deux espèces sont tolérantes à l'hypoxie et trouvent peut être des avantages (baisse de la prédation/compétition, etc...) à utiliser les milieux touchés par la diminution d'oxygène. Non seulement ces espèces n'évitent pas les zones hypoxiques, mais plus de 80 % de leur biomasse se trouvent dans les zones à moins de 40 % sat. (Gilbert *et al.*, 2007).

Crevette nordique

La crevette nordique est une espèce de décapode des eaux froides de l'hémisphère nord. Dans l'Atlantique, elle est présente le long de la côte américaine entre Cape Cod et l'île de Baffin, à l'ouest du Groenland depuis Cape Farewell à la baie de Melville et à l'est

du Groenland jusqu'au 70^{ème} parallèle nord (Bergström, 2000 ; Garcia, 2007). C'est une espèce dominante de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent. Elle vit sur des fonds argileux à des profondeurs variant de 20 à 1 330 m. Dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, elle est retrouvée entre 150 et 350 m de profondeur où le niveau d'oxygène varie souvent de 50 à moins de 20 % sat. (figure 7). Les individus peuvent atteindre une longueur maximale de céphalothorax de 28 mm pour les mâles et 32 mm pour les femelles (Bergström, 2000). Cette espèce se développe en passant par différents stades ayant des habitats distincts (Simard et Savard, 1990). Tout d'abord, les stades larvaires vivent dans un environnement pélagique, puis les juvéniles acquièrent une position plus benthique et vivent en eaux peu profondes. En grandissant, les juvéniles muent et se transforment en crevettes mâles et au bout de quelques années, ces derniers changent de sexe pour se transformer en femelles. Ces deux derniers stades adultes migrent dans les eaux plus profondes (Simard et Savard, 1990 ; Daoud, 2008).

La crevette représente un des produits les plus importants pour les pêcheries de l'Atlantique nord (Holthuis, 1980). Ce commerce a connu un développement très rapide, les débarquements passant de 152 t en 1982 à environ 1 000 t dans les années 2000 dans l'estuaire du Saint-Laurent (Savard, 2011), et de 1 000 t au début des années 1970 à 36 000 t en 2010 dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent réunis (DFO, 2011a). Aujourd'hui, cette industrie est la quatrième pêcherie mondiale et la troisième dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent au niveau du volume total de production de mollusques et crustacés. Les principales zones de capture de l'est canadien se situent dans le golfe du Saint-Laurent, les bancs de la Nouvelle-Écosse, les détroits de Davis et au large de Terre-Neuve.

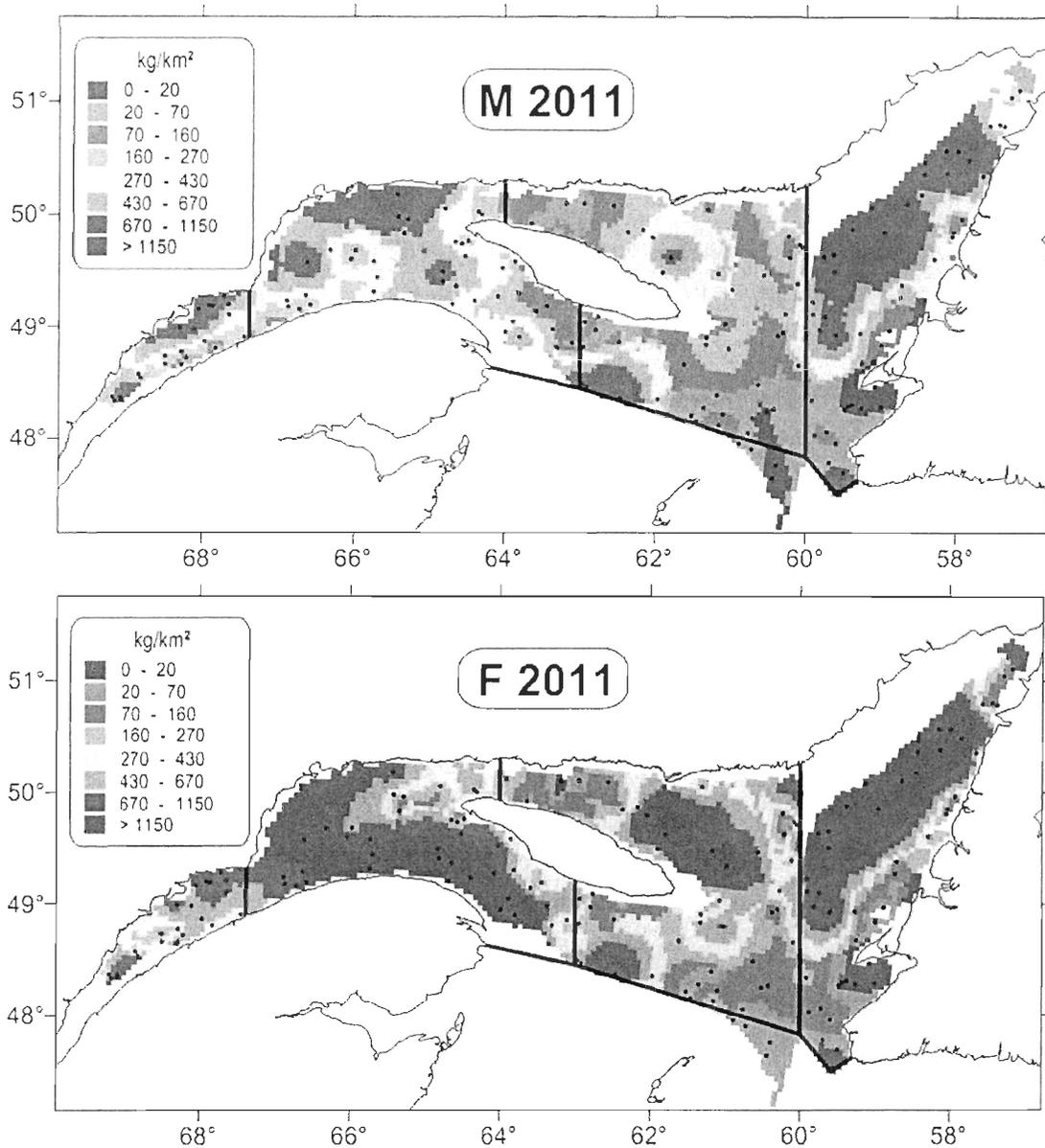


Figure 7 : Distribution de la biomasse (kg/km²) obtenue par krigeage par bloc de 25 km² dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent en 2011 pour les crevettes nordiques mâles (M) et femelles (F) (Savard et Bourdages, 2012)

Flétan du Groenland

Le flétan du Groenland est une espèce retrouvée sous les hautes latitudes, dans les eaux boréales de l'Atlantique et du Pacifique nord. Dans l'Atlantique, il est plus particulièrement retrouvé le long de la côte du Labrador, sur les Grands Bancs de Terre-Neuve et dans le golfe du Saint-Laurent (figure 8). L'estuaire du Saint-Laurent représente une nurricerie pour le stock de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent et les juvéniles y sont particulièrement abondants (Aït Youcef *et al.*, 2013). Cette espèce vit dans des eaux froides et profondes, à des températures variant entre -0,5 et 6 °C et entre 90 et 1 600 m de fond (Scott et Scott, 1988). Malgré sa morphologie de poisson plat, le flétan quitte régulièrement le fond pour s'alimenter et présente alors un comportement pélagique (Scott et Scott, 1988). Les individus peuvent atteindre une longueur maximale de 120 cm et une masse de 25 kg (Scott et Scott, 1988).

Dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, les pêches de flétan du Groenland s'élevaient à environ 3 800 t annuelles pour l'année 2010-2011 (DFO, 2011b), ce qui équivaut à 52 % de la biomasse totale de poissons démersaux pêchée cette même année.

Cette étude est réalisée pour aider à comprendre comment ces deux espèces répondent physiologiquement aux très faibles teneurs en oxygène dissous qui sont typiques des eaux profondes de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, et où elles sont toutes deux abondantes.

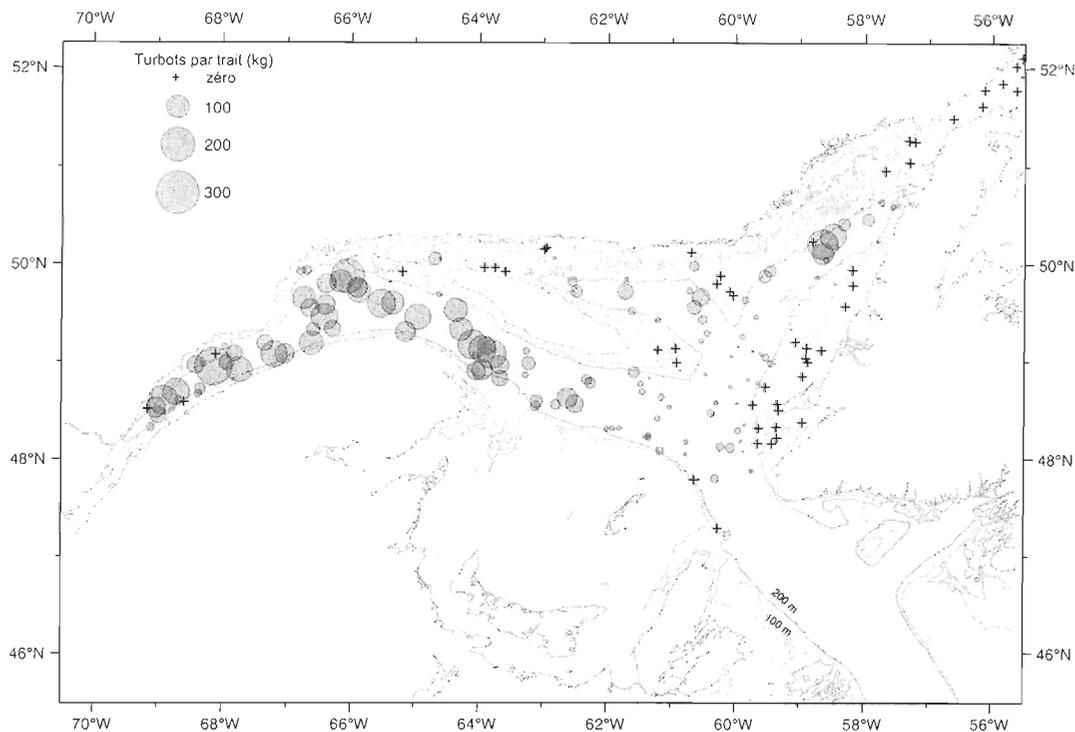


Figure 8 : Distribution des taux de capture (kg/trait de 15 minutes) de flétans du Groenland dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent lors de la mission d'évaluation du Téléost de 2008 (Chabot, communication personnelle)

Cette thèse fait partie d'un projet de recherche plus large mené sur les réponses à l'hypoxie de ces deux espèces. Ainsi, Dupont-Prinet *et al.* (2013a ; b) ont déjà apporté, par des mesures de respirométrie, des informations quant aux réponses métaboliques à l'hypoxie des flétans du Groenland et des crevettes nordiques. Ces auteurs ont mesuré le SMR, le MMR et le registre aérobie pour les crevettes nordiques femelles et mâles ainsi que pour les flétans du Groenland adultes et juvéniles en normoxie (tableau 1). Après des mesures de SMR et de MMR en différentes conditions d'hypoxie (19, 23 et 28 % sat.) chez les flétans du Groenland juvéniles, ils ont montré que bien que l'hypoxie n'ait pas d'impact sur le SMR, le MMR diminue de 57 % en hypoxie, quelque soit le niveau d'hypoxie. Le registre aérobie à 19 % sat. représente quant à lui seulement 27 % de sa valeur en normoxie (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a). Des mesures de SMR et de MMR chez les crevettes

nordiques femelles en différentes conditions d'hypoxie (35, 26, 22 % sat.) ont donné des résultats similaires. Le SMR des crevettes reste stable en hypoxie, quelque soit le niveau d'hypoxie. Par contre, le MMR des individus diminue de 40 à 44 % en hypoxie, sans différence significative entre les niveaux d'hypoxie, par rapport à la normoxie. Le registre aérobie en hypoxie, quelque soit les conditions d'hypoxie testées, représente quant à lui seulement 42 % de sa valeur enregistrée en normoxie (communication personnel).

Tableau 1 : Récapitulatif des données métaboliques de la crevette nordique et du flétan du Groenland obtenues par respirométrie par Dupont-Prinet *et al.* en normoxie (n = 12 pour les flétans juvéniles et n = 14 pour les adultes)

Espèce - stade	SMR (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	MMR (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	Registre aérobie (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)
Crevettes nordiques femelles	34,2 ± 3,6		
Crevettes nordiques mâles	47,8 ± 11,6		
Flétan du Groenland adultes	18 ± 1,6		
Flétan du Groenland juvéniles	6,2 ± 3	122,8 ± 13,2	84 ± 13,1

Dupont-Prinet *et al.* (2013a ; b) ont aussi mesuré la valeur d'O_{2crit}, définie dans cette étude comme le niveau d'oxygène à partir duquel l'organisme n'est plus capable de soutenir son SMR et donc le niveau d'oxygène auquel il ne peut plus soutenir ses fonctions vitales. Les valeurs d'O_{2crit} de chaque groupe étaient respectivement de 9 ± 7 % sat. et de 14 ± 4 % sat. pour les crevettes nordiques femelles et mâles et de 11,1 ± 1,4 % sat. et de 14,9 ± 1,8 % sat. pour les flétans du Groenland adultes et juvéniles.

Cette thèse porte plus spécifiquement sur les mécanismes d'acclimatation moléculaires, biochimiques et métaboliques mis au point pour survivre dans les conditions hypoxiques actuelles du Saint-Laurent. Ces résultats de physiologie intégrative pourront être utilisés dans un contexte de gestion prévisionnelle d'évolution de l'hypoxie.

OBJECTIFS

L'objectif général de cette étude est d'étudier les contraintes métaboliques chez la crevette nordique et le flétan du Groenland en fonction du niveau d'hypoxie, en utilisant

des indicateurs biochimiques et génomiques. En observant les impacts de la diminution en oxygène dissous sur ces deux espèces, cette étude vise à améliorer la compréhension des mécanismes d'acclimatation mis en place en réponse à cette contrainte. L'interprétation des résultats devrait permettre de mieux comprendre les réponses métaboliques des organismes, d'envisager les effets d'une éventuelle baisse des niveaux de saturation d'oxygène dans les eaux profondes de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent sur leur croissance et leur distribution, ainsi que de prédire les impacts commerciaux sur les pêcheries s'il y a lieu.

Dans la première partie de la thèse, l'accent est mis sur la crevette nordique. En premier lieu, l'objectif est d'étudier les métabolismes aérobie et anaérobie sous des conditions hypoxiques de différentes intensités et durées. Le registre aérobie des organismes est plus faible en hypoxie qu'en normoxie et ces derniers passent progressivement en métabolisme anaérobie lorsque l'oxygène dissous approche puis passe sous un seuil critique auquel ils ne peuvent plus maintenir l'apport énergétique nécessaire à leurs fonctions vitales par le métabolisme aérobie (Fry, 1971). Cette partie de la thèse se base sur l'hypothèse selon laquelle l'activité des enzymes du métabolisme aérobie va progressivement diminuer en hypoxie (fortement en hypoxie aigüe et progressivement en hypoxie chronique). Les enzymes du métabolisme anaérobie auraient alors des niveaux plus élevés lorsque le niveau d'oxygène se rapprocherait puis dépasserait le seuil critique. Pour vérifier cette hypothèse, les réponses enzymatiques des crevettes nordiques exposées à différents niveaux d'oxygène (hypoxie aigüe et chronique) ont été comparées. Pour mesurer l'importance des différents types de métabolisme, j'ai mesuré l'activité d'enzymes clefs des métabolismes aérobie (CS et COX) et anaérobie (pyruvate kinase = PK, phosphoénolpyruvate carboxykinase = PEPCK et LDH). Ces enzymes ont été mesurées au niveau du muscle blanc, qui est capable de fonctionner à de hauts taux métaboliques notamment en anaérobie (Bennett, 1978 ; Hochachka, 1985).

Un deuxième objectif est d'analyser les niveaux de défense contre le stress oxydatif en réponse à des conditions hypoxiques de différentes intensités et durées. Cette partie est

basée sur l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie engendre une diminution du stress oxydatif et que les niveaux de défense vont également diminuer pour répondre à la quantité de ROS en production. Ces défenses contre le stress oxydatif sont étudiées en comparant l'activité des enzymes (Cat, SOD et GPx) à différents niveaux d'oxygène, dans l'hépatopancréas. Ce tissu est le plus sensible au stress oxydatif (Ruppert *et al.*, 2004) et la réponse antioxydante y est la plus forte, comme démontré par exemple chez la crevette blanche du Pacifique *Litopenaeus vannamei* (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011) ou chez la littorine commune *Littorina littorea* (Pannunzio et Storey, 1998).

La deuxième portion de la thèse porte sur le flétan du Groenland. Les mêmes objectifs sont visés et les mêmes hypothèses que chez la crevette nordique sont testées chez cette espèce. Pour le flétan, un autre objectif est de comprendre l'implication des différents gènes intervenant dans les métabolismes aérobie, anaérobie et dans les défenses oxydatives dans les réponses et les acclimations à l'hypoxie. L'utilisation en parallèle des méthodes enzymatiques et génomiques permet d'interpréter les réponses à l'hypoxie à un autre niveau et de voir si réponses enzymatique et génomique sont corrélées. Pour cet objectif, j'ai émis l'hypothèse selon laquelle l'expression des gènes reflète l'activité des enzymes pour lesquelles ils codent. Pour vérifier ces hypothèses chez le flétan du Groenland, des juvéniles et des adultes ont été exposés à différents niveaux d'hypoxie. Des analyses d'activité pour les enzymes intervenant dans les processus aérobie et anaérobie dans le muscle et dans les défenses contre le stress oxydatif dans le foie ont été réalisées, de la même manière que chez la crevette nordique. En complément, au niveau moléculaire, l'expression des gènes codant pour ces mêmes enzymes est étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CAPTURE ET MAINTIEN DES ORGANISMES À L'ÉTUDE

Les crevettes nordiques femelles et mâles ont été pêchées dans l'estuaire du Saint-Laurent, au large de Godbout, à environ 140 m de profondeur à la fin juillet et au début août 2009. Elles ont ensuite été transférées à l'Institut Maurice Lamontagne (IML, MPO, Mont-Joli, Québec) et gardées dans des bassins rectangulaires de 2 m³ à une température de $4,5 \pm 0,2$ °C, une salinité moyenne à $27,3 \pm 0,3$ et un débit de 3 L/min. Elles ont été nourries trois fois par semaine en excès, avec un mélange composé de krill atlantique *Meganyctiphanes norvegica* et pacifique *Euphausia pacifica*, de capelan *Mallotus villosus* et de crevettes nordiques congelés et préalablement hachés.

Les flétans du Groenland ont été capturés dans l'estuaire du Saint-Laurent, entre 200 et 350 mètres de profondeur. Les adultes ont été pêchés à la palangre au large de Rivière-au-Renard en septembre 2009 et les juvéniles au chalut lors des campagnes de pêches du MPO dans l'estuaire du Saint-Laurent en octobre 2009. Ils ont ensuite été transférés à l'IML et élevés dans des bassins de 15 m³ avec un débit de 30 L/min pour les adultes (densité d'environ 4,48 g/L) et des bassins de 8 m³ (15 L/min) pour les juvéniles (densité d'environ 0,87 g/L). Ils ont été nourris deux fois par semaine avec du capelan et des crevettes. Les conditions de température ($4,1 \pm 2,6$ °C) et de salinité ($27,3 \pm 1,3$) correspondaient aux conditions retrouvées dans la couche d'eau profonde de l'estuaire du Saint-Laurent (Koutitonsky et Bugden, 1991 ; Thibodeau *et al.*, 2006).

Que ce soit pour les bassins de crevettes ou de flétans du Groenland, l'eau des bassins provenait de l'estuaire, en face de l'IML, à un kilomètre au large. La photopériode était

ajustée pour correspondre aux conditions environnementales de la latitude de l'IML (N 48°37'41") et variait entre 16 heures d'obscurité - 8 heures de jour en hiver à 16 heures de jour - 8 heures d'obscurité en été. L'intensité lumineuse à la surface était d'environ 1 lumen. Les expériences ont été réalisées en accord avec les réglementations du Conseil canadien pour la protection des animaux et ont été approuvées par les comités de protection des animaux de l'Université du Québec à Rimouski et de l'IML.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE HYPOXIE AIGÛE

Le montage utilisé (figure 9) était le même que celui décrit par Dupont-Prinet *et al.* (2013a ; b). Les respiromètres étaient placés dans un bassin permettant un renouvellement d'eau de mer (3 L/min pour le montage des crevettes et 10 L/min pour le montage des flétans du Groenland) à une température constante ($5 \pm 0,2$ °C). La pression partielle d'oxygène était enregistrée en continu par un système régulateur (Lolioxo, Loligo Systems, Danemark). Le taux de saturation d'oxygène était régulé avec de l'azote ou de l'air selon le taux désiré. Le bassin contenant les respiromètres était isolé par un plastique opaque pour éviter de perturber les organismes.

La consommation d'oxygène dans les respiromètres était mesurée selon la méthode de respirométrie par flux intermittent (Steffensen, 1989), c'est-à-dire que les respiromètres étaient renouvelés en eau pendant 5 min environ toutes les 20 min. La diminution d'oxygène pendant la période où le respiromètre était clos a permis de mesurer la consommation d'oxygène en utilisant l'équation 2 de l'étude de Steffensen (1989) et l'équation 8 de Garcia et Gordon (1992) pour la solubilité de l'oxygène. Le taux de saturation d'oxygène dans les respiromètres était mesuré en continu par une optode (Presens, Allemagne) reliée à un capteur d'oxygène (Oxy-4 mini 4-channel Minisensor ou Fibox Minisensor - Presens) associé au logiciel AutoRespTM1 v1.6.0 ou AutoRespTM4 v1.8.0 (Loligo Systems, Danemark).

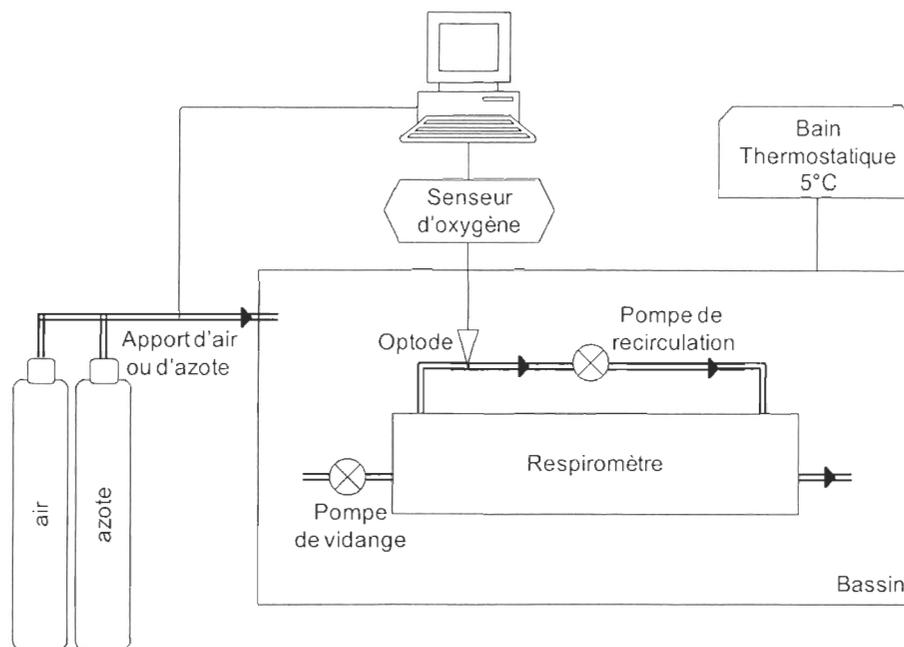


Figure 9 : Montage de respirométrie par flux intermittent tel qu'utilisé lors de l'expérience en hypoxie aigüe

Les organismes (crevettes nordiques femelles et mâles, flétans du Groenland adultes et juvéniles) ont été transférés dans des bassins d'acclimatation de 2 m³ (température = $5,3 \pm 0,3$ °C, salinité = $26,2 \pm 0,6$, débit = 10 L/min) avant les mesures métaboliques. La densité de poissons dans les bassins était d'environ 3,37 g/L pour les adultes et 0,23 g/L pour les juvéniles. Après une semaine d'acclimatation dans la pénombre, les organismes (tableau 2) ont été placés individuellement dans les respiromètres à flux intermittent pour quatre jours ou utilisés comme organismes témoins. Pour chaque manipulation des flétans du Groenland, du Stress Coat[®] (0,26 mL/L; Mars Fishcare North America Inc., PA, USA) était ajouté à l'eau pour réduire la perte de mucus. La taille du respiromètre était adaptée à celle de l'animal : 0,57 L et 0,39 L respectivement pour les crevettes nordiques femelles et mâles, et 2,18 L et 48,8 L respectivement pour les flétans du Groenland juvéniles et adultes.

Tableau 2 : Traits morphologiques des organismes utilisés pour l'expérience en hypoxie aigüe (les tailles sont des longueurs de céphalothorax pour les crevettes nordique et des longueurs totales pour les flétans du Groenland)

Groupe	Organismes	n	Taille
Exposés à l'hypoxie aigüe	Crevettes femelles	13	25,6 ± 1,5 mm
	Crevettes mâles	14	17,3 ± 1,5 mm
	Flétans du Groenland juvéniles	12	23,7 ± 3,7 cm
	Flétans du Groenland adultes	14	51,5 ± 4 cm
Témoins restés en normoxie	Crevettes femelles	13	27,9 ± 8,1 mm
	Crevettes mâles	10	16,4 ± 1,6 mm
	Flétans du Groenland juvéniles	10	22,8 ± 0,6 cm
	Flétans du Groenland adultes	10	48,5 ± 4,6 cm

Après 24 heures d'acclimatation dans le respiromètre dans la pénombre, la consommation d'oxygène des organismes a été mesurée pendant 48 h. Ces données ont ensuite été utilisées pour mesurer le SMR en utilisant la méthode des quantiles (Daoud *et al.*, 2007). Après ces mesures, le niveau d'oxygène a été diminué pendant 12 h par paliers d'une heure (100, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 et 5 % sat.) pour déterminer l' O_{2crit} de l'individu (figure 10). L'expérience était arrêtée si un organisme montrait des signes de détresse respiratoire (retournement sur le dos, arrêt du mouvement des branchies...etc.) ou lorsque la consommation d'oxygène était sous le seuil du SMR pendant au moins une heure. À ce stade, l' O_{2crit} , définie dans cette étude comme le niveau d'oxygène à partir duquel l'organisme n'est plus capable de soutenir son SMR et donc le niveau d'oxygène auquel il ne peut plus soutenir ses fonctions vitales (Wang *et al.*, 2009), était considérée atteinte. La valeur d' O_{2crit} a été calculée en utilisant un algorithme écrit sous R (R Development Core Team, 2011) permettant d'identifier les points inférieurs au SMR. À partir de ceux-ci on trace une régression (figure 10b) et la valeur d'oxygène (sur l'axe des abscisses) correspondant à l'intersection entre cette ligne de régression et celle, horizontale, du niveau du SMR, est définie comme la valeur d' O_{2crit} (figure 10b) (Dupont-Princt *et al.*, 2013a ; b). Dans cette étude, les valeurs de SMR et d' O_{2crit} ont été corrigées pour prendre en compte la consommation d'oxygène bactérienne. Pour cela, la consommation d'oxygène dans le

respiromètre a été mesurée avant l'introduction de l'organisme dans le respiromètre et à la fin de l'expérience une fois que l'organisme en ait été retiré.

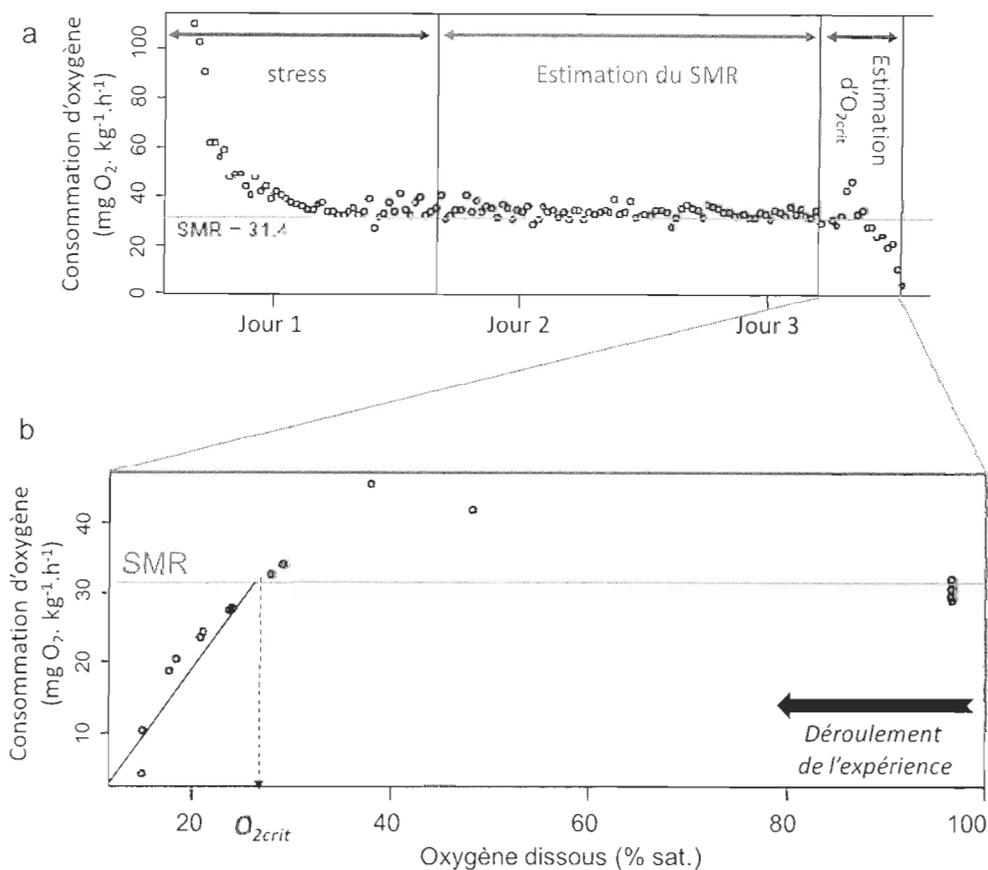


Figure 10 : Exemple d'une session de respirométrie (a) et de la méthode de mesure d'O_{2crit} (b)

Les crevettes ont été anesthésiées sur glace, immédiatement sacrifiées et des échantillons de muscle blanc ainsi que d'hépatopancréas ont été prélevés (étant donné la taille des crevettes, c'est l'ensemble de chaque tissu qui a été prélevé). Les flétans du Groenland ont été anesthésiés dans du MS-222 (sulfonate de tricaïne méthane) à raison de 0,4 g/L pour les adultes et 0,18 g/L pour les juvéniles, sacrifiés et immédiatement disséqués pour récupérer des échantillons de muscle blanc (dans la partie la plus large du poisson) et

de foie. Le muscle blanc a été choisi pour sa fonction principalement anaérobie et son rôle dans les efforts importants et le foie/hépatopancréas pour son rôle de détoxification et de dégradation des produits métaboliques. Les échantillons de tissus des crevettes nordique et des flétans du Groenland ont été séparés en deux parties, immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'aux analyses de laboratoire.

EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE HYPOXIE CHRONIQUE

Cette expérience a été réalisée dans des bassins de $0,8\text{ m}^3$ (température = $5,2 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinité = $27,4 \pm 0,5$ pour les crevettes nordiques et température = $5,4 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinité = $25,3 \pm 0,7$ pour les flétans du Groenland, débit = 10 L/min) équipés d'une colonne d'échange de gaz et d'une sonde à oxygène (Oxyguard[®], modèle 420, Oxyguard International, Danemark). Un système informatisé mesurait l'oxygène dissous de ces bassins toutes les 5 minutes et ajustait la proportion d'air et d'azote injectée dans la colonne au besoin. L'oxygène a été diminué progressivement à l'aide d'azote, jusqu'à atteindre des taux de $41 \pm 0,1$, $29,4 \pm 0,1$ et $18,6 \pm 0,1\text{ \% sat.}$ pour l'expérience sur les flétans du Groenland et $39,7 \pm 1,5$, $30 \pm 1,4$ et $20,2 \pm 1,3\text{ \% sat.}$ pour l'expérience sur les crevettes nordiques (pour le reste du document, je vais considérer que ces niveaux sont 40, 30 et 20 % sat.). Une fois ces niveaux stables, les organismes ont été transférés dans les bassins, à raison de 10 crevettes femelles ($24,8 \pm 1,3\text{ mm}$) et 10 crevettes mâles ($19,7 \pm 2,1\text{ mm}$) par bassin ou 10 flétans juvéniles ($24,7 \pm 2,8\text{ cm}$) par bassin pour une semaine d'acclimatation durant laquelle ils n'ont pas été nourris. Les crevettes ont été placées dans des paniers installés dans les bassins. La figure 11 montre la stabilité du niveau d'oxygène dans les bassins expérimentaux durant les sept jours d'acclimatation des flétans du Groenland. Pour chaque espèce, des individus ont été laissés dans des bassins en normoxie et utilisés comme groupe témoin.

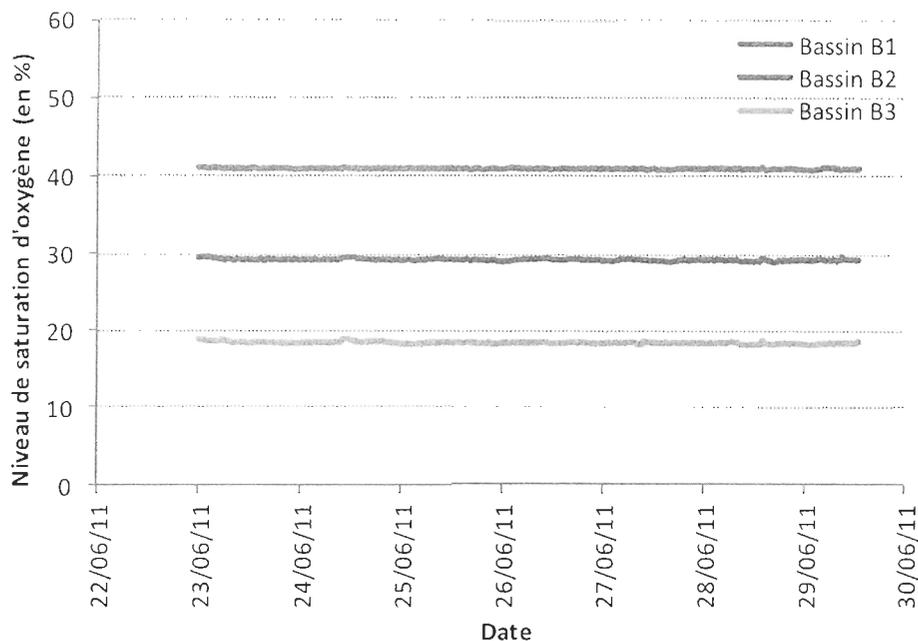


Figure 11 : Courbe de suivi d'oxygène dans les bassins en hypoxie lors de l'exposition d'une semaine des flétans du Groenland juvéniles à différents niveaux de saturation d'oxygène

À la fin de l'expérience, les crevettes nordiques et les flétans du Groenland ont été anesthésiés et sacrifiés de la même façon que pour l'expérience en hypoxie aigüe. Les mêmes tissus ont été échantillonnés et conservés pour la suite des analyses.

ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Les capacités métaboliques maximales ont été analysées en utilisant l'activité des différentes enzymes. La CS, la COX, la LDH, la PK, la PEPCK, la GPx, la Cat et la SOD ont été mesurées sur un échantillon de muscle et/ou d'hépatopancréas chez les crevettes nordiques et de muscle blanc et/ou de foie chez les flétans du Groenland. Pour les expériences en hypoxie aigüe, toutes les enzymes ont été mesurées dans le muscle des deux espèces. La PEPCK, la GPx et la SOD ont été aussi analysées dans le foie des flétans du Groenland ou l'hépatopancréas des crevettes nordiques. Pour les expériences d'exposition à long terme, la CS, la COX, la LDH et la PK ont été mesurées dans le muscle alors que la

PEPCK et la GPx ont été analysées dans le foie ou l'hépatopancréas. Les dosages de la Cat dans le foie ou l'hépatopancréas n'ont pu être mis en point avec la trousse d'analyse utilisée.

PRÉPARATION DES HOMOGÉNATS DE TISSU

Pour chaque individu, un échantillon de tissu a été pesé et homogénéisé sur glace à l'aide d'un sonicateur (sonicator ultrasonic processor XL2020, Heat Systems Inc.) dans 5 volumes de solution tampon phosphate saline (PBS, pH 7,5) contenant 0,1 % de Triton X-100 et 1 mM d'acide éthylène diamine-tétra-acétique (EDTA). Les homogénats ont ensuite été centrifugés 15 min à 4 °C à 1500 g. Le surnageant a été récupéré, divisé en huit aliquotes (une pour chaque analyse enzymatique) et conservé à -80 °C pour les analyses des différentes enzymes.

ANALYSES ENZYMATIQUES

Les échantillons étaient placés sur glace pour dégeler avant chaque analyses puis étaient analysés immédiatement.

L'activité de la CS (E.C.2.3.3.1) a été mesurée selon la méthode décrite par Childress et Somero (1979) et modifiée par Bailey *et al.* (2005). Les échantillons dilués ont été ajoutés dans un mélange contenant du tampon Trizma[®] hydrochloride à 100 mM (Tris-HCl ; pH 8 ; 25 °C), de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) à 0,2 mM et de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,1 mM. De l'oxaloacétate à 500 µM a été ajouté pour initier la réaction et la production d'acide 5-thiobenzoïque (NTB) a été observée à 412 nm. La mesure de l'activité de la COX (E.C.1.9.3.1) a été effectuée selon la méthode de Marie *et al.* (2006), adaptée à partir des recherches de Hand et Somero (1983). Le milieu réactionnel était composé de phosphate de sodium dibasique (HNa₂PO₄) à 50 mM (pH 7 ; 25 °C), de phosphate de sodium monobasique (NaH₂PO₄) à 50 mM (pH 7 ; 25 °C) et de

cytochrome c sous forme réduite à 30 μM . La réduction du cytochrome c était réalisée en ajoutant 0,25 M de dithionite diluée dans 50 mM de tampon phosphate (pH 7 ; 25 °C) à 2 M de cytochrome c. Une fois réduit, le cytochrome c est séparé de la dithionite sur une colonne de chromatographie (2 cm de diamètre) contenant un gel sephadex G-25 M (2,5 cm de hauteur). Le taux de réduction du cytochrome c est vérifié par spectrophotométrie en effectuant le rapport d'absorbance entre 550 et 565 nm. L'activité de la COX a été mesurée à 550 nm à partir de l'utilisation du ferrocyclochrome c. L'activité de la LDH (E.C.1.1.1.27) a été analysée selon la méthode de Childress et Somero (1979) modifiée par Bailey *et al.* (2005). Le milieu réactionnel était composé de tampon Tris-HCl à 80 mM (pH 7,5 ; 25 °C), de pyruvate de sodium à 2 mM, de β -nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) à 150 μM et de chlorure de potassium (KCl) à 100 mM. La diminution du NADH a été mesurée à 340 nm. L'activité de la PK (E.C.2.7.1.40) a été mesurée selon la méthode de Childress et Somero (1979) modifiée par Bailey *et al.* (2005). Le milieu réactionnel était composé de tampon Tris-HCl (pH 7,5 ; 4 °C) à 80 mM, de KCl à 100 mM, de sulfate de magnésium (MgSO_4) à 10 mM, de fructose biphosphate à 0,1 mM, de phosphoénolpyruvate (PEP) à 1 mM, d'adénosine 5'-diphosphate (ADP) à 5 mM, de NADH à 150 mM et de LDH à 20 U/mL (une unité enzymatique U = 1 μM de substrat transformée/min). La consommation de NADH a été mesurée à 340 nm. L'activité de la PEPCK (E.C.4.1.1.32) a été analysée selon la méthode de Petrescu *et al.* (1979) adaptée par Jamieson *et al.* (1999). Les échantillons dilués ont été ajoutés à une solution contenant du tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7,5 ; 25 °C), du manganèse (II) chlorure (MnCl_2) à 1 mM, du PEP à 1 mM, du NADH à 0,25 mM, de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) à 50 mM et 1,4 unité de malate déshydrogénase (MDH ; E.C.1.1.1.37). La réaction a été initiée en ajoutant 0,15 mM de déoxyguanosine-5'-diphosphate et la consommation de NADH a été mesurée à 340 nm. L'analyse de l'activité de la SOD (E.C.1.15.1.1) a été réalisée selon la méthode modifiée de Marie *et al.* (2006). La réduction de la cytochrome c à 2 μM a été mesurée à 550 nm, dans une solution composée de tampon phosphate à 50 mM (pH 7,8 ; 25 °C), d'EDTA à 1 mM et d'hypoxanthine à 5 mM. La réaction a été initiée par l'ajout de 0,2 U/mL de xanthine oxydase (E.C.1.1.3.22). L'activité de la GPX (E.C.1.11.1.9) a été réalisée selon la méthode

de Paglia et Valentine (1967) modifiée par Marie *et al.* (2006). Le milieu réactionnel était composé de tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7,6 ; 25 °C), d'EDTA à 1 mM, de β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) à 0,14 mM, de L-glutathion réduit (GSH) à 1 mM et d'une unité de glutathion réductase (E.C.1.8.1.7). La réaction a été initiée par l'ajout de 0,2 mM de t-butyl-hydroperoxyde et la consommation de NADPH a été mesurée à 340 nm. L'activité de la Cat a été déterminée à l'aide du kit *Amplex[®] Red Catalase* d'Invitrogen[™] (Burlington, Ontario, Canada).

Pour chaque analyse, dans les deux tissus, la concentration de l'homogénat a été ajustée pour que les données d'absorbance en fonction du temps (consommation du substrat ou accumulation du produit de réaction) représentent une pente linéaire sur la période la plus longue possible dans un intervalle de cinq minutes (figure 12). Ainsi, dans le muscle des crevettes, les échantillons pour les analyses de CS, COX, PEPCK et SOD ont été dilués 25 fois, ceux pour celles de LDH et de Cat, 100 fois et ceux pour celle de PK 500 fois. Dans l'hépatopancréas des crevettes, les échantillons pour les analyses de GPx et de SOD étaient respectivement dilués respectivement 50 et 100 fois. Chez les flétans du Groenland, les échantillons pour les analyses de CS ont été dilués 25 fois, ceux pour celles de LDH et de PK 500 fois, ceux pour celle de PEPCK cinq fois, ceux pour celle de Cat 2500 fois et ceux pour celle de SOD 1000 fois dans le muscle. Dans le foie, les échantillons pour les analyses de SOD ont été dilués 25 fois et ceux pour celles de PEPCK et de GPx cinq fois.

La concentration en protéines (concentration totale) a été déterminée dans les tissus de muscle et de foie en utilisant la méthode de Lowry modifiée par Peterson (1977) et adaptée pour microplaques 96 puits (200 μ L).

Toutes les analyses ont été réalisées à 4 °C en duplicatas techniques et en utilisant les méthodes standards adaptées pour un lecteur de microplaques (SpectraMass 190, Molecular devices, Sunnyvale, Californie, USA). Les coefficients d'extinction molaire utilisés pour les

calculs d'activité valaient respectivement 9245, 4928, 2160 et 2827 L/mol/cm pour le cytochrome c, le NTB, le NADPH et le NADH après correction pour microplaque.

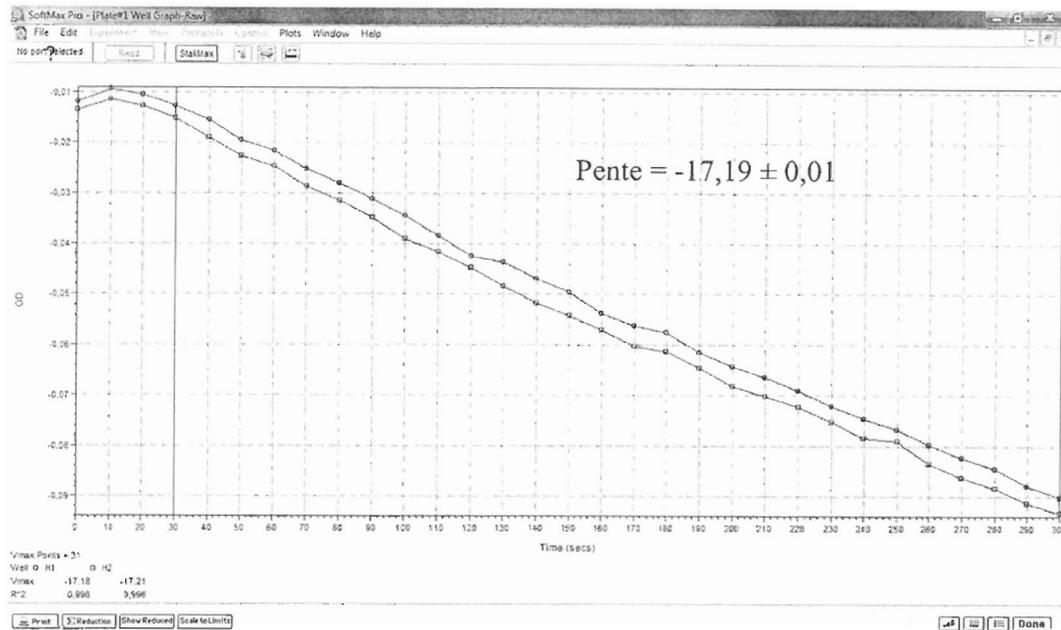


Figure 12 : Exemple de mesure d'absorbance sur 5 min à 340 nm représentant la consommation de NADH pour un individu (mesure dans deux puits de la microplaque = duplicatas)

EXPRESSION GÉNIQUE

Les analyses génomiques ont été réalisées uniquement chez les flétans du Groenland juvéniles.

EXTRACTION ET TRANSCRIPTION INVERSE

L'acide ribonucléique (ARN) des échantillons de foie a été extrait avec le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) et celui du muscle avec le kit RNeasy Fibrous Tissue Mini (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). Il a ensuite été quantifié à 260 nm avec le spectrophotomètre NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Québec, Canada), et sa pureté a été vérifiée en utilisant le ratio 260/280 nm qui indique que l'ARN est pur si sa

valeur est comprise entre 1,9 et 2,1. L'intégrité de l'ARN a été vérifiée sur un gel d'agarose (figure 13) à 2 % avec un marqueur au bromure d'ethidium à 500 µg/mL pour déterminer s'il y avait eu dégradation lors du stockage ou des analyses. L'ARN extrait a ensuite été immédiatement utilisé pour la transcription inverse (RT).

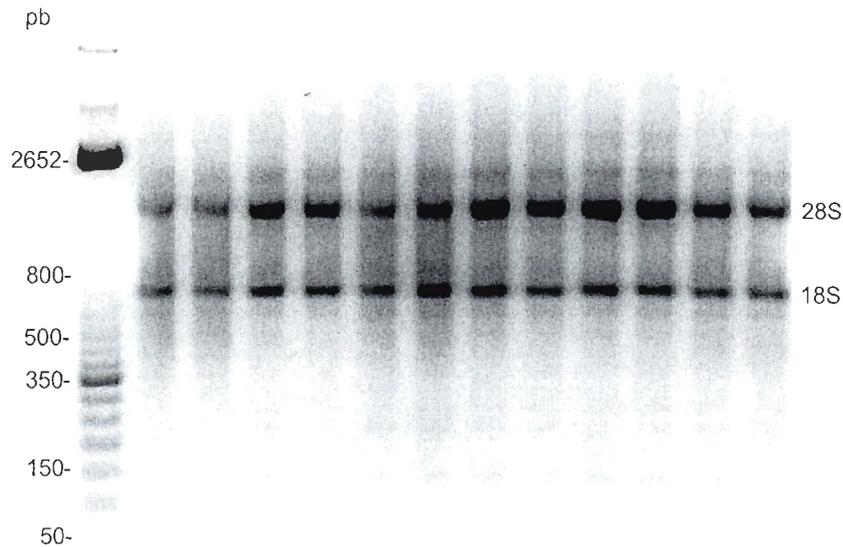


Figure 13 : Gel d'agarose à 2 % avec marquage au bromure d'ethidium (500 µg/mL) permettant de vérifier la qualité de l'ARN extrait des tissus (de gauche à droite, l'échelle moléculaire TrackIt 50 bp DNA ladder de chez Invitrogen et les échantillons extraits en duplicata) grâce à la présence des deux bandes, 28S et 18S

Les réactions de RT ont été réalisées en duplicata avec le kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). La réaction était réalisée en deux étapes. Pour la première, le mélange réactionnel était composé de 2 µL de tampon gDNA Wipeout 7×, de 7 µL d'eau sans RNase et de 1 µg d'ARN précédemment extrait. Ce mélange a été incubé 2 minutes à 42 °C. Pour la seconde étape, le mélange réactionnel contenait 1 µL de transcriptase Quantiscript RT, 4 µL de tampon Quantiscript RT 5× et 1 µL de mélange d'amorces a été ajouté au mélange de l'étape 1. Cette solution a été incubée 15 min à 42 °C et 3 min à 95 °C. La concentration et la pureté de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) ont été mesurées avec le spectrophotomètre

NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Québec, Canada). Les échantillons d'ADNc ont été séparés en aliquotes et conservés congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse de l'expression des différents gènes.

SÉQUENÇAGE

Pour obtenir des séquences partielles des différents gènes de référence (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase = GAPDH et 18S ribosomal = 18S) et des gènes d'intérêt (COX, CS, LDH, PK, PEPCK, Cat, GPx and SOD) chez le flétan du Groenland, des amorces ont été construites à partir de séquences de gènes disponibles sur le centre national d'informations en biotechnologie (NCBI) de GenBanq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences ont été choisies en fonction de leur homologie avec d'autres séquences de poissons et d'informations trouvées dans la littérature. Les amorces ont été dessinées en utilisant le logiciel Primer-Blast disponible sous NCBI et elles ont ensuite été synthétisées chez Integrated DNA Technologies™ (Coralville, IA, USA). Les amorces et le numéro de référence des séquences GenBanq utilisées sont notés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Amorces utilisées chez le flétan du Groenland et numéro de référence GenBanq des séquences utilisées pour les dessiner (sens de l'amorce : F = sens et R = anti sens)

Gène	Espèce	Numéro de référence	Amorces (5' → 3')
Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase 18S	<i>Danio rerio</i>	BC095386	F - CAACGGCGACACTCACTCCTC R - TCGCAGACACGGTTGCTGTAG
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	EF126037	F - GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC R - AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC
Citrate synthase	<i>Gadus morhua</i>	DQ059757.1	F - TCCCACCAACCTGCACCCCA R - ACGCAGGGCAGCTTGGCAAT
Cytochrome c oxydase	<i>Pleuronectes americanus</i>	EU752157.1	F - TCACTGCCGTCCTTCTTCTT R - GTTGGTAGAGGATGGGGTCA
Pyruvate kinase	<i>Scophthalmus maximus</i>	AF467775	F - CCATGCTGAGACCATCAAGA R - TTTCTGGTCCTTTGGTGTCC
Phosphoénolpyruvate carboxykinase	<i>Platichthys stellatus</i>	JF414418	F - ATGCAGAACCGCAAGGCCCC R - ACGCGGGCATTCTCGCCAAA
Lactate déshydrogénase	<i>Fundulus heteroclitus</i>	L43525.1	F - AACCTGGTGCAGCGCAACGT R - GTCCAGGTTGGTGCCGGAGC
Superoxyde dismutase	<i>P. olivaceus</i>	EF681883.1	F - TGGAGACAACACAAACGGG R - CATTGAGGGTGAGCATCTTG
Catalase	<i>P. olivaceus</i>	GQ229479.1	F - GCAGAGGTGGAGCAGCTGGC R - GCTCCCAGCCGATGTCGGTG
Glutathion peroxydase	<i>P. olivaceus</i>	EU095498.1	F - TGAACGAGCTGCACTCTCGGT R - AGGGGTGCGCATCCTTCCCA

Les séquences de chaque gène ont été amplifiées par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant le kit AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA). Toutes les réactions PCR étaient des réactions de 25 μ L contenant 0,9 μ M d'échantillon d'acide désoxyribonucléique (ADN), 1 μ M de chaque amorce sens et anti-sens, 12,5 μ L de mix AmpliTaq Gold[®] 360 Master et la quantité appropriée de 360 GC Enhancer et d'eau de qualité PCR en fonction de leur pourcentage de GC. Ces solutions ont été incubées dans une machine PCR (Bio-Rad, MyiQ-icycler-Real time PCR) suivant le protocole pour un cycle de 10 min à 95 °C, suivi de 40 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C et 1 min à 72 °C, avec un cycle final de 7 min à 72 °C. Un contrôle négatif a été réalisé pour chaque couple d'amorces en remplaçant l'échantillon d'ADN par de l'eau stérile. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2 % avec marqueur au bromure d'ethidium à 500 μ g/mL (figure 14). Les produits atteignant la taille désirée ont été purifiés sur colonne avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada), clonés et séquencés ou directement séquencés.

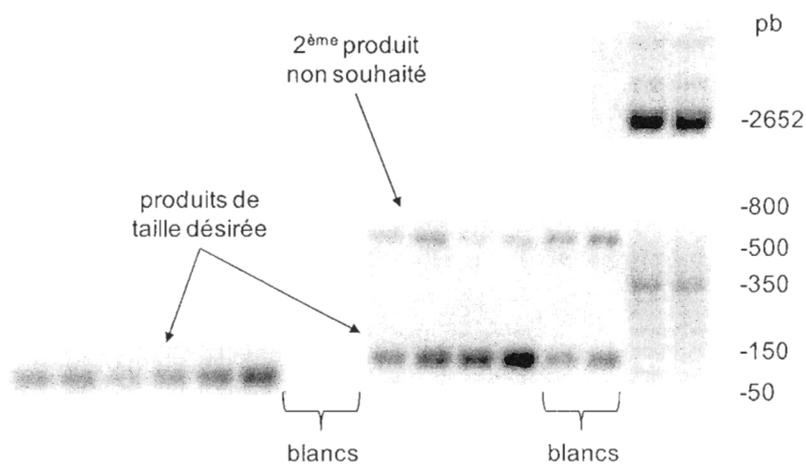


Figure 14 : Gel d'agarose à 2 % avec marquage au bromure d'ethidium (500 μ g/mL) permettant de vérifier la longueur des produits amplifiés. De droite à gauche : l'échelle moléculaire TrackIt 50 bp DNA ladder de chez Invitrogen et pour chaque échantillon, les blancs et les produits amplifiés dans trois différents tissus, en duplicata. Pour l'échantillon de droite, il y a une contamination des blancs et un 2^{ème} produit amplifié qui ne fait pas la longueur désirée. Pour l'échantillon de gauche, il n'y a pas de contamination et le produit mesure environ 100 paires de bases, ce qui est la longueur attendue

Pour l'étape de clonage, la ligature et la transformation ont été réalisées respectivement avec les kits TOPO TA Cloning Kit for sequencing et One Shot Chemically competent *Escherichia coli* chez InvitrogenTM (Burlington, Ontario, Canada). L'ADN bactérien a été extrait avec le kit EZNA Plasmid Mini d'Omega Bio-Tek Inc. (Norcross, GA). Cet ADN a été amplifié suivant une réaction PCR classique réalisée avec le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing d'Applied Biosystems (Foster city, CA). Les nucléotides ont été isolés avec le kit Ultra-Step Dye Terminator Removal, Easy Nucleic Isolation, Ezna, d'Omega Bio-Tek Inc. (Norcross, GA) et ensuite séquencés dans le séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems-Hitachi, Foster city, CA). Les séquences obtenues (tableau 4) ont été alignées avec les séquences disponibles sous NCBI pour vérifier qu'il s'agissait bien des séquences attendues.

PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL

Les gènes d'intérêt (CS, COX, LDH, PK, PEPCK, SOD, Cat et GPx) et ceux de référence (GAPDH et 18S) ont été quantifiés par réaction de PCR en temps réel en utilisant l'ensemble des réactifs TaqMan[®] et le système de PCR en temps réel 7900HT (Applied Biosystems, Foster city, CA). Les produits d'ADNc précédemment séquencés chez le flétan du Groenland juvénile ont été utilisés pour dessiner les amorces et la sonde TaqMan[®] avec le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA). Les séquences de ces amorces et sondes sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Amorces et sonde TaqMan[®] dessinées avec le logiciel Primer Express et utilisées pour la PCR quantitative en temps réel

Gène	Séquence	Amorces (5'→3')	Sonde (5'→3')
18S	GCCCTTGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGG GCTGCACGCGCGCCACACTGACTGGATCGGCGT GTGTCTACCCTTCGCCGAGAGGGCGCGGGTAACC CGCTGAACCCCACTA	F - CCTTGGTCTGTGATGCC TT R - TCTCGGCGAAGGGTAGAC AC	CCCACTG ACTGGATC
Glycéraldéhyde 3- phosphate déshydrogénase	TCGCAGACACGGTTGCTGTAGGCAAACCTCATTG TCGTACCATGAGACCAGCTTGACAAAGTGGTCA TTGAGGGCGATGCCAGCGCCAGCATCAAAGAT GGAGGAGTGAGTGTCGCCGTTGA	F - GCTGTAGGCAAACCTCATT GTCGTA R - ATCGCCCTCAATGACCAC TT	CATGAGAC CAGCTTGA
Citrate synthase	TTCCACCAACCTGCACCCCATGTCTCAGTTCA GTGCTGCCATCACAGCTCTGAACAGCGAGAGC GGCTTTGCACGGGCTTACTCTGAGGGCGTCCAC AAGACCAAGTACTGGGAGTTTGTCTATGAAGAC TCCATGGACTTGATTGCCAAGCTGCCCTGCGTA	F - GCACCCCATGTCTCAGTT CA R - GCCGCTCTCGCTGTTTCAG	TGCTGCCA TCACAGC
Cytochrome c oxydase	GCCGTCTTCTTCTTCTGTCCCTTCCCGTCTTAG CCGCAGGGATTACAATGCTACTAACAGACCGC AACCTCAACACAACCTTTTTTGACCCCGCCGGA GGTGGTGACCCCATCCTCTACCAACA	F - TCTGTCCCTTCCCGTCTTA GC R - GTGTTGAGGTTGCGGTCT GTT	CAGGGATT ACAATGCT AC
Lactate déshydrogénase	TAACCTGGTGCAGCGCAACGTCAACATTTTCAA GTTTCATCATCCCCAACATCGTCAAGTACAGCCC CAACTGCATCCTGATGGTGGTCTCCAACCCAGT GGACATCCTGACCTACGTGGCCTGGAAGCTGAG	F - CAAGTACAGCCCCAACTG CAT R -	CTGATGGT GGTCTCC

Pyruvate kinase	TGGCTTCCCCCGTCACCGCGTCATTGGCTCCGG CACCAACCTGGACA TCCATGCTGAGACCATCAAGAATGTCCGCGAGG CAGCCGAGAGCTTCGGTGCAGGATCTGTTGATT ACAGACCACTGGCCGTCGCTCTGGACACCAAA GGACCAGAAAA	GGCCACGTAGGTCAGGAT GT F - TCCGCGAG TCCATGCTGAGACCATCA GCAGC AGAA R - ACAGATCCTGCACCGAAG CT	
Phosphoénolpyruvate carboxykinase	TAATGAAGAACCGCAAGGCCCCCACTCAGCTG CCCAAGATCTTCCACGTCAACTGGT/CAGAAAG AACCCAGCGGATCTTTCCTCTGGCCCGGCTTT GGCGAGAATGCCCGCGTG	F - TTCCACGTC CCACTCAGCTGCCCAAGA AACTGGT TC R - ATCCGCTGGGGTTCTTTCT G	
Catalase	CCGATGTCGGTGTGTGTCTGGGTAAGAGAAGAG ACGACCCTGCAGCATCTTGTCTGGGGCTTGCTTC AATGCCTGGTGGCATGTTACTGGGGTCTGAAGGC CAGCTTCTCCACCTCTGACA	F - AGAAGAGA TGTCGGTGTGTGTCTGGG CGACCCTG TAA C R - GCAAGCCCCGACAAGATG	
Glutathion peroxydase	TGCTACTTTGGTTCTGAGCCATTTCCAGGCCGG AATACTTTAGACAATTCAGGATTTCTTCATTCTT GCAGTTCTCCTGATGTCCAAACTGATTGCAGGG AACACCCAGAACAACGAGACCCTTGGAGGAAT ACCGAGAGTGCAGCTCGTTCAA	F - CTGATTGC TTGCAGTTCTCCTGATGTC AGGGAACA CAA R - TCCAAGGGTCTCGTTGTT CTG	
Superoxyde dismutase	GGAGACAACACAAACGGGTTTCATGAGTGCAGG ACTTCACTTCAATCTCCACAGCAAGAGTCATGC TGGTCCACTGATGCAGACAGGCACATTGGAGA CCTGGGGAATGTGACTGCTGGAGCAGATAATGT TGCTGAGATAAACATCTCTGACAAGATGCTCAC CCTCAATGA	F - ACAGGCAC CATGCTGGTCCCTACTGAT ATTGGAG GCA R - TGCTCCAGCAGTCACATT CC	

En fonction de leur activité différentielle dans chacun des tissus, les gènes de CS, COX, LDH et PK ont été analysés dans le muscle et ceux de PEPCK, Cat, SOD et GPx dans le foie. Les gènes de références GAPDH et 18S ont été analysés dans les deux tissus. Les réactions de PCR quantitatif en temps réel ont été réalisées suivant le protocole du fabricant en utilisant le mélange TaqMan[®] Fast Advanced PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA). Le milieu de réaction contenait 18 µM de chaque amorce (sens et anti-sens), 5 µM de la sonde TaqMan[®], 5 µL de solution TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2×) et 50 ng d'échantillon d'ADNc, pour un volume total de 10 µL. Le programme thermal était composé d'un cycle de 2 min à 50 °C puis de 20 s à 95 °C, suivi par 40 cycles d'une seconde à 95 °C et de 20 s à 60 °C. Chaque échantillon a été analysé en triplicatas techniques et normalisé par rapport aux gènes de référence. Une fois le programme de PCR en temps réel terminé, les données ont été analysées avec les logiciels SDS 2.4 et Expression Suite 1.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA). La méthode $\Delta\Delta C_t$ de comparaison des cycles seuil (C_t) a été utilisée pour déterminer les quantités relatives de chacun des gènes suite à l'exposition à une hypoxie aigüe suivant la formule (Livak et Schmittgen, 2001) :

$$\text{quantité relative} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

où $\Delta\Delta C_t$ est la différence entre le ΔC_t de l'échantillon et celui du groupe de calibration. ΔC_t est la différence entre le C_t du gène cible et celui du gène de référence. La valeur 2 est utilisée parce que l'efficacité de la réaction a été vérifiée à 100 % par PCR quantitative (Bio-Rad, MyiQ-icycler-Real time PCR) avec la chimie du SYBR Green[®]. Cette efficacité a été vérifiée en faisant une dilution en série (de 100 ng à 10 pg) de l'ARN extrait des tissus et en faisant l'étape de la RT sur ces dilutions. Ensuite, une PCR quantitative a été réalisée avec des amorces pour les gènes cibles et de références dans chacun des tissus pour vérifier si la pente de la courbe standard était de -3,3 (figure 15).

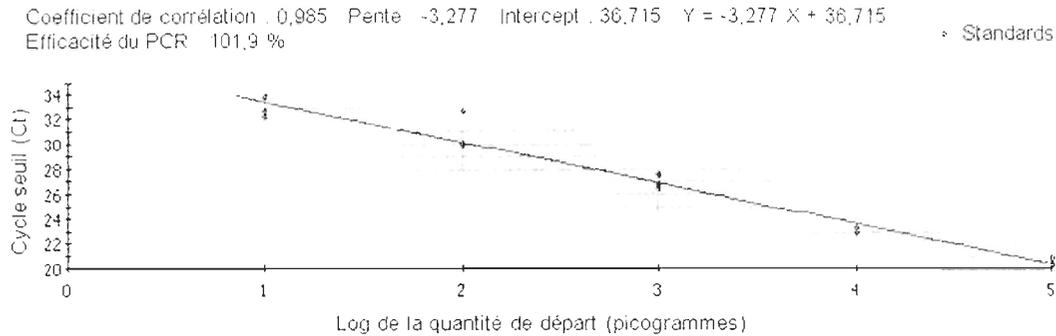


Figure 15 : Exemple de courbe standard de PCR de la GAPDH dans le foie permettant de vérifier l'efficacité de la RT à 100 %

TESTS STATISTIQUES

Chez les crevettes, les sexes ont été analysés séparément, car le nombre d'individus, ainsi que l'éventail de tailles, étaient trop restreints pour pouvoir faire des corrections allométriques. Chez les flétans, le sexe n'a pas été pris en compte et les analyses ont été réalisées séparément pour les stades juvénile et adulte, encore une fois à cause du nombre d'individus restreint qui a empêché de déterminer un facteur de correction pour la taille.

Pour les résultats des analyses enzymatiques du chapitre 1, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Pour les données de SOD dans l'hépatopancréas et de PEPCCK dans le muscle des crevettes lors cette expérience en hypoxie aigüe, la distribution des données n'étaient pas normale et une transformation log a été utilisée pour obtenir une distribution normale. Par la suite, des tests t de Student ont été utilisés pour vérifier l'effet de l'hypoxie aigüe sur l'activité enzymatique chez les crevettes nordiques femelles et mâles pour chacun des tissus. Une corrélation de Pearson (voir annexes I) a été réalisée entre activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) et activité spécifique (U/mg de protéine). Comme ces deux variables étaient significativement corrélées pour toutes les enzymes, seule l'activité totale est présentée dans ce travail. Les activités spécifiques ont présentées à l'annexe V. Pour l'activité de la CS chez les crevettes

femelles l'activité spécifique est également présentée car le niveau d'oxygène avait un effet significatif sur l'activité spécifique mais pas sur l'activité totale. Pour ces analyses, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Pour les données de PEPCCK dans le muscle et de SOD dans l'hépatopancréas des crevettes dans cette expérience, une transformation log des données a été nécessaire pour obtenir la normalité. Finalement, pour les données de Cat dans le muscle, aucune transformation ne permettait d'obtenir une distribution normale des données, une corrélation de Spearman a donc été utilisée.

Pour les résultats des analyses enzymatiques du chapitre 2, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Pour les données de SOD dans l'hépatopancréas des crevettes lors cette expérience en hypoxie chronique, la distribution des données n'étaient pas normale et une transformation log a été utilisée pour obtenir une distribution normale. Des ANOVAs à un facteur ont ensuite permis de vérifier l'effet des trois niveaux d'hypoxie chronique par rapport à la normoxie sur l'activité des différentes enzymes dans chacun des tissus des crevettes nordiques femelles et mâles. Lorsqu'un effet été démontré, un test a posteriori de Tukey a été réalisé. En cas d'hétérogénéité des variances (uniquement pour les données de LDH dans le muscle des crevettes lors de cette expérience) et lorsque qu'aucune transformation des données ne permettait de résoudre, les comparaisons de moyennes ont été effectuées par un LSD de Fisher sur les rangs (Quinn et Keough, 2002). Une corrélation de Pearson (voir annexe II) a été réalisée entre activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) et activité spécifique (U/mg de protéine).

Comme ces deux variables étaient significativement corrélées pour toutes les enzymes, seule l'activité totale est présentée dans ce travail. Les activités spécifiques sont présentées à l'annexe VI. Pour ces analyses, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque cette normalité n'était pas vérifiée,

une transformation log a été utilisée sur les données (données de COX et de LDH dans le muscle des crevettes exposées à l'hypoxie chronique).

Pour les résultats des analyses enzymatiques du chapitre 3, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Par la suite, des tests t de Student ont été utilisés pour vérifier l'effet de l'hypoxie aiguë sur l'activité enzymatique chez les flétans du Groenland adultes et juvéniles pour chacun des tissus. Une corrélation de Pearson (voir annexe III) a été réalisée entre activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) et activité spécifique (U/mg de protéine). Comme ces deux variables étaient significativement corrélées pour toutes les enzymes, seule l'activité totale est présentée dans ce travail. Les activités spécifiques ont présentées à l'annexe VII. Pour ces analyses, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque cette normalité n'était pas vérifiée, une transformation log a été utilisée sur les données (données de LDH et SOD dans le muscle des flétans du Groenland exposés à une hypoxie aiguë).

Pour les résultats des analyses enzymatiques du chapitre 4, la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Des ANOVAs à un facteur ont ensuite permis de vérifier l'effet des trois niveaux d'hypoxie chronique par rapport à la normoxie sur l'activité des différentes enzymes dans chacun des tissus des flétans du Groenland juvéniles. Lorsqu'un effet était démontré, un test a posteriori de Tukey a été réalisé. Une corrélation de Pearson (voir annexe IV) a été réalisée entre activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) et activité spécifique (U/mg de protéine). Comme ces deux variables étaient significativement corrélées pour toutes les enzymes, seule l'activité totale est présentée dans ce travail. Les activités spécifiques ont présentées à l'annexe VIII. Lorsque le niveau d'oxygène avait un effet significatif sur l'activité spécifique mais pas sur l'activité totale, l'activité spécifique est également présentée (uniquement pour l'activité de la CS chez les flétans du Groenland juvéniles exposés à l'hypoxie chronique). Pour ces analyses,

la normalité de la distribution des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Pour les données de LDH dans le muscle et de SOD dans le foie des flétans juvéniles de cette expérience, transformation log a été nécessaire pour obtenir la normalité des données.

Concernant les données d'expression génique chez les flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe et chronique (chapitre 3 et 4), elles ont été traitées par la méthode de Livak et Schmittgen (2001), décrite précédemment. Comme il est nécessaire de normaliser les données par rapport à un ou plusieurs gènes de références (Bustin *et al.*, 2009 ; Nikinmaa et Rytönen, 2011), 18S et GAPDH ont été utilisés comme gènes de référence. Leur stabilité par rapport à l'effet de l'oxygène a été vérifiée au préalable par des tests t de Student pour les données en hypoxie aigüe et par des ANOVAs à un facteur pour l'expérience en hypoxie chronique. Le groupe témoin, qui est resté en normoxie, a été utilisé comme groupe de calibration. Les valeurs de quantité relative ont ensuite été comparées avec des tests t de Student pour l'expérience en hypoxie aigüe et par des ANOVAs à un facteur pour l'expérience en hypoxie chronique, pour tester l'effet de l'hypoxie sur l'expression génique chez les juvéniles flétans du Groenland, de la même manière que les données d'activité enzymatique.

CHAPITRE 1

IMPACTS DE L'HYPOXIE AIGÛE SUR LE MÉTABOLISME DE LA CREVETTE NORDIQUE *PANDALUS BOREALIS*

1.1 RÉSULTATS

Le chapitre 1 porte sur les résultats obtenus chez la crevette nordique en réponse à un stress hypoxique aigu. Il est important de préciser que les femelles et les mâles ont été analysés séparément à cause de leur taille différente (la crevette est une espèce protandre, donc les mâles deviennent des femelles après quelques années) et de mon incapacité à faire des corrections allométriques suite au petit nombre d'individus utilisés et au faible éventail de taille. De plus, tel qu'expliqué dans la partie "Matériel et méthodes", les résultats d'activité totale et d'activité spécifique étant corrélés, seule l'activité totale est présentée dans ce chapitre (sauf pour l'activité de la CS chez les crevettes nordiques femelles où l'oxygène a un effet significatif sur l'activité spécifique et non sur l'activité totale malgré la corrélation positive entre les mesures d'activités). Les résultats d'activité spécifique sont présentés à l'annexe V.

1.1.1 CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES FEMELLES

Chez les crevettes femelles exposées à une hypoxie aigüe, j'ai observé une diminution significative de l'activité enzymatique totale pour la majorité des enzymes mesurées. Toutefois, les concentrations en protéines, que ce soit dans le muscle ou dans l'hépatopancréas, étaient similaires chez le groupe exposé à une hypoxie aigüe et chez le groupe témoin (100 % sat.) (tableau 5).

Tableau 5 : Concentration tissulaire en protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type ; n = 13 pour les témoins et n = 10 pour les individus exposés à une hypoxie aigüe)

Tissu	Normoxie	Hypoxie aigüe
muscle	174,7 \pm 9,9	209,1 \pm 16,3
hépatopancréas	185,2 \pm 6,6	219,7 \pm 9,4

1.1.1.1 Métabolisme aérobie

Les analyses de l'activité des enzymes du métabolisme aérobie ont été réalisées dans le muscle. Pour les deux enzymes impliquées dans des processus du métabolisme aérobie (CS et COX), les activités étaient plutôt faibles dans le muscle des crevettes témoins en normoxie. De plus, l'activité spécifique de la CS a diminué de 33,3 % lorsque les femelles étaient exposées à une hypoxie aigüe (figure 16 ; $F_{[1,21]} = 1,5$; $p = 0,02$). Par contre, je n'ai pas observé de différence significative pour l'activité totale de la CS, ni pour celle de la COX (tableau 6). Ceci est peut-être dû à la forte variabilité interindividuelle qui a été enregistrée lors des analyses enzymatiques.

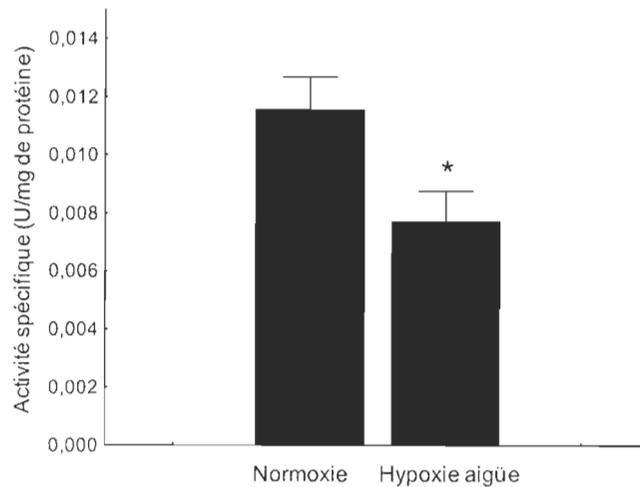


Figure 16 : Activité spécifique de citrate synthase dans le muscle des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type, $n_{\text{témoins}} = 13$ et $n_{\text{hypoxie aigüe}} = 10$). La présence d'astérisque indique une différence significative entre individus des deux groupes (* $p < 0,05$)

Tableau 6 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type). Chez les témoins, n = 13 sauf pour l'activité de la Cat où n = 12 et en hypoxie aigüe, n = 10 sauf pour la Cat où n = 8. La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05)

Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Citrate synthase	1,9 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2
Cytochrome c oxydase	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,2
Lactate déshydrogénase	21,2 \pm 0,8	15,7 \pm 2,6*
Pyruvate kinase	53,9 \pm 7	33,2 \pm 6,1*
Phosphoénolpyruvate carboxykinase	1,6 \pm 0,6	0,70 \pm 0,1*
Catalase	245,8 \pm 48,6	246,2 \pm 58,3
Superoxyde dismutase	172,9 \pm 50,1	116,4 \pm 31,5

1.1.1.2 Métabolisme anaérobie

Les analyses de l'activité des enzymes glycolytiques LDH et PK ont été réalisées dans le muscle et celles de la PEPCK, enzyme de la néoglucogenèse, dans l'hépatopancréas. L'activité totale des enzymes impliquées dans les processus de fermentation (LDH) et de glycolyse (PK) avait des niveaux relativement élevés alors que celle impliquée dans la néoglucogenèse (PEPCK) avait un niveau plutôt faible. L'activité de toutes ces enzymes a diminué dans le muscle lors d'une exposition des femelles à l'hypoxie aigüe. L'activité totale (tableau 6) de la LDH a diminué de 26,1 % ($F_{[1,21]} = 9,2$; p = 0,04), celle de la PK de 38,4 % ($F_{[1,21]} = 1,7$; p = 0,04) et celle de la PEPCK de 56,6 % ($F_{[1,21]} = 3,5$; p = 0,05) en hypoxie. Je n'ai pu déceler aucune activité de la PEPCK dans l'hépatopancréas des crevettes.

1.1.1.3 Enzymes antioxydantes

Les analyses de l'activité des enzymes antioxydantes ont été réalisées dans le muscle et dans l'hépatopancréas. Dans l'hépatopancréas, les résultats enzymatiques indiquaient une diminution d'activité totale de 61,6 % de la SOD chez les femelles exposées à une hypoxie aigüe (tableau 7 ; $F_{[1,21]} = 5,8$; p = 0,01). Par contre, il n'y a eu aucune variation de l'activité

totale de la GPx en fonction du taux de saturation d'oxygène du milieu. Dans le muscle, je n'ai pas observé de différences dans l'activité des enzymes reliées à l'activité antioxydante entre témoins et femelles exposées à une hypoxie aigüe. Ainsi les niveaux d'activité totale (tableau 6) étaient similaires pour la Cat et pour la SOD dans le muscle entre le groupe témoin et celui exposé à l'hypoxie aigüe. Je n'ai pu déceler aucune activité de la GPx dans le muscle des crevettes.

Tableau 7 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type ; n = 13 pour les témoins et n = 10 pour les individus exposés à une hypoxie aigüe). La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05)

Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Glutathion peroxydase	2,4 \pm 0,6	2,9 \pm 0,5
Superoxyde dismutase	11665 \pm 2190	4485 \pm 1033*

1.1.2 CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES MÂLES

1.1.2.1 Protéines

Chez les mâles, les résultats ont été quelque peu différents de ce qui a été observé chez les femelles sauf pour les concentrations en protéines, que ce soit dans le muscle ou dans l'hépatopancréas, qui étaient similaires chez le groupe exposé à une hypoxie aigüe et chez celui exposé à 100 % sat. (tableau 8).

Tableau 8 : Concentration tissulaire en protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type ; n = 10 pour les témoins et n = 14 pour les individus exposés à une hypoxie aigüe)

Tissu	Normoxie	Hypoxie aigüe
muscle	235,2 \pm 12	181,9 \pm 11,3
hépatopancréas	167,5 \pm 4,4	172,9 \pm 4,7

1.1.2.2 Métabolisme aérobie

Dans le muscle des crevettes mâles, l'activité totale des enzymes du métabolisme aérobie (CS et COX) était similaire chez le groupe exposé à l'hypoxie aigüe et le groupe témoin (tableau 9).

Tableau 9 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type). Chez les témoins, n = 10 sauf pour la Cat où n = 8 et en hypoxie aigüe, n = 14 sauf pour la Cat où n = 12. La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (** p < 0,01 et *** p < 0,001)

Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Citrate synthase	2,6 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2
Cytochrome c oxydase	0,2 \pm 0,02	0,2 \pm 0,02
Lactate déshydrogénase	17,2 \pm 0,9	15,8 \pm 1,4
Pyruvate kinase	66,3 \pm 5,9	68,8 \pm 8,3
Phosphoénolpyruvate carboxykinase	1,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1**
Catalase	150,8 \pm 30,3	180,9 \pm 37
Superoxyde dismutase	226,1 \pm 35,4	68,4 \pm 14,4***

1.1.2.3 Métabolisme anaérobie

Chez les enzymes glycolytiques, seule l'activité de la PEPCCK a varié dans le muscle lors d'une exposition à une hypoxie aigüe. Son activité totale a diminué de 51,5 % chez les individus exposés à l'hypoxie (tableau 9 ; $F_{[1,21]} = 3,2$; p = 0,006). Dans le muscle, l'activité totale des autres enzymes glycolytiques (LDH et PK) ne montrait pas de différences significatives entre le groupe exposé à l'hypoxie aigüe et le groupe témoin (tableau 9).

1.1.2.4 Enzymes antioxydantes

Finalement, les enzymes antioxydantes chez les mâles ont, comme chez les femelles, été analysées dans le muscle (tableau 9) et dans l'hépatopancréas (tableau 10). Dans le muscle, parmi les enzymes antioxydantes, seule l'activité totale de la SOD a diminué

significativement (tableau 9). Cette activité a diminué de 69,8 % entre les individus témoins et ceux exposés à une hypoxie aigüe ($F_{[1,22]} = 4,3$; $p < 0,001$). L'activité totale de la Cat était quant à elle similaire entre les deux groupes dans le muscle (tableau 9). Dans l'hépatopancréas, les deux enzymes qui ont été analysées avaient des activités totales qui variaient lors de l'exposition à une hypoxie aigüe (tableau 10). Pour la GPx, une forte augmentation d'activité totale de 400 % a été observée entre les individus témoins et ceux exposés à une hypoxie aigüe ($F_{[1,22]} = 2,5$; $p < 0,001$). Pour la SOD, les niveaux d'activités étaient très importants dans l'hépatopancréas. Comme les femelles précédemment, il y a eu une forte diminution de l'activité de la SOD suite à l'exposition à une hypoxie aigüe. L'activité totale a diminué de 52,3 % entre les individus témoins et ceux exposés à l'hypoxie aigüe ($F_{[1,21]} = 1,9$; $p = 0,007$).

Tableau 10 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à une hypoxie aigüe ou restées en normoxie (moyenne \pm erreur type ; $n = 10$ pour les témoins et $n = 14$ pour les individus exposés à une hypoxie aigüe). La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$)

Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Glutathion peroxydase	0,7 \pm 0,3	3,5 \pm 0,4***
Superoxyde dismutase	10467 \pm 1738	4997 \pm 4762**

1.2 DISCUSSION

Lors d'une exposition à l'hypoxie, l'organisme cherche au départ à maximiser l'apport en oxygène aux organes vitaux en augmentant le rythme cardiaque, le rythme et le taux de ventilation (Czyzyk-Krzeska, 1997 ; McMahon, 2001 ; Wu, 2002). Quand l'organisme n'est plus capable d'apporter l'énergie nécessaire par la voie aérobie, le métabolisme anaérobie, par la voie de la fermentation, prend une place progressivement plus importante. Ceci permet de produire de l'énergie sans utiliser d'oxygène, mais la quantité d'énergie produite est beaucoup plus faible et il y a une accumulation de produits métaboliques potentiellement toxiques. En même temps, l'organisme cherche à limiter ses dépenses d'énergie pour prolonger son temps de survie (Czyzyk-Krzeska, 1997 ; McMahon, 2001 ; Wu, 2002). Le seuil d' O_{2crit} utilisé dans cette étude est défini comme le niveau d'oxygène auquel l'organisme n'est plus capable de soutenir son SMR, c'est-à-dire le métabolisme minimum pour soutenir ses fonctions vitales (Wang *et al.*, 2009). J'ai émis l'hypothèse que les organismes exposés à une hypoxie aigüe diminueraient l'activité des enzymes du métabolisme aérobie pour augmenter plutôt celles de leur métabolisme anaérobie. La seconde hypothèse était qu'il y aurait une baisse de la production de ROS suite à une diminution de l'utilisation de la chaîne respiratoire et donc que les niveaux de défenses antioxydantes allaient diminuer. Mes résultats vont à l'encontre de l'hypothèse de départ qui supposait que, bien que le métabolisme anaérobie se mette en place de façon plus importante sous le seuil d' O_{2crit} , l'activité des enzymes régulant les voies anaérobie n'est pas plus importante. Par contre, concernant les défenses antioxydantes, l'hypothèse de départ comme quoi les niveaux de défenses vont répondre en fonction de la production de ROS (et donc du taux métabolique aérobie), est supportée.

Au cours de cette expérience, compte tenu de la façon dont O_{2crit} est estimée, les crevettes nordiques ont été exposées à des teneurs en oxygène inférieures à O_{2crit} pendant environ une heure. Dans le muscle de la crevette nordique, cette exposition aigüe à l'hypoxie n'entraîne pas ou peu de variations de l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme aérobie, ce qui est plutôt surprenant étant donné que les crevettes étaient sous

le seuil d' O_{2crit} et que leur consommation d'oxygène avait diminué (figure 10). Seule l'activité spécifique de la CS dans le muscle des femelles crevettes est plus faible chez les individus exposés à l'hypoxie aigüe que chez les témoins. Ceci signifie que ce n'est pas le nombre de molécules qui est plus faible, mais bien l'activité de la molécule elle-même. La capacité aérobie de l'organisme serait donc plus faible en hypoxie aigüe. Cependant, la COX, qui intervient au niveau de la chaîne respiratoire, reste à des niveaux d'activité plutôt faibles, que ce soit en normoxie ou en hypoxie aigüe. Chez les mâles, aucune réponse n'est enregistrée pour les enzymes du métabolisme aérobie. Leur capacité aérobie semble donc se maintenir en hypoxie aigüe. De plus, les deux enzymes COX et CS ne sont pas co-régulées, comme c'est le cas chez le ver de source hydrothermale *Paralvinella grasslei* (Marie *et al.*, 2006). Ceci suggère que ce n'est donc pas uniquement la densité mitochondriale qui régule la capacité oxydative du tissu. Les faibles variations d'activité des enzymes du métabolisme aérobie de cette étude sont donc plutôt surprenantes, car une diminution de la capacité aérobie en hypoxie a été démontrée chez plusieurs autres espèces, telles que le ver de sources hydrothermale *P. grasslei* (Marie *et al.*, 2006) ou le crabe vert *Carcinus maenas* (Burke, 1979) exposés respectivement à environ 4 % sat. (= 12,8 $\mu\text{mol O}_2/\text{L}$) et à 6,5 % sat. (= 10 Torr). La diminution de la capacité aérobie observée chez ces espèces est expliquée par une baisse de la consommation d'oxygène en hypoxie résultant d'une limitation de la consommation d'oxygène des mitochondries et d'une diminution métabolique importante dans le muscle (Abele-Oeschger *et al.*, 1997). Mes résultats sont en contradiction avec mon hypothèse de départ suggérant que l'hypoxie aigüe allait entraîner une limitation de l'activité des enzymes du métabolisme aérobie chez les crevettes nordiques. Mes résultats semblent plutôt indiquer que la capacité aérobie des femelles ne diminue que peu. Chez les mâles, aucune diminution n'étant enregistrée, on peut penser que ces derniers n'ont pas encore atteint un seuil d'oxygène où leur capacité aérobie est affectée. Une autre explication pourrait être que le temps de réponse physiologique face à cette chute d'oxygène est trop lent chez cette espèce pour être observé dans mes conditions expérimentales. Les crevettes diminueraient immédiatement leur consommation d'oxygène, comme cela a été enregistré en respirométrie, mais l'ajustement de la capacité aérobie serait

enregistré un peu plus tard. Les activités enzymatiques enregistrées ici seraient en partie fonction de l'activité des enzymes déjà présentes dans l'organisme.

Chez les crevettes nordiques, il y a une baisse d'activité pour toutes les enzymes intervenant dans le métabolisme anaérobie et qui répondent à l'exposition à une hypoxie aigüe, ce qui vient encore une fois à l'encontre de mon hypothèse de départ. Les activités des enzymes glycolytiques et de la fermentation diminuent avec l'exposition à une hypoxie aigüe dans le muscle des crevettes nordiques femelles. Par contre chez les mâles, seule l'activité de la PEPCK diminue, les autres activités restent identiques à celles enregistrées en normoxie. Plusieurs études ont mesuré les niveaux d'activité de LDH dans le muscle de différentes espèces d'invertébrés et de fortes variations sont observées (tableau 11).

Tableau 11 : Activité de lactate déshydrogénase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces (d'après les études de Hammen, 1969 et de Zammit et Newsholme, 1976)

Groupe	Nom commun	Nom latin	Activité maximale
Mollusque	Palourde américaine	<i>Mercenaria mercenaria</i>	0,19
Mollusques	Patelle commune	<i>Patella vulgata</i>	1,4
Échinodermes	Oursin globuleux	<i>Echinus esculentus</i>	2,4
Crustacés	Crabe jonah	<i>Cancer borealis</i>	0,27
Crustacés	Crevette	<i>Crangon allmanni</i>	9,6
Crustacés	Crabe marbré	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	75,2
Crustacés	Crabe dormeur	<i>Cancer pagurus</i>	77

Dans mon étude, les valeurs d'activités dans le muscle des crevettes nordiques en normoxie sont élevées par rapport aux valeurs mesurées chez d'autres invertébrés et à peine plus faibles que celle de 31,4 U/g de tissu trouvée chez le crabe porcelaine *Petrolisthes laevigatus* (Yaikin *et al.*, 2002). Concernant la PEPCK dans le muscle des arthropodes, Zammit et Newsholme (1976) ont mesuré des niveaux d'activité maximale très faibles en normoxie (1,3 U/g de tissu chez le homard européen *Homarus vulgaris*, moins de 0,1 U/g de tissu chez la crevette *Crangon allmanni*, l'oursin globuleux *Echinus esculentus* et l'étrille *Portunus puber*). Ces niveaux d'activité sont plus faibles que ceux retrouvés dans le muscle de la crevette nordique en normoxie dans la présente étude et parfois même que ceux

retrouvés dans le muscle des individus exposés à une hypoxie aigüe. Il a été démontré que les espèces adaptées à l'hypoxie ont de forts niveaux d'enzymes glycolytiques et de la fermentation car cela leur confère une forte capacité anaérobie (Yaikin *et al.*, 2002). De plus, les organismes adaptés à l'hypoxie, tels que le crabe vert, sont capables d'utiliser rapidement la voie anaérobie une fois que la voie aérobie n'est plus suffisante pour produire assez d'énergie (Burke, 1979). Dans la présente étude, les activités de la LDH et de la PEPCK sont plutôt élevées par rapport à celles des autres espèces, les crevettes nordiques auraient une forte capacité anaérobie et semblent donc plutôt adaptées aux conditions hypoxiques. Cependant, l'activité totale de ces enzymes chez les crevettes nordiques femelles diminue lorsque ces dernières sont exposées à une hypoxie aigüe, contrairement à celles des mâles. Cette diminution de la capacité anaérobie chez les femelles pourrait démontrer que les femelles sont moins adaptées à l'hypoxie que les mâles. De plus, chez les femelles, l'activité de la PK, impliquée la glycolyse, diminue aussi, ce qui vient étayer le fait que les mâles seraient plus résistants.

Les enzymes antioxydantes répondent différemment à l'exposition à une hypoxie aigüe dans le muscle et dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles et mâles. Dans l'hépatopancréas, les niveaux d'activité de la GPx et de la SOD sont élevés par rapport à ceux du muscle. De plus les réponses à l'hypoxie y sont plus marquées. De tels niveaux d'activités variables ont précédemment été enregistrés chez la crevette blanche du Pacifique (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011) et sont en relation avec les fonctions différentes de chaque tissu. Les réponses des enzymes antioxydantes sont aussi très différentes entre les femelles et les mâles. C'est chez les mâles que la réponse est la plus marquée. Tout d'abord, dans le muscle, une variation d'activité est enregistrée seulement chez les mâles. L'activité totale et spécifique de la SOD y est plus faible chez les individus exposés à une hypoxie aigüe que chez le groupe témoin. Les enzymes antioxydantes (GPx, SOD et Cat) étant souvent utilisées comme biomarqueurs de la présence de stress oxydatif (Choi *et al.*, 2000), on peut penser que la diminution de l'activité de la SOD dans le muscle serait due à une baisse de production de ROS, suite à une diminution de la consommation d'oxygène.

Cependant, cette diminution de l'activité enzymatique de la SOD dans le muscle est en contradiction avec les résultats enregistrés chez la crevette blanche du Pacifique dans une étude précédente (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). Chez cette espèce, les niveaux de SOD augmentent en hypoxie, non seulement pour faire face à un éventuel stress oxydatif durant la phase d'hypoxie, mais aussi pour se préparer à l'augmentation brutale de ROS lors de la phase de ré-oxygénation. Cette crevette anticipe la variation d'oxygène dans son environnement, elle est capable de s'y acclimater en augmentant sa capacité antioxydante (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011), ce que la crevette nordique ne semble pas capable de faire. Cependant, il faut aussi prendre en compte que l'exposition de la crevette blanche du Pacifique à l'hypoxie a été de 24 h dans l'étude de Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín (2011), comparé avec un peu plus d'une heure dans mon étude, ce qui a laissé potentiellement moins de temps à la crevette nordique pour réagir. De plus, la crevette blanche du Pacifique vit dans des eaux peu profondes qui peuvent être sujettes à des variations d'oxygène plus rapidement que les eaux profondes où vit la crevette nordique. Ainsi, cette espèce pourrait être adaptée de façon à répondre plus rapidement aux variations d'oxygène que la crevette nordique. Dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles, des réponses plus prononcées furent observées. Ceci suggère que ce tissu serait plus sensible aux ROS à cause de son haut taux métabolique (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). Dans ce tissu, chez les mâles, l'activité de la SOD diminue alors que celle du GPx augmente avec l'exposition à une hypoxie aigüe. Plusieurs études ont montré que les enzymes antioxydantes étaient co-régulées (Choi *et al.*, 2000 ; Marie *et al.*, 2006), mais pas forcément de la même façon selon les espèces. Généralement, la Cat et la GPx s'associent pour éliminer le H_2O_2 produit par la SOD lorsqu'elle catalyse les O_2^- (Marie *et al.*, 2006). Cette réponse n'est pas toujours possible, car la formation excessive de ROS peut inhiber une enzyme, comme c'est le cas chez le ver *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae), où c'est la SOD et la Cat qui augmentent alors que la GPx diminue (Choi *et al.*, 2000). Chez la crevette nordique, comme l'activité de la SOD diminue, on peut penser que les niveaux de H_2O_2 n'augmentent pas de façon excessive et que l'activité de la GPx est suffisante pour obtenir une capacité antioxydante efficace. Dans la présente étude, les

activités de la GPx et de la CS ne sont pas corrélées positivement comme chez le ver *P. grasslei* (Marie *et al.*, 2006), où une diminution de la CS et donc de la capacité aérobie est mise en lien avec la diminution des ROS et de l'activité de la GPx. Concernant l'activité de la Cat qui reste faible et ne semble pas varier lors de l'exposition à une hypoxie aigüe, cela a déjà été noté dans d'autres études, et ce phénomène serait expliqué par une compensation *via* les autres enzymes, comme la GPx (Marie *et al.*, 2006 ; Parrilla-Taylor et Zenteno-Savin, 2011).

Chez les crevettes nordiques femelles, aucune réponse des enzymes antioxydantes n'est observée dans le muscle, et dans l'hépatopancréas, seule une diminution de l'activité de la SOD est enregistrée en réponse à l'exposition à une hypoxie aigüe. Ceci pourrait indiquer que les femelles sont moins adaptées que les mâles à l'hypoxie car leur capacité antioxydante est plus faible, ce qui renforce l'hypothèse mentionnée précédemment. La réponse de la SOD est très rapide alors que celles de la GPx et de la Cat, qui dépendent aussi d'autres paramètres, sont plus lentes à se mettre en place (Choi *et al.*, 2000). Il est possible que l'exposition à une hypoxie aigüe d'environ une heure a été trop courte pour enregistrer une réponse significative chez les crevettes nordiques femelles. De plus, chez les femelles, une diminution de la capacité aérobie est observée et leur consommation d'oxygène diminue aussi. Il est donc possible que la production de ROS soit moins importante, que les femelles ne doivent pas faire face à un stress oxydatif et qu'elles n'aient donc pas besoin d'augmenter leur capacité antioxydante, ce qui confirme mon hypothèse de départ. Cependant, il y a peu d'études sur les réponses enzymatiques à l'hypoxie à court terme chez les crustacés et il est donc difficile de comparer mes résultats avec ceux d'autres études.

Selon les résultats de mon étude, les mâles semblent plus résistants à l'hypoxie aigüe que les femelles chez la crevette nordique. La valeur d'O_{2crit} des mâles étant de 9 ± 7 % sat. et celle des femelles de 14 ± 4 % sat., les mâles seraient donc capables de supporter des niveaux d'oxygène plus faibles, et ce sont les seuls chez qui une augmentation de l'activité

d'une enzyme antioxydante, la GPx, est observée. Cette augmentation de la capacité antioxydante démontre qu'ils sont capables de s'acclimater à des épisodes d'hypoxie aiguë et de résister à l'apparition d'un stress oxydatif (par exemple lors de la ré-oxygénation), comme cela a été démontré chez la crevette blanche du Pacifique (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). Ceci demeure cependant une hypothèse, car il n'y a pas eu de phase de ré-oxygénation dans la présente étude. Les femelles étaient moins résistantes à l'hypoxie car leur seuil d' O_{2crit} (14 ± 4 % sat.) était plus élevé que celui des mâles (9 ± 7 % sat.). Dans l'estuaire du Saint-Laurent, les crevettes nordiques femelles sont très proches de leur seuil de tolérance à l'hypoxie (O_{2crit}), ce qui pourrait mettre leur survie en danger si les niveaux d'oxygène diminuaient encore (Dupont-Prinet, communication personnelle).

Cette étude est la première à mesurer les réponses enzymatiques des crevettes nordiques femelles et mâles à l'hypoxie. Chez cette espèce protandre, le stade de développement et le sexe sont liés. Un coefficient allométrique de 0,56 a été enregistré sur des données de métabolisme respiratoire (Daoud *et al.*, 2007), mais n'ayant pu le vérifier ici sur les données enzymatiques, aucune correction allométrique n'a été faite dans mon étude, mais les variations de masse entre individus du même sexe étaient faibles. J'ai préféré analyser les deux sexes séparément.

Toutes les enzymes mesurées ici, excepté la GPx dans l'hépatopancréas des mâles, ont une activité plus faible lors de l'exposition à une hypoxie aiguë. Cette diminution des capacités métaboliques maximales pourrait être expliquée par une diminution du métabolisme en hypoxie, comme cela a déjà été observé par Abele-Oeschger *et al.* (1997) chez la crevette grise *Crangon crangon*. Cette observation est corroborée par les mesures de respirométrie prouvant bien que les organismes ont un taux métabolique inférieur à leur SMR. Comme le métabolisme est limité par la disponibilité en oxygène, les capacités métaboliques maximales n'ont plus l'obligation d'être aussi élevées qu'en normoxie, ces diminutions permettent à l'organisme de diminuer ses demandes énergétiques et donc d'augmenter son temps de survie lors d'un épisode hypoxique. Cela peut aussi montrer que

l'organisme n'est plus capable de maintenir les mêmes capacités métaboliques sous des conditions trop exigeantes pour lui. Une diminution de la consommation d'oxygène ayant été enregistrée chez les organismes, une fois qu'ils étaient sous O_{2crit} , il y a aussi une diminution d'activité des organismes, qui peut aussi expliquer la baisse d'activité au niveau enzymatique.

Finalement, lors de mon expérience, les crevettes nordiques ont été exposées sous O_{2crit} , et donc à un niveau d'hypoxie très sévère pour elles sur une courte période d'environ une heure. Il n'était pas possible de faire durer l'expérience plus longtemps, car un organisme ne peut survivre sous ce seuil que durant peu de temps. La plupart des autres études observent des organismes exposés à des niveaux d'hypoxie moins sévère, mais pendant un temps plus long (au moins 24 h), ce qui laisse le temps à des processus métaboliques de se mettre en place. Pour essayer de mieux comprendre les réponses de la crevette nordique à l'hypoxie et de voir si des réponses enzymatiques supplémentaires auraient été observées lors d'expositions plus longues, des niveaux intermédiaires de saturations d'oxygène ont été utilisés et ces résultats sont présentés dans le chapitre 2.

CHAPITRE 2

IMPACTS DE DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE SUR LE MÉTABOLISME DE LA CREVETTE NORDIQUE *PANDALUS BOREALIS*

2.1 RÉSULTATS

Le chapitre 2 porte sur les résultats obtenus chez la crevette nordique en réponse à différents niveaux de stress hypoxique chronique. Il est important de préciser que les femelles et les mâles ont été analysés séparément à cause de leur taille différente (la crevette est une espèce protandre, donc les mâles deviennent des femelles après quelques années) et de mon incapacité à faire des corrections allométriques suite au petit nombre d'individus utilisés et au faible éventail de taille. De plus, tel qu'expliqué dans la partie "Matériel et méthodes", les résultats entre activité totale et activité spécifique étant corrélés, seule l'activité totale est présentée dans ce chapitre. Les résultats d'activité spécifique sont présentés à l'annexe VI.

2.1.1 PROTÉINES

Durant l'exposition à différents niveaux d'hypoxie durant sept jours, je n'ai pas observé de changements significatifs dans la concentration en protéines chez les crevettes nordiques femelles, que ce soit dans l'hépatopancréas, avec une moyenne globale de $181,2 \pm 3,9$ mg/g de tissu humide ($n = 42$) ou dans le muscle, avec une moyenne globale de $179,7 \pm 45,2$ mg/g de tissu humide ($n = 42$).

Chez les mâles, quelques différences significatives sont apparues dans les concentrations en protéines (figure 17). Dans le muscle, la seule différence significative a été observée entre les mâles du groupe témoin (100 % sat.) et ceux exposés à 20 % sat. avec une baisse de 18 % (figure 17A ; $F_{[3,36]} = 3,8$; $p = 0,02$). Dans l'hépatopancréas une seule différence significative a également été observée, mais entre les mâles témoins et ceux maintenus à 40 % sat., qui avaient des concentrations en protéines plus faibles de 16,2 % (figure 17B ; $F_{[3,36]} = 5,9$; $p = 0,002$).

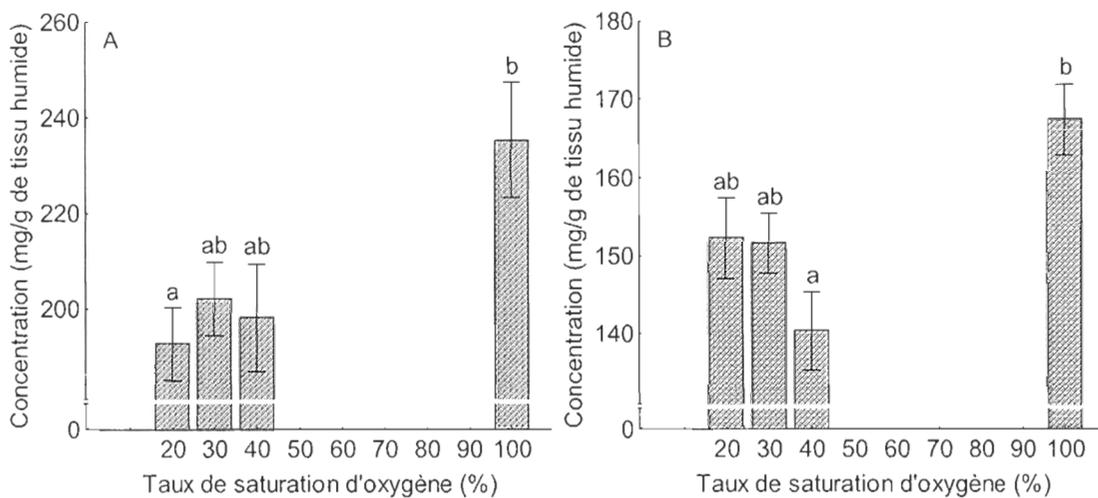


Figure 17 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle (A) et dans l'hépatopancréas (B) des crevettes mâles ($n = 10$) exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

2.1.2 MÉTABOLISME AÉROBIE

Les enzymes participant au métabolisme aérobie n'ont pas toutes répondu de la même façon lors de l'exposition à différents niveaux d'hypoxie chronique. Dans le muscle des crevettes femelles et mâles, l'activité totale (figure 18) de la CS était plus faible chez les groupes exposés à l'hypoxie chronique que chez le groupe témoin. En hypoxie, les activités ont diminué de 43,5 % chez les femelles ($F_{[3,38]} = 13,4$; $p < 0,001$) et de 41,3 % chez les

mâles ($F_{[3,36]} = 13$; $p < 0,001$). Contrairement à la CS, il n'y a pas eu de variations d'activité musculaire totale de la COX avec une moyenne de $0,13 \pm 0,01$ U/g de tissu humide chez les femelles ($n = 39$) et de $0,20 \pm 0,02$ U/g de tissu humide chez les mâles ($n = 40$).

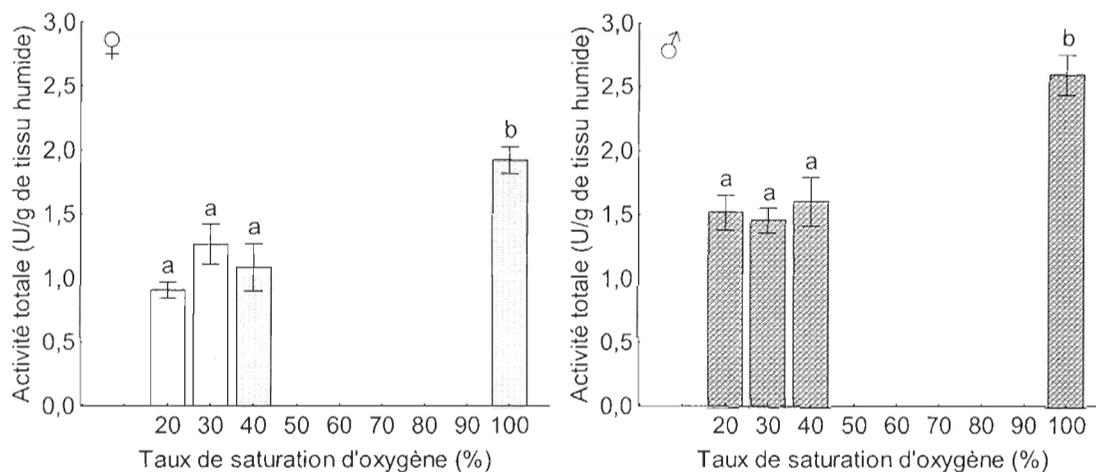


Figure 18 : Activité totale de la citrate synthase dans le muscle des crevettes nordiques femelles ($n_{20\%}$ et $40\% = 10$, $n_{30\%} = 9$ et $n_{\text{témoin}} = 13$) et mâles ($n = 10$) exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

2.1.3 MÉTABOLISME ANAÉROBIE

Dans le muscle, la LDH et la PK ont répondu de la même façon chez les femelles et les mâles. Pour la LDH des différences importantes ont été observées entre les niveaux d'oxygène. Chez les femelles, l'activité totale (figure 19) de la LDH des trois groupes exposés à l'hypoxie chronique était plus faible que celle du groupe témoin ($F_{[3,36]} = 15,2$; $p < 0,001$). L'activité était plus faible à 20 % qu'à 30 % sat., mais celle à 40 % était intermédiaire aux deux premières. Par rapport au groupe témoin, l'activité totale a diminué de 88,2 % chez le groupe exposé à 20 % sat. et de 45,3 % chez celui exposé à 30 % sat. Chez les mâles, l'activité totale de la LDH (figure 19) était plus faible de 67,5 % chez les groupes exposés à 40, 30 et 20 % sat. que chez le groupe témoin ($F_{[3,36]} = 20,7$; $p < 0,001$).

Les traitements d'oxygène n'ont eu aucun effet sur l'activité totale de la PK, autant pour les femelles ($45,4 \pm 3$ U/g de tissu humide, $n = 42$) que pour les mâles ($59,2 \pm 3,2$ U/g de tissu humide, $n = 40$). Je n'ai pu déceler aucune activité de la PEPCK dans l'hépatopancréas des crevettes.

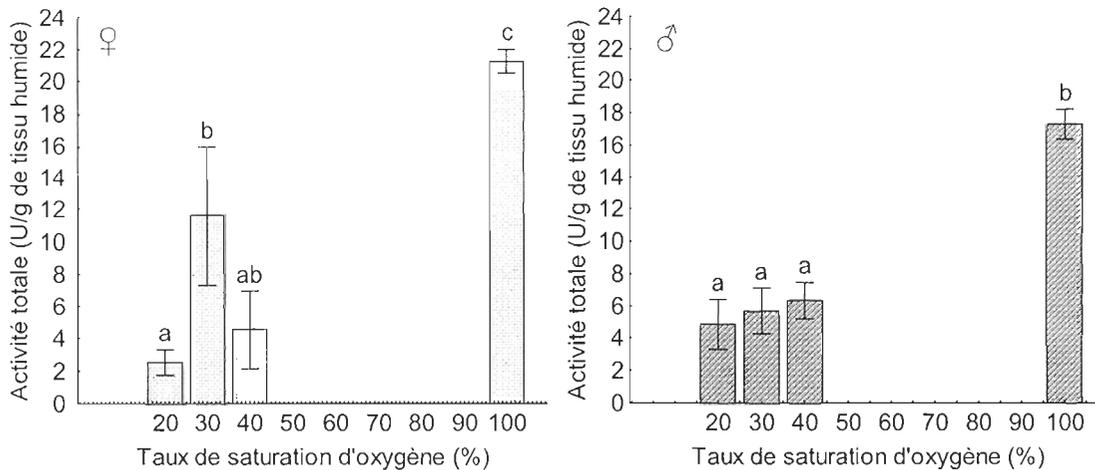


Figure 19 : Activité totale de la lactate déshydrogénase dans le muscle des crevettes nordiques femelles ($n = 9$ sauf pour le groupe témoin où $n = 13$) et mâles ($n = 10$) exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

2.1.4 ENZYMES ANTIOXYDANTES

Au niveau des enzymes du stress oxydatif, j'ai observé que dans l'hépatopancréas des crevettes, l'activité totale de la GPx a augmenté lorsque les crevettes femelles et mâles ont été soumises à une hypoxie chronique, avec des augmentations plus marquées chez les mâles (figure 20A). Chez les femelles, l'activité totale a augmenté de 148,1 % chez le groupe exposé à 20 % sat. par rapport au groupe témoin ($F_{[3,38]} = 4,9$; $p = 0,006$). Cette augmentation était progressive avec des niveaux intermédiaires observés chez les groupes exposés à 30 % et 40 % sat. Chez les femelles, aucune variation significative de l'activité totale de la SOD dans l'hépatopancréas n'a été observée en réponse à une exposition chronique à l'hypoxie ($12829,6 \pm 1243,4$ U/g de tissu humide, $n = 42$).

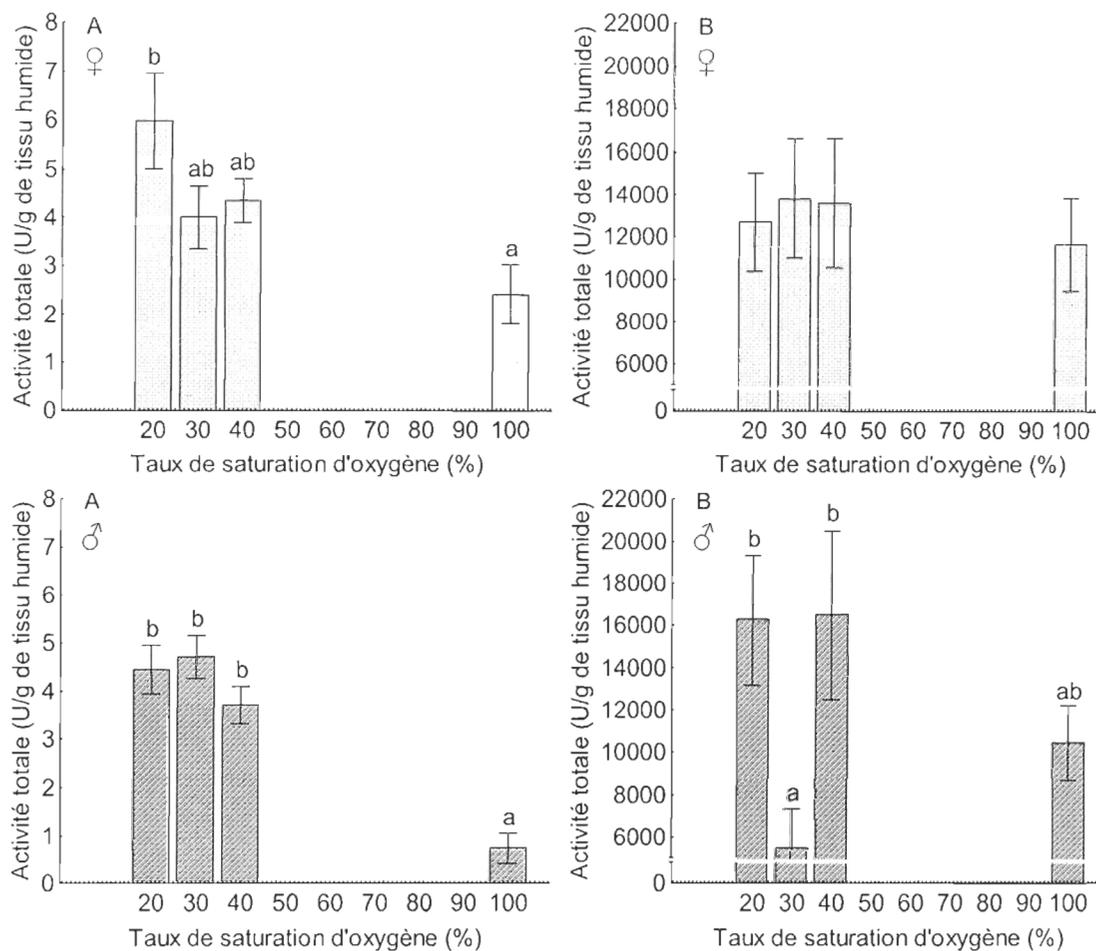


Figure 20 : Activité enzymatique totale de la glutathion peroxydase (A) et de la superoxyde dismutase (B) dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles ($n_{20\%}$ et $40\% = 10$, $n_{30\%} = 9$ et $n_{\text{témoin}} = 13$) et mâles ($n = 10$) exposées à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

D'autre part, chez les mâles, une augmentation significative de 479,7 % pour l'activité totale de la GPx a été observée dès l'exposition à 40 % sat. ($F_{[3,36]} = 19,7$; $p < 0,001$). Les réponses de la SOD dans l'hépatopancréas étaient variables (figure 20B ; $F_{[3,36]} = 3,5$; $p = 0,02$). Les groupes exposés à l'hypoxie chronique avaient des activités similaires à celle du groupe témoin, mais ces activités étaient significativement différentes entre elles. Cette activité totale était plus faible de 66,7 % chez le groupe exposé à 30 % sat. par rapport aux

groupes exposés à 20 % et 40 % sat. (figure 20B). Les analyses de Cat n'ont pas donné de résultats exploitables dans l'hépatopancréas des crevettes.

2.2 DISCUSSION

Les crevettes nordiques peuvent résister à une hypoxie aigüe, comme l'indiquent les mesures d' O_{2crit} (9 ± 7 % sat. chez les mâles et 14 ± 4 % sat. chez les femelles). En hypoxie aigüe, le niveau de réponse mesuré est faible, suggérant que peu d'ajustements métaboliques sont possibles. Lorsqu'il y a une réponse, j'observe généralement des diminutions d'activité des enzymes impliquées dans les processus du métabolisme aérobie, glycolytiques, ainsi que de celles impliquées dans les défenses antioxydantes (chapitre 1). Comme les travaux de Dupont-Prinet *et al.* (2013b) ont montré qu'il n'y avait pas de variations du SMR en hypoxie au dessus de O_{2crit} , on peut supposer que la capacité enzymatique répond toujours aux besoins de base, même lorsqu'il y a diminution d'activité. Toutefois, comme dans les mêmes conditions, le registre aérobie est diminué, on peut supposer que c'est en partie lié à des baisses de capacités enzymatiques. Cependant, les mâles semblent être plus résistants que les femelles, non seulement à cause de leur O_{2crit} plus faible, mais aussi, parce que ce sont les seuls chez qui une augmentation de l'activité d'une enzyme antioxydante (GPx) est observée, indiquant une bonne capacité antioxydante (chapitre 1). Les crustacés étant connus pour être résistants aux conditions hypoxiques (McMahon, 2001 ; Ekau *et al.*, 2010), la crevette n'est pas la seule à supporter de très faibles niveaux d'oxygène pendant quelques heures, le crabe dormeur *Cancer pagurus* étant même capable de supporter l'anoxie pour cette durée d'exposition (Bradford et Taylor, 1982). Cependant, en milieu naturel, les phénomènes hypoxiques peuvent être de plus longue durée. C'est pourquoi dans cette expérience, les crevettes ont été exposées à des niveaux d'hypoxie de 20, 30 et 40 % sat. durant une semaine. Chez d'autres espèces, telles que le crabe bleu (Brown-Peterson *et al.*, 2005) ou la crevette *Palaemonetes pugio* (Brown-Peterson *et al.*, 2008), il a été démontré que la régulation des gènes revient aux niveaux initiaux lors d'une exposition de plusieurs jours à l'hypoxie, ce qui suggère la capacité d'acclimatation de ces espèces à l'hypoxie. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, le seuil de 20 % sat. étant proche du seuil d' O_{2crit} des organismes, les hypothèses restent les mêmes que pour le chapitre 1, à savoir que les organismes exposés à 20 % sat. diminueraient l'activité des enzymes du métabolisme aérobie pour augmenter celles

régulant les voies anaérobies. Il y aurait alors une baisse de la production de ROS suite à la diminution de l'utilisation de la chaîne respiratoire et la capacité antioxydante diminuerait. Aux niveaux d'oxygène supérieurs (30 et 40 % sat.), la contrainte hypoxique étant moins importante sur les organismes, on peut penser qu'à ces niveaux d'oxygène, les organismes seraient capables d'avoir une capacité aérobie et anaérobie similaire qu'en normoxie. Les animaux étant en hypoxie mais probablement à SMR, la production de ROS serait identique, sinon plus faible, qu'en normoxie et il y aurait une baisse de la capacité antioxydante. Mes résultats ne confirment que partiellement l'hypothèse qui supposait que l'activité des enzymes du métabolisme aérobie allait diminuer et que celle des enzymes du métabolisme anaérobie allait se mettre en place de façon plus importante en présence d'une diminution d'oxygène. Concernant les défenses antioxydantes, là encore, l'hypothèse de départ n'est pas supportée.

Chez les crevettes nordiques femelles et mâles, des réponses enzymatiques similaires ont été observées au niveau musculaire après une acclimatation de sept jours aux différents niveaux d'hypoxie chronique, contrairement aux mesures dans l'hépatopancréas qui démontraient des différences selon le genre. Comparativement aux résultats obtenus lors de l'expérience en hypoxie aiguë, l'acclimatation à l'hypoxie sur une durée de sept jours a permis une réponse plus importante et sur un plus grand nombre d'enzymes. La CS est reconnue comme une des enzymes majeure régulant la capacité aérobie (Childress et Somero, 1979). J'ai observé de faibles niveaux d'activité enzymatique en normoxie (chapitre 1), qui se sont encore plus affaiblis après une semaine d'exposition à l'hypoxie. Brouwer *et al.* (2007) ont étudié les stratégies de survie chez la crevette *P. pugio* exposée à une hypoxie aiguë d'environ 16,6 % sat. (= 1,5 ppm), ce qui équivaut à l' O_{2crit} de cette espèce. L'exposition à un niveau aussi sévère d'oxygène est létale à long terme pour la crevette *P. pugio*. Ils ont observé au début d'un phénomène hypoxique, que cette crevette tente d'optimiser le transport de l'oxygène et donc de maximiser l'efficacité du métabolisme aérobie. Toutefois, lorsque l'exposition se maintient sur une longue période ou qu'elle devient plus sévère, les réserves énergétiques s'épuisent et ne suffisent plus à maintenir ces

processus. Les animaux changent alors de stratégie pour économiser de l'énergie et augmenter leur temps de survie en hypoxie. Le transport d'électrons caractérisant la respiration aérobie se produit au niveau mitochondrial et une diminution de la respiration va permettre de limiter la consommation d'énergie. Dans la présente étude, aucun des niveaux d'oxygène auxquels a été exposé la crevette nordique n'était létal car ils étaient tous au-dessus de son O_{2crit} . Ainsi, à 30 et 40 % sat., le registre aérobie de la crevette nordique est réduit, elle peut vivre normalement mais est limitée pour produire un effort maximal. À 20 % sat. cependant, le registre aérobie est très réduit et il est probable que la crevette nordique doive couper dans des processus superflus, même si sa survie n'est pas compromise. Au niveau enzymatique, chez la crevette nordique, on voit que l'activité enzymatique de la CS dans le muscle est plus faible après une semaine en hypoxie, quelque soit le niveau de saturation d'oxygène, par rapport aux individus en normoxie. L'activité de la CS n'est donc pas corrélée au niveau d'oxygène, mais elle diminue plutôt à partir d'un certain seuil d'oxygène, niveau qui doit être supérieur ou égal à 40 % sat.. Comme le MMR, et donc le registre aérobie, mesuré chez les crevettes nordique femelles diminue lorsque l'hypoxie augmente, il est possible que cette baisse soit en lien avec la diminution de la capacité enzymatique liée au métabolisme aérobie. En effet, si le registre aérobie diminue, l'organisme n'a plus besoin d'une capacité enzymatique aussi élevée qu'en normoxie, ou à l'inverse des coûts métaboliques en hypoxie peuvent engendrer des baisses d'activités enzymatiques qui elles limitent le registre aérobie. Chez les autres espèces, différentes réponses sont observées. Ainsi, le crabe bleu semble diminuer sa capacité aérobie à partir de 5 jours d'exposition à environ 25 % sat. (2-3 ppm), les gènes mitochondriaux, notamment celui codant pour la COX, étant moins exprimés (Brouwer *et al.*, 2004 ; Brown-Peterson *et al.*, 2005). Des réponses similaires ont été notées chez le poisson zèbre exposé à 5 % sat. pendant 12 h (Ton *et al.*, 2003). Chez la crevette *P. pugio*, la réponse est un peu différente, que ce soit en laboratoire ou en milieu naturel. Tout d'abord, une hypoxie modérée d'environ 25 % sat. (légèrement supérieure à l' O_{2crit} de la crevette *P. pugio*) n'entraîne pas de changement de transcription des gènes mitochondriaux dans le muscle, quelque soit le temps d'exposition (Brouwer *et al.*, 2008), mais une exposition à l'hypoxie

sévère d'environ 15 % sat. (légèrement inférieur à l' O_{2crit} de la crevette *P. pugio*) pendant une semaine entraîne une augmentation de la transcription des gènes mitochondriaux (COX). Cependant, ce phénomène s'inverse à 14 jours, ce qui montrerait une acclimatation de la crevette à l'hypoxie (Brown-Peterson *et al.*, 2005 ; Brouwer *et al.*, 2007 ; Brouwer *et al.*, 2008 ; Brown-Peterson *et al.*, 2011). Dans la présente étude, une seule mesure a été prise à la fin de l'expérience et ne permet pas de montrer si la crevette nordique est capable d'une telle acclimatation.

Dans le muscle des crevettes nordiques, les enzymes glycolytiques ont des réponses différentes. Tout d'abord, l'activité de la LDH est plus faible chez les individus exposés aux trois différents niveaux d'hypoxie par rapport à ceux restés en normoxie. D'autres études ayant porté sur l'activité enzymatique de la LDH en normoxie, chez différentes espèces telles que le crabe porcelaine *P. laevigatus* (Yaikin *et al.*, 2002), la palourde américaine *Mercenaria mercenaria*, le crabe jonah *Cancer borealis* (Hammen, 1969), la patelle commune *Patella vulgata*, le crabe dormeur, le crabe marbré *Pachygrapsus marmoratus* ou l'oursin globuleux (Zammit et Newsholme, 1976), me permettent de dire que chez la crevette nordique, l'activité de la LDH est relativement élevée (chapitre 1), suggérant que la capacité glycolytique maximale de ce tissu est importante (Yaikin *et al.*, 2002). Les réponses enzymatiques de la LDH sont différentes chez les femelles et chez les mâles. Chez les mâles, l'activité de LDH est plus faible chez les trois groupes exposés une semaine à différents niveaux d'hypoxie chronique que chez le groupe en normoxie. Cette activité est cependant similaire entre les trois groupes en hypoxie chronique. Ainsi, il semble que la capacité glycolytique maximale diminuerait à partir d'un certain seuil situé au-dessus ou près de 40 % sat. Les niveaux d'activité de la LDH étaient plus faibles en hypoxie chronique chez les femelles aussi, quoique le niveau plus élevé à 30 % sat. qu'à 20 ou 40 % sat. soit difficile à expliquer. Il est possible que cette diminution de l'activité de la LDH reflète une baisse de la demande énergétique dans le muscle.

L'activité de la PK dans le muscle ne varie pas lors d'une exposition des crevettes nordiques aux différents niveaux d'hypoxie chronique. Ce résultat lié à la diminution de l'activité de la LDH décrite précédemment, est en contradiction avec ce qui a été démontré en hypoxie chronique dans d'autres études. En effet, chez la crevette à pattes blanches *Penaeus vannamei* exposée 12 jours entre environ 16,6 et 27,6 % sat. (1,5 et 2,5 mg O₂/L ; Racotta *et al.*, 2002) ou chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* exposée une semaine à environ 22,1 % sat. (2 mg O₂/L ; Woo *et al.*, 2011), on observe une augmentation de la capacité anaérobie maximale lors d'une exposition à long terme à l'hypoxie. Les auteurs ne précisent pas si ces niveaux d'oxygène sont supérieurs ou non à l'O_{2crit} des individus mais leurs résultats suggèrent la capacité de ces espèces à s'acclimater à un tel phénomène. Par exemple, les gènes codant pour la PK et la PEPCK chez *C. gigas* et celui codant pour la PEPCK chez la crevette *P. pugio* sont plus exprimés lors d'une exposition de plusieurs jours à l'hypoxie (Brown-Peterson *et al.*, 2008 ; Brown-Peterson *et al.*, 2011 ; Woo *et al.*, 2011). Mes résultats chez la crevette nordique n'indiquent pas de telles réponses, ni de telles acclimations. Cependant, la crevette nordique est présente en forte abondance dans les zones hypoxique de l'estuaire du Saint-Laurent. Elle est donc capable de survivre à de telles conditions environnementales. Il est fort probable que l'exposition à l'hypoxie, dans cette étude, soit de trop courte durée pour forcer la crevette nordique à augmenter sa capacité anaérobie. La diminution de la capacité métabolique maximale observée dans mon étude, en limitant les dépenses énergétiques de la crevette, est sûrement une stratégie efficace de survie chez cette espèce.

Les enzymes antioxydantes, telles que la GPx ou la SOD, sont souvent utilisées comme biomarqueurs de la présence de stress oxydatif (Choi *et al.*, 2000). Dans la présente étude, ces deux enzymes ont été analysées dans l'hépatopancréas, le tissu où ces enzymes sont le plus concentrées (Ross *et al.*, 2001), pour voir la capacité antioxydante de la crevette nordique en hypoxie, lorsque la production de ROS baisserait. Cependant, il y a une forte réponse des défenses antioxydantes des crevettes nordiques en réponse à une exposition d'une semaine aux différents niveaux d'hypoxie. J'ai observé un maintien de l'activité très

élevée de la SOD et une augmentation des niveaux d'activité de la GPx, confirmant ce qui est décrit par Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín (2011) chez la crevette blanche du Pacifique. Ceci n'est pas étonnant, car beaucoup d'invertébrés possèdent un système d'enzymes antioxydantes très efficace pour les protéger contre les éventuels dommages des ROS (Choi *et al.*, 2000). Cette caractéristique est d'autant plus importante chez les organismes estuariens, tels que la crevette nordique, qui doivent s'ajuster à des conditions biotiques variables (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). Ces capacités antioxydantes très efficaces leur permettent de s'acclimater aux conditions extrêmes d'oxygène et aux fortes variations de ce paramètre (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). Cependant, dans la présente étude, tout spécialement à 20 % sat., l'hypoxie chronique entraîne une diminution de la capacité aérobie maximale (diminution de l'activité de la CS dans le muscle) des crevettes nordiques et l'oxygène dans le milieu est limitant. Il est probable que la production de ROS soit moins importante à ce niveau d'oxygène. Il ne serait donc pas nécessaire pour la crevette nordique d'augmenter sa capacité antioxydante en hypoxie chronique. Cette réponse peut être interprétée comme une réponse préparatoire à la ré-oxygénation comme cela a déjà été démontré chez la crevette blanche du Pacifique (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011). L'activité des enzymes antioxydantes dans l'hépatopancréas des crevettes nordiques est différente selon le sexe des individus. Par exemple, chez les mâles, l'activité de la GPx était similaire dans tous les groupes en hypoxie chronique, ce qui laisse à penser que sa capacité antioxydante augmente à partir d'un certain seuil d'oxygène, supérieur à 40 % sat. Chez les femelles, l'augmentation de l'activité de la GPx est plus progressive. Elle semble en rapport avec le niveau d'oxygène, le groupe exposé à 20 % sat. étant le seul dont l'activité était significativement différente du groupe témoin resté en normoxie. J'ai observé des variations d'activité de la SOD difficiles à expliquer chez les mâles, les niveaux d'activité étaient similaires entre les groupes en hypoxie et celui en normoxie. Dans la littérature, les réponses intersexes ne sont pas étudiées mais on trouve des différences interspécifiques. Au niveau génique, chez certaines espèces, telles que la crevette *P. pugio* (Brouwer *et al.*, 2007 ; Brown-Peterson *et al.*, 2008) ou le crabe bleu (Brouwer *et al.*, 2004), une diminution de l'expression du gène codant pour

la SOD est observée après plusieurs jours passés en hypoxie. Au contraire, chez le ver *C. riparius*, certains gènes codant pour les défenses antioxydantes sont surexprimés (SOD) et d'autres sont sous-exprimés (GPx) lors d'une exposition à long terme à l'hypoxie (Choi *et al.*, 2000). Les réponses peuvent donc être variables selon les espèces. Comme l'hypoxie semble stimuler les capacités antioxydantes chez la crevette nordique, elle favorise du même coup le système de défense, ce qui évite les éventuels dommages oxydatif en cas variation d'oxygène ou de ré-oxygénation (Hermes-Lima *et al.*, 1998 ; Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011).

Dans le muscle des crevettes nordiques mâles, les concentrations en protéines sont plus faibles chez les groupes exposés à l'hypoxie et plus le niveau d'oxygène est faible, plus cette diminution est marquée. Ce phénomène a déjà été noté chez le crabe bleu (Brown-Peterson *et al.*, 2005) et chez certains poissons (Gracey *et al.*, 2001 ; Ton *et al.*, 2003). Ce phénomène ne se produit que lors d'une exposition prolongée à l'hypoxie, ce qui explique pourquoi cela n'avait pas été enregistré lors de l'expérience en hypoxie aiguë (chapitre 1). Il serait dû à une diminution de la synthèse protéique liée à l'augmentation de l'utilisation des glucides par rapport aux protéines pour produire de l'énergie (Pelletier *et al.*, 1993 ; Brown-Peterson *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2006). Dans la présente étude, il y a aussi des variations des concentrations en protéines dans l'hépatopancréas des différents groupes de crevettes, mais ces variations ne sont pas corrélées avec les variations d'oxygène. Les variations des concentrations en protéines pourraient cacher des réponses au niveau de l'activité spécifique des différents enzymes, mais ça n'est pas le cas dans cette étude, car les réponses au niveau de l'activité totale et spécifique sont toujours similaires.

En conclusion, chez la crevette nordique, il y a une diminution des capacités maximales aérobie et anaérobie, à tous les niveaux d'hypoxie chronique, ce qui contredit mes hypothèses de départ comme quoi les réponses seraient différentes entre les trois niveaux d'oxygène. Ces résultats sont assez étonnants car à 30 et 40 % sat. le registre aérobie est encore élevé, ce qui ne devrait pas obliger la crevette nordique à limiter ses

capacités métaboliques. Comme le suggèrent les réponses des enzymes antioxydantes, la crevette semble être capable de se protéger, au moins en partie, contre les éventuels dommages oxydatifs. On ne peut pas vraiment vérifier s'il y a une acclimatation au fur et à mesure du temps avec les données disponibles ici. Cependant, dans cette étude, la crevette nordique est généralement affectée de la même manière quelque soit le niveau d'hypoxie chronique (40, 30 ou 20 % sat.). Or dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, la crevette nordique se retrouve très souvent dans des conditions d'oxygène entre 30 et 40 % sat. et y survit. Comme une réponse identique est observée à 20 % sat., ce qui est très proche de la valeur d' O_{2crit} des crevettes, ceci démontre en premier lieu que la crevette est très résistante aux conditions hypoxiques. De plus, dans le milieu naturel, il est fort probable que la crevette soit capable de s'adapter et de s'ajuster au niveau physiologique, vu qu'elle survit à dans des zones où les conditions d'oxygène sont identiques à celles de mon étude. Ceci expliquerait les fortes populations de crevettes nordiques retrouvées dans l'estuaire du Saint-Laurent malgré les faibles taux d'oxygène enregistrés dans cette région.

CHAPITRE 3

IMPACTS DE L'HYPOXIE AIGÛE SUR LE MÉTABOLISME DU FLÉTAN DU GROENLAND *REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES*

3.1 RÉSULTATS

Le chapitre 3 porte sur les résultats obtenus chez le flétan du Groenland en réponse à un stress hypoxique aigu. L'exposition à une hypoxie aigüe a entraîné des réponses différentes chez les adultes et les juvéniles, ceux-ci ont donc été considérés séparément pour la présentation des résultats. De plus, tel qu'expliqué dans la partie "Matériel et méthodes", les résultats d'activité totale et d'activité spécifique étant corrélés, seule l'activité totale est présentée dans ce chapitre. Les résultats d'activité spécifique sont présentés à l'annexe VII.

3.1.1 ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

3.1.1.1 Flétans du Groenland adultes

Chez les flétans du Groenland adultes, les concentrations en protéines (tableau 12) ne montraient pas de différence significative entre le groupe témoin et celui exposé à l'hypoxie aigüe. Des variations d'activité totale entre individus témoins et ceux exposés à une hypoxie aigüe sont observées pour deux enzymes. Dans le muscle, l'activité totale de la PEPCK, enzyme impliquée dans la néoglucogenèse, a diminué de 32,6 % chez les individus exposés à une hypoxie aigüe (tableau 13). Dans le foie, l'activité totale de la SOD, enzyme impliquée dans les défenses antioxydantes, a augmenté de 85,6 % (tableau 13). Par contre,

l'activité de toutes les autres enzymes ne variait pas chez les adultes lors d'une exposition à une hypoxie aigüe, que ce soit dans le muscle ou dans le foie (tableau 13).

Tableau 12 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes et des juvéniles exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie (moyenne \pm erreur type, pour les témoins, n = 10 pour les adultes et n = 10 pour les juvéniles et en hypoxie aigüe, n = 14 pour les adultes et n = 12 pour les juvéniles)

Stade	Tissu	Normoxie	Hypoxie aigüe
adultes	muscle	159,4 \pm 8,5	157,8 \pm 11,2
	foie	208,8 \pm 12,4	199,5 \pm 6,8
juvéniles	muscle	151,6 \pm 9,8	147,3 \pm 8,3
	foie	225,4 \pm 10,1	222,9 \pm 8,2

Tableau 13 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie (moyenne \pm erreur type). Pour les témoins n = 10 sauf pour la mesure d'activité de la Cat dans le muscle et de la SOD dans le foie (n = 8). En hypoxie aigüe, n = 14 sauf pour la mesure de Cat dans le muscle et la mesure de SOD dans le foie (n = 12). La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoin et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05)

Tissu	Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
muscle	Citrate synthase	1,45 \pm 0,4	0,96 \pm 0,2
	Lactate déshydrogénase	138,7 \pm 26,1	186,6 \pm 30,6
	Pyruvate kinase	45,6 \pm 11,8	67,3 \pm 13,8
	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,46 \pm 0,05	0,31 \pm 0,04*
	Catalase	1524,9 \pm 205,5	1862,3 \pm 130,4
	Superoxyde dismutase	36908,6 \pm 3329	33674 \pm 2070,9
foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,65 \pm 0,04	0,56 \pm 0,03
	Glutathion peroxydase	1,3 \pm 0,4	1,67 \pm 0,2
	Superoxyde dismutase	231,7 \pm 59,6	430,1 \pm 58,4*

3.1.1.2 Flétans du Groenland juvéniles

Chez les flétans du Groenland juvéniles, deux enzymes ont répondu à l'exposition à l'hypoxie aigüe, mais ce ne sont pas les mêmes que chez les adultes. La LDH, impliquée

dans le processus de fermentation, et la Cat, enzyme antioxydante, ont toutes les deux des activités plus faibles dans le muscle (tableau 14). Dans le muscle, l'activité de la LDH a diminué de 37,6 % entre les individus témoins et ceux exposés à une hypoxie aigüe, tandis que celle de la Cat a eu une diminution de 95,5 %. L'activité de toutes les autres enzymes, ainsi que les concentrations en protéines (tableau 12), ne variait pas chez les juvéniles lors d'une exposition à une hypoxie aigüe, que ce soit dans le muscle ou dans le foie (tableau 14).

Tableau 14 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe ou restés en normoxie (moyenne \pm erreur type). Pour les témoins, n = 10 sauf pour la mesure d'activité de la Cat dans le foie (n = 8). En hypoxie aigüe, n = 12 dans le muscle sauf pour la mesure de la PEPCK (n = 10) et n = 14 dans le foie sauf pour la mesure de la Cat (n = 12). La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoin et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05 et ** p < 0,01)

Tissu	Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
muscle	Citrate synthase	2,27 \pm 0,2	1,86 \pm 0,1
	Lactate déshydrogénase	88,8 \pm 7,8	55,4 \pm 9,9*
	Pyruvate kinase	43,1 \pm 4	37,6 \pm 3,7
	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,33 \pm 0,09	0,37 \pm 0,08
	Catalase	1540,3 \pm 101,9	969,9 \pm 152**
	Superoxyde dismutase	31952,1 \pm 817,2	28974,4 \pm 1926,3
foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,78 \pm 0,03	0,73 \pm 0,03
	Glutathion peroxydase	1,52 \pm 0,1	1,25 \pm 0,2
	Superoxyde dismutase	1409,3 \pm 218,8	1046,8 \pm 161,2

3.1.2 EXPRESSION GÉNIQUE

Chez les flétans du Groenland juvéniles, des analyses d'expression génique ont été réalisées dans le muscle pour les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les processus de respiration aérobie, de fermentation et de glycolyse, et dans le foie pour ceux impliqués dans le processus de néoglucogénèse et de défenses antioxydantes.

3.1.2.1 Dans le muscle

Les gènes codant pour la COX et la LDH étaient exprimés de façon différente chez les individus exposés à une hypoxie aiguë et les individus témoins. Ainsi dans le muscle, les expressions géniques de la COX et de la LDH ont augmenté respectivement de 105,6 % et de 62 % chez les individus exposés à une hypoxie aiguë relativement aux individus témoins (figure 21). Aucune variation n'a été observée pour les expressions géniques de la CS et de la PK dans le muscle (figure 21).

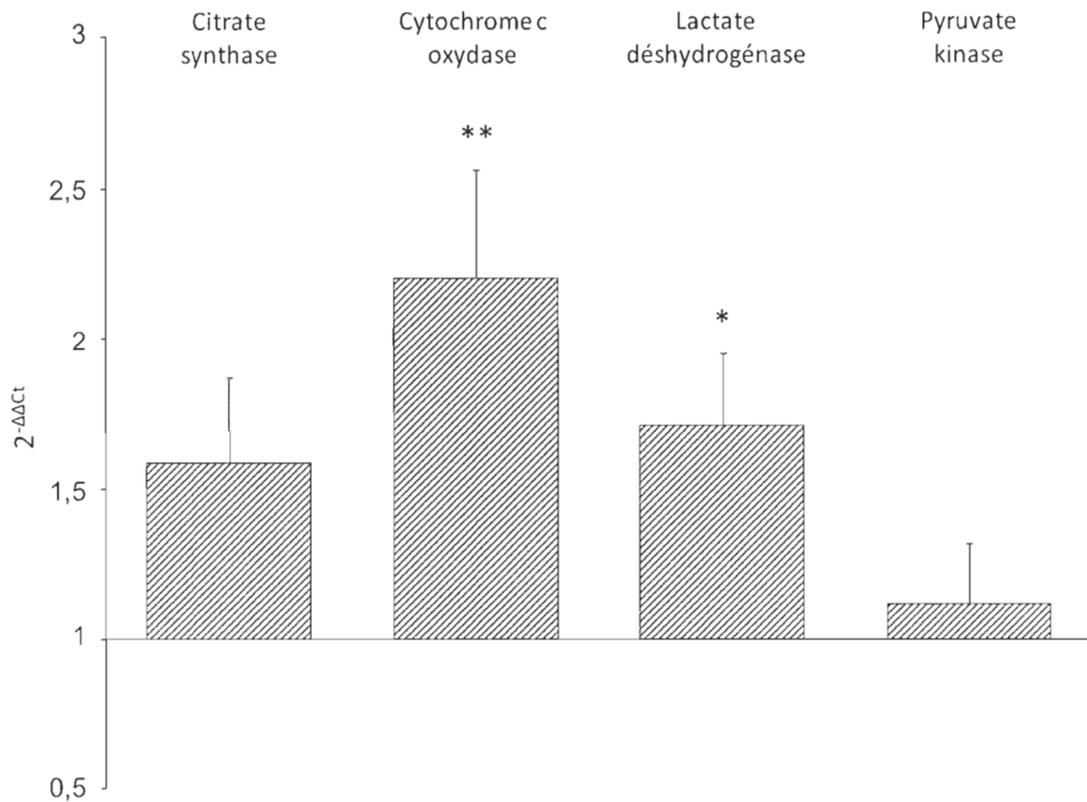


Figure 21 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin (dont la valeur est ajustée à 1) des gènes codant pour la citrate synthase, la cytochrome c oxydase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aiguë (moyenne \pm erreur type, $n = 10$). La présence d'astérisques indique des différences significatives (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) entre le groupe exposé à l'hypoxie aiguë et celui des témoins pour chaque gène

3.1.2.2 Dans le foie

Dans le foie, les gènes codant pour la PEPCK, la GPx, la Cat et la SOD se sont exprimés de façon similaire entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (figure 22).

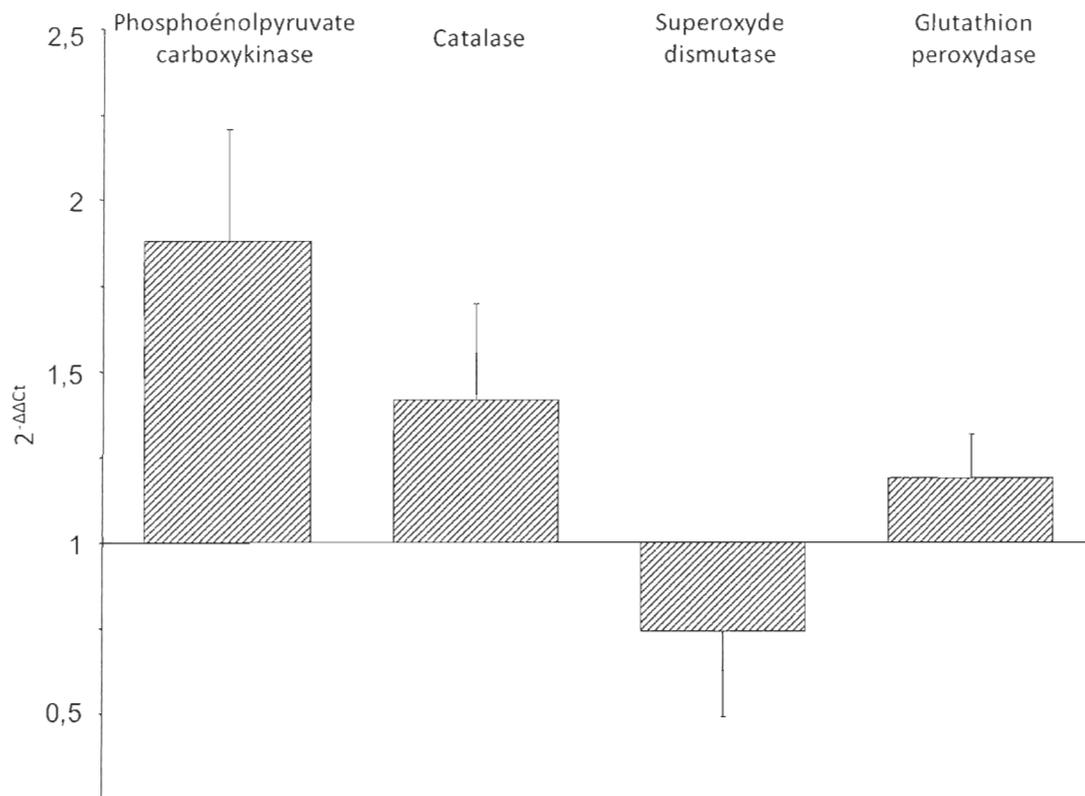


Figure 22 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin (dont la valeur est ajustée à 1) des gènes codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase dans le foie des flétans du Groenland juveniles exposés à une hypoxie aigüe (moyenne \pm erreur type, n = 10)

3.2 DISCUSSION

Au cours de cette expérience, compte tenu de la façon dont O_{2crit} est estimée (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a), les flétans du Groenland ont été exposés à des teneurs en oxygène inférieures à O_{2crit} pendant $2,4 \pm 0,6$ heures. Cette valeur d' O_{2crit} correspond au niveau d'oxygène à partir duquel ils ne peuvent plus soutenir leur SMR. Les flétans du Groenland adultes et les juvéniles n'ont pas une tolérance égale à l'hypoxie aigüe. Dupont-Prinet *et al.* (2013a) ont montré que le seuil d' O_{2crit} des adultes était 11 % de saturation d'oxygène, et que celui des juvéniles, un peu plus élevé, atteignait 15 % de saturation d'oxygène. À ce niveau de saturation, l'organisme peut utiliser différentes stratégies de survie, les principales étant la diminution de ses coûts énergétiques et l'utilisation plus importante du métabolisme anaérobie. Dans ce chapitre, les résultats vont à l'encontre de l'hypothèse de départ qui supposait que l'activité des enzymes des voies anaérobies allaient devenir plus importante alors que celle des enzymes aérobies allait diminuer sous le seuil d' O_{2crit} . Concernant les défenses antioxydantes, l'hypothèse de départ comme quoi la capacité antioxydante va s'ajuster à la diminution de la production de ROS (et donc du taux métabolique aérobie), n'est pas toujours vérifiée.

Une exposition à des valeurs d'oxygène dissous inférieures à O_{2crit} pendant 2,4 h en moyenne n'a eu aucun impact sur les indicateurs de la capacité aérobie examinés dans le muscle (activité enzymatique de la CS) pour les flétans du Groenland juvéniles et adultes. Cependant, la consommation d'oxygène de l'animal entier était bien inférieure au SMR en hypoxie aigüe (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a), il est important de noter que les résultats de consommation d'oxygène représentent ce qui passe au niveau de l'organisme entier alors que les résultats enzymatiques représentent uniquement ce qui se passe au niveau de chaque tissu. L'activité des enzymes impliquées dans les processus aérobies est très faible dans le muscle. J'ai observé une valeur d'activité moyenne pour la CS de $1,45 \pm 0,4$ et $2,27 \pm 0,2$ U/g de tissu en normoxie respectivement dans le muscle blanc des flétans du Groenland adultes et juvéniles. Des niveaux d'activité similaires ont été mesurés dans le muscle blanc d'autres espèces de poissons (tableau 15).

Tableau 15 : Activité de citrate synthase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces de poissons

Nom commun	Nom latin	Activité maximale	Référence
Anchois du Pacifique	<i>Engraulis mordax</i>	3,22 ± 0,27	Childress et Somero, 1979
Lampe à grande nageoire	<i>Lampanyctus ritteri</i>	0,99 ± 0,06	Childress et Somero, 1979
-	<i>Bajacalifornia burragei</i>	0,36 ± 0,04	Childress et Somero, 1979
Anguille égorgée bécue	<i>Synaphobranchus kaupii</i>	0,61 ± 0,08	Bailey <i>et al.</i> , 2005
Turbot (juvénile)	<i>Scophthalmus maximus</i>	0,5 ± 0,14	Abele <i>et al.</i> , 2007

Chez les juvéniles turbots *Scophthalmus maximus*, l'activité de la COX dans le muscle a été estimée à $0,74 \pm 0,11$ U/g de tissu (Abele *et al.*, 2007). Ces faibles niveaux d'activité ne sont pas étonnants dans le muscle blanc puisque ce tissu fonctionne principalement en mode anaérobie (Lushchak *et al.*, 2005). Cependant, au niveau génomique, le gène codant pour la COX est plus exprimé chez les flétans du Groenland juvéniles exposés à une hypoxie aigüe comparativement aux individus en normoxie. Ceci a déjà été noté chez le gobie *Gillichthys mirabilis* (Gracey *et al.*, 2001), espèce que l'on retrouve dans les eaux côtières saumâtres et les baies du Pacifique est, et chez le fondule (Everett *et al.*, 2012), que l'on retrouve dans les eaux douces à saumâtres des baies et canaux le long de l'Atlantique ouest. Cette surexpression est très étonnante dans mon étude car elle laisse à penser que les individus tentent d'augmenter leur capacité aérobie maximale, alors même que leur consommation d'oxygène était sous SMR (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a). Il est donc peu probable que les flétans du Groenland s'apprêtaient à augmenter leur capacité aérobie maximale. Il est vrai que génomique et mesure d'activité donnent ici des résultats contradictoires. Les relations moléculaires intermédiaires entre les deux niveaux d'organisation sont peu connues à ce jour. Dans mon étude, il semble cependant que l'hypoxie sévère ait un effet inhibiteur sur le procédé de traduction (lorsque le ribosome traduit les codons du brin d'ARNm en peptides pour former une protéine). En effet, bien que le gène soit plus exprimé (analyse par rapport au brin d'ARNm), l'activité enzymatique n'est pas modifiée (analyse au niveau de la protéine).

Les enzymes glycolytiques ont plutôt des activités élevées dans le muscle des flétans du Groenland, que ce soit en normoxie ou en hypoxie. En normoxie, la LDH et la PK ont dans le muscle respectivement des activités de $138,7 \pm 26,1$ et de $45,6 \pm 11,8$ U/g de tissu chez les adultes et $88,76 \pm 7,8$ et $43,1 \pm 4$ U/g de tissu chez les juvéniles. En hypoxie aigüe, elles ont des activités de $186,6 \pm 30,6$ et de $67,3 \pm 13,8$ U/g de tissu chez les adultes et $55,35 \pm 9,9$ et $37,6 \pm 3,7$ U/g de tissu chez les juvéniles. Ces niveaux d'activité sont cohérents avec le fonctionnement en mode anaérobie du muscle blanc (Childress et Somero, 1979 ; Knox *et al.*, 1980). Chez d'autres espèces, l'activité de la LDH dans le muscle est très variable (tableau 16). Elle peut être très élevée, comme chez l'anchois du Pacifique (Childress et Somero, 1979) et chez l'anguille égorgée bécue (Bailey *et al.*, 2005) ou encore avoir de très faibles niveaux d'activité comme chez la plie rouge *Pseudopleuronectes americanus* (Hammen, 1969). Ces données proviennent d'organismes différents dans des conditions différentes. Les données de l'anchois du Pacifique, poisson pélagique côtier, proviennent d'organismes dans leur milieu naturel (au large de la Californie du sud pour cette étude), celles concernant l'anguille égorgée bécue, poisson marin bathy-démersal, proviennent d'une étude de respirométrie (conditions identiques au milieu naturel) et finalement celles sur la plie rouge, espèce marine benthique, proviennent d'organismes dans leur milieu naturel (au large du Connecticut). Il est difficile de comparer ces données entre elles car les conditions d'expérimentation ou les habitats où les organismes ont été prélevés ne sont pas identiques. Cependant, l'espèce pélagique a une capacité glycolytique maximale plus élevée que celle de l'espèce bathydémersale, elle-même plus élevée que celle de l'espèce benthique. La capacité glycolytique maximale dans le muscle (*via* l'activité de la LDH) pourrait donc être liée à la capacité de nage de ces espèces. Chez les espèces qui utilisent la nage de façon plus importante, le muscle aurait une capacité anaérobie maximale plus importante. Ainsi, l'activité de la LDH chez les flétans du Groenland est beaucoup plus élevée que chez une autre espèce de poisson plat, telle que la plie rouge, ce qui lui donnerait une capacité anaérobie maximale plus importante dès le départ. Ceci pourrait être lié à son comportement en partie pélagique (Jørgensen, 1997 ; Vollen et Albert, 2008 ; Albert *et al.*, 2011).

Tableau 16 : Activité de lactate déshydrogénase et de pyruvate kinase (U/g de tissu humide) observée dans le muscle blanc de différentes espèces de poissons

Nom commun	Nom latin	Activité de la lactate déshydrogénase	Activité de la pyruvate kinase	Référence
Anchois du Pacifique	<i>Engraulis mordax</i>	213,8 ± 58,9	57,8 ± 7,2	Childress et Somero, 1979
Anguille égorgée bécue	<i>Synaphobranchus kaupii</i>	128,7 ± 11,5	2,89 ± 0,33	Bailey <i>et al.</i> , 2005
Plie rouge	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	0,25	-	Hammen, 1969
Plie	<i>Pleuronectes platessa</i>	-	37,7 ± 4,3	Knox <i>et al.</i> , 1980
Truite arc-en-ciel	<i>Salmo gairdneri</i>	-	109,5 ± 11,4	Knox <i>et al.</i> , 1980
Morue franche	<i>Gadus morhua</i>	-	37,8 ± 3,7	Knox <i>et al.</i> , 1980

L'activité de la PK varie aussi beaucoup selon les espèces (tableau 15). Cette fois, le lien avec le comportement des espèces est moins clair, même si la truite arc-en-ciel, qui est un poisson très actif, possède l'activité la plus élevée. Chez le flétan du Groenland, les niveaux d'activité de la PK sont moins élevés que ceux de la LDH mais restent cependant dans la moyenne de ceux retrouvés chez d'autres espèces.

L'activité de la PEPCK, enzyme de la néoglucogenèse, est généralement faible ou non détectable dans le muscle, mais est plus élevée dans le foie quoique demeurant à des niveaux relativement faibles chez les différentes espèces chez qui elle a été mesurée : 1,32 ± 0,24 chez la truite arc-en-ciel, 0,85 ± 0,12 chez la morue franche, 1,37 ± 0,12 chez la plie (Knox *et al.*, 1980). Chez le flétan du Groenland, par rapport aux autres espèces, les niveaux d'activité de la PEPCK sont un peu plus faibles dans le foie mais par contre, une faible activité est aussi enregistrée dans le muscle, ce qui montre encore la capacité anaérobie de ce tissu.

L'exposition à une hypoxie aigüe entraîne des réponses différentes de ces enzymes chez les adultes ou chez les juvéniles. Dans le muscle des adultes, seule l'activité de la

PEPCK diminue. Dans le muscle des juvéniles, c'est l'activité enzymatique de la LDH qui diminue alors que l'expression du gène codant pour la LDH augmente. Il semblerait donc y avoir une diminution de la capacité anaérobie maximale chez cette espèce lors de l'exposition à l'hypoxie aigüe. Ceci est en contradiction avec ce qui est remarqué dans d'autres études où l'exposition à l'hypoxie entraîne une augmentation de la capacité anaérobie. Ce type de réponse a été enregistré dans des expériences de respirométrie de quelques heures chez *Astronotus crassipinnis* exposé à différents paliers d'oxygène. On observe alors une augmentation de l'activité de la PK (Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Il en est de même chez le tambour croca exposé à différents niveaux d'oxygène (entre 10 % et 100 % sat.), où c'est l'activité de la LDH qui augmente (Cooper *et al.*, 2002). Chez deux espèces de cichlidés (*A. crassipinnis* et le discus *Symphysodon aequifasciatus*), considérés comme très tolérants à l'hypoxie, cette augmentation de la capacité anaérobie est combinée à une suppression métabolique des processus oxydatifs de la chaîne respiratoire (Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Toutes ces espèces ayant une augmentation de la capacité glycolytique sont présentes naturellement dans des milieux où les niveaux d'oxygène sont faibles et variables, et elles sont caractérisées comme très résistantes à l'hypoxie. Chez les juvéniles, il y a aussi une augmentation de l'expression du gène de la LDH. Comme expliqué précédemment, il y a possiblement un effet inhibiteur de l'hypoxie sévère sur le processus de traduction par le ribosome.

Chez le flétan du Groenland, les enzymes antioxydantes ont de fortes activités dans le foie, mais elles sont aussi très présentes dans le muscle, ce qui est plutôt surprenant. En effet, la capacité antioxydante est généralement plus importante dans le foie, à cause du rôle dans la détoxification et la dégradation des produits métaboliques exercé par ce tissu. Des niveaux élevés d'activité des d'enzymes antioxydantes ont déjà été relevés dans plusieurs tissus de la carpe *Cyprinus carpio*, une espèce connue pour sa résistance à l'hypoxie (Lushchak *et al.*, 2001 ; Lushchak *et al.*, 2005). La capacité des flétans du Groenland à se défendre contre le stress oxydatif laisse penser la même chose. Chez ce dernier, les adultes et les juvéniles ne répondent pas de la même façon à l'exposition à une hypoxie aigüe, en ce

qui concerne les enzymes antioxydantes. Chez les juvéniles, aucune variation n'est enregistrée dans le foie ou le muscle, seule l'activité de la Cat diminue en hypoxie. Chez les adultes, la stratégie est différente, les réponses à l'hypoxie sont uniquement notées dans le foie où l'activité de la SOD augmente. En hypoxie aigüe, la capacité antioxydante diminue donc chez les juvéniles et augmente chez les adultes. Des différences de stratégies face à l'hypoxie sont aussi observées chez les autres espèces exposées à différents niveaux d'oxygène pour quelques heures (les auteurs ne précisent pas si ces niveaux d'oxygène sont inférieurs ou supérieurs à l' O_{2crit} des individus mais considèrent tout de même ces niveaux d'oxygène comme de l'hypoxie sévère). De plus, ces auteurs n'ont pas étudié les différences de réponses entre différents stades de développement comme dans mon étude, mais seulement entre espèces différentes. Par exemple, chez la carpe, après 5 h d'exposition à 25 % de saturation d'oxygène, l'activité de la GPx diminue dans le foie alors que les niveaux de Cat et de SOD ne varient pas (Lushchak *et al.*, 2005). Dans les autres tissus, il y a une augmentation des enzymes antioxydantes interprétée par Lushchak *et al.* (2001 ; 2005) comme une défense en cas d'augmentation brutale de ROS lors de la réoxygénation. L'exposition à l'hypoxie entraîne une augmentation de l'activité de la SOD dans le foie du tambour croca exposé quelques heures à différents niveaux de saturation d'oxygène (entre 10 et 100 % sat. ; Cooper *et al.*, 2002), alors que chez le carassin doré *Carassius auratus* exposé quelques heures à l'anoxie, c'est l'activité de la Cat qui augmente dans ce tissu (Lushchak *et al.*, 2001). Finalement, chez les dorades royales juvéniles *Sparus aurata* exposés quelques heures à une baisse graduelle d'oxygène, l'activité de la GPx augmente et celle de la SOD diminue (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012). Il est difficile de comparer ces résultats car les conditions expérimentales de chaque étude sont différentes. Toutes ces espèces ont un comportement pélagique et sont qualifiées de résistantes face à l'hypoxie, ce qui permet de les exposer à des niveaux d'oxygène très sévères ou même à l'anoxie. Face à de telles conditions, les réponses interspécifiques des enzymes antioxydantes sont variables. Chez les flétans du Groenland juvéniles, la diminution de l'activité de la Cat dans le muscle peut être interprétée comme une diminution de la capacité antioxydante dans ce tissu. Cependant, le maintien de l'activité élevée des autres enzymes dans le muscle et le foie peut

lui conférer une capacité suffisante pour protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs (Lushchak *et al.*, 2005). De plus, les animaux étaient à des niveaux d'oxygène inférieurs à O_{2crit} et leur consommation d'oxygène avait diminué (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a), ce qui devrait aussi limiter la production de ROS. Chez les adultes, il y a un maintien des fortes activités de toutes les enzymes antioxydantes étudiées ici, plus une augmentation de la SOD, ce qui indique le maintien de leur forte capacité antioxydante. Les adultes auraient aussi la capacité de se défendre contre l'apparition d'un éventuel stress oxydatif, en cas de ré-oxygénation par exemple, comme c'est le cas de la carpe (Lushchak *et al.*, 2001 ; Lushchak *et al.*, 2005). Cette capacité leur offre une plus grande résistance face aux variations d'oxygène.

L'analyse en parallèle des réponses enzymatiques et génomiques à l'hypoxie montre des différences entre ces réponses chez le flétan du Groenland. Dans la plupart des études, une seule de ces réponses est observée et on part du principe que les enzymes répondent dans le même sens que les gènes qui codent pour elles (Everett *et al.*, 2012). Cependant, il ne faut pas généraliser cette affirmation et toujours la vérifier (Nikinmaa et Rytkönen, 2011 ; Everett *et al.*, 2012 ; Nikinmaa et Rytkönen, 2012). En effet, le même niveau de protéine peut être formé avec une variation de 30 fois le niveau d'ARNm et le niveau de protéine produit peut varier de 20 fois avec le même niveau d'ARNm (Nikinmaa et Rytkönen, 2011). Ceci, ainsi que mes résultats, indique que l'expression de l'ARNm ne reflète pas forcément la quantité de protéines produites car il peut y avoir des processus intermédiaires mal connus à ce jour (Nikinmaa et Rytkönen, 2011, 2012). Des facteurs environnementaux ou des contaminants peuvent affecter l'efficacité de la traduction (Pytharopoulou *et al.*, 2008), ainsi que l'ARNm ou la stabilité de la protéine. Tout ceci peut avoir un impact sur le produit génique (Nikinmaa et Rytkönen, 2011). Il faut aussi prendre en compte que les réponses observées pendant les premières heures d'exposition, comme dans mon expérience, soient possiblement des réponses transitoires (Everett *et al.*, 2012) et que tous les processus n'ont pas forcément eu le temps de se mettre en place. Les résultats

de la présente étude semblent démontrer un effet inhibiteur de l'hypoxie sévère sur la traduction du brin d'ARNm en protéine.

Chez le flétan du Groenland, la stratégie de survie à l'exposition à une hypoxie aigüe, est une diminution de ses capacités métaboliques maximales dans le muscle, et d'une diminution du taux métabolique, ce qui est un processus souvent utilisé (Lushchak *et al.*, 2001). Cette observation est confirmée par les mesures de respirométrie qui indiquent bien que le taux métabolique des flétans du Groenland est inférieur à leur SMR (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a). Les adultes et les juvéniles ont pourtant des réponses légèrement différentes. Des stratégies différentes ont déjà été enregistrées chez d'autres espèces, comme par exemple chez deux espèces de cichlidés (*A. crassipinnis* et *S. aequifasciatus*) présentes dans l'Amazonie (Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Ces deux espèces ont des tolérances à l'hypoxie très élevées et utilisent toutes deux une combinaison d'une diminution métabolique et de l'augmentation de leur capacité anaérobie face à l'hypoxie. Cependant, des niveaux élevés de glycogène dans le muscle et le foie d'*A. crassipinnis* lui offrent des stocks énergétiques importants et lui confèrent une meilleure tolérance à la baisse en oxygène (Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Le flétan du Groenland semble capable de réguler son taux métabolique (*via* une diminution de la consommation d'oxygène) à de faibles niveaux d'oxygène, ce qui est interprété comme une tolérance élevée à l'hypoxie. Par exemple, le saumon atlantique *Salmo salar* est considéré comme un oxy-conforme, car ses taux métaboliques sont dépendants des concentrations d'oxygène du milieu (Barnes *et al.*, 2011). Son incapacité à réguler son taux métabolique le rend très sensible à l'hypoxie. Cependant, l'étude de Barnes *et al.* (2011) sur plusieurs populations de saumon atlantique en Tasmanie (sud-est de l'Australie) a montré que certaines étaient capables de réguler leur métabolisme de façon à leur conférer une meilleure tolérance à l'hypoxie. Chez le flétan du Groenland, les adultes sont cependant les seuls à avoir suffisamment d'énergie pour augmenter leur capacité antioxydante en hypoxie aigüe, ce qui leur confèrerait une plus grande résistance conformément à l'hypothèse formulée par Dupont-Prinet *et al.* (2013a) qui ont déterminé un seuil d'O_{2crit} des adultes à un niveau plus faible que celui des juvéniles

(11 % vs 15 % de saturation d'oxygène). Ces faibles O_{2crit} , ainsi que les résultats enzymatiques et génomiques, montrent bien que les flétans du Groenland sont des organismes très résistants à l'hypoxie. Mes résultats supportent l'hypothèse que les adultes seraient plus résistants alors que les juvéniles seraient à la limite de leur capacité métabolique aux niveaux d'hypoxie actuels dans l'estuaire du Saint-Laurent. En effet, le niveau d'oxygène dans les eaux profondes de l'estuaire peut atteindre 20 % sat. (Gilbert *et al.*, 2007), ce qui est très proche de la valeur d' O_{2crit} chez les juvéniles. Si les conditions d'oxygène se détérioraient encore dans l'estuaire, la distribution de ce groupe pourrait être modifiée (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a).

Dans le milieu naturel, bien que les flétans du Groenland soient des poissons plats bathypélagiques (Scott et Scott, 1988), leur régime alimentaire se compose de plusieurs proies mésopélagiques en plus des proies benthiques typiques d'un poisson plat (Rodriguez-Marin *et al.*, 1995 ; Jørgensen, 1997 ; Solmundsson, 2007 ; Vollen et Albert, 2008 ; Albert *et al.*, 2011). Les juvéniles ont parfois un comportement pélagique pour aller chercher des proies (Jørgensen, 1997 ; Vollen et Albert, 2008). Ce comportement alimentaire est aussi observé dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, où les flétans du Groenland sont connus pour s'alimenter principalement de la crevette nordique, du capelan, d'euphausiacés, de mysidacés et d'amphipodes hyperidéens (Fréchet, 1987 ; Savenkoff *et al.*, 2009 ; Bernier et Chabot, 2012). Cette caractéristique permettrait à ces animaux non seulement de s'alimenter, mais aussi de remonter dans des zones moins hypoxiques et de profiter de conditions d'oxygène plus favorables (Albert *et al.*, 2011). Ceci leur permettrait de combler leur dette en oxygène au besoin et d'augmenter leur registre aérobie, ce qui leur donnerait la possibilité de produire un effort de nage plus important et de se nourrir plus facilement. Le fait de remonter dans une zone normoxique peut aussi entraîner une ré-oxygénation des organismes, ce qui peut provoquer un stress oxydatif, mais les flétans du Groenland devraient être capables de faire face à une telle contrainte car leur capacité antioxydante est très élevée.

CHAPITRE 4

IMPACTS DE DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE SUR LE MÉTABOLISME DES FLÉTANS DU GROENLAND JUVÉNILES *REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES*

4.1 RÉSULTATS

Le chapitre 4 porte sur les résultats obtenus chez les flétans du Groenland juvéniles en réponse à différents niveaux de stress hypoxique chronique. Tel qu'expliqué dans la partie "Matériel et méthodes", les résultats entre activité totale et activité spécifique étant corrélés, seule l'activité totale est présentée dans ce chapitre. Les résultats d'activité spécifique sont présentés à l'annexe VIII.

Chez les flétans du Groenland juvéniles, le muscle est le seul tissu où ont été observées des variations au niveau de l'activité enzymatique lors d'une exposition d'une semaine à différents niveaux d'oxygène. Au contraire, au niveau génique, les réponses n'ont été observées que dans le foie.

Dans le muscle, les concentrations en protéines variaient avec les niveaux de saturation d'oxygène (tableau 17 ; $F_{[3,36]} = 4,7$; $p = 0,007$). Plus l'oxygène diminuait, plus les concentrations en protéines étaient élevées avec 34,7 % d'augmentation comparativement à la normoxie. Chez le groupe exposé à 40 % sat., des concentrations intermédiaires ont été observées. Dans le foie, les concentrations en protéines n'ont pas montré de différence significative entre les traitements quelque soit le niveau de saturation d'oxygène.

Tableau 17 : Concentration de protéines (mg/g de tissu humide) dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type, n = 10). Des lettres différentes indiquent des différences significatives propres au tissu.

Tissu	100 % sat.	40 % sat.	30 % sat.	20 % sat.
muscle	151,6 \pm 9,8 ^a	174,3 \pm 12,5 ^{ab}	209,8 \pm 12,9 ^b	199,3 \pm 2,5 ^b
foie	225,4 \pm 10,1	231,8 \pm 10,1	227,5 \pm 11,4	242 \pm 5,8

Pour toutes les enzymes analysées dans le muscle (CS, LDH et PK), des diminutions d'activité ont été observées après une semaine d'exposition aux différents niveaux d'oxygène. Pour les enzymes intervenant dans le métabolisme aérobie, l'activité spécifique de la CS a été de 45,4 % plus faible chez les trois groupes exposés à l'hypoxie par rapport à celle du groupe en normoxie (figure 23 ; $F_{[3,34]} = 5,2$; $p = 0,005$), même si l'activité totale n'a pas été modifiée. L'expression des gènes codant pour ces deux enzymes n'a pas montré de différence significative entre les traitements dans le muscle (figure 24).

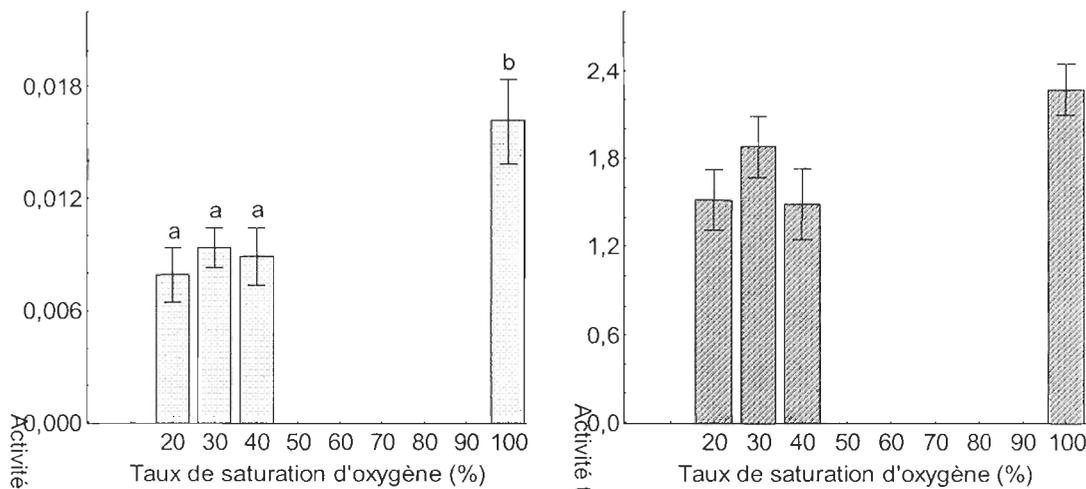


Figure 23 : Activité enzymatique spécifique et totale de la citrate synthase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type, n = 9 pour les groupes à 20 % et 30 % et n = 10 pour les groupes à 40 % et 100 %). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

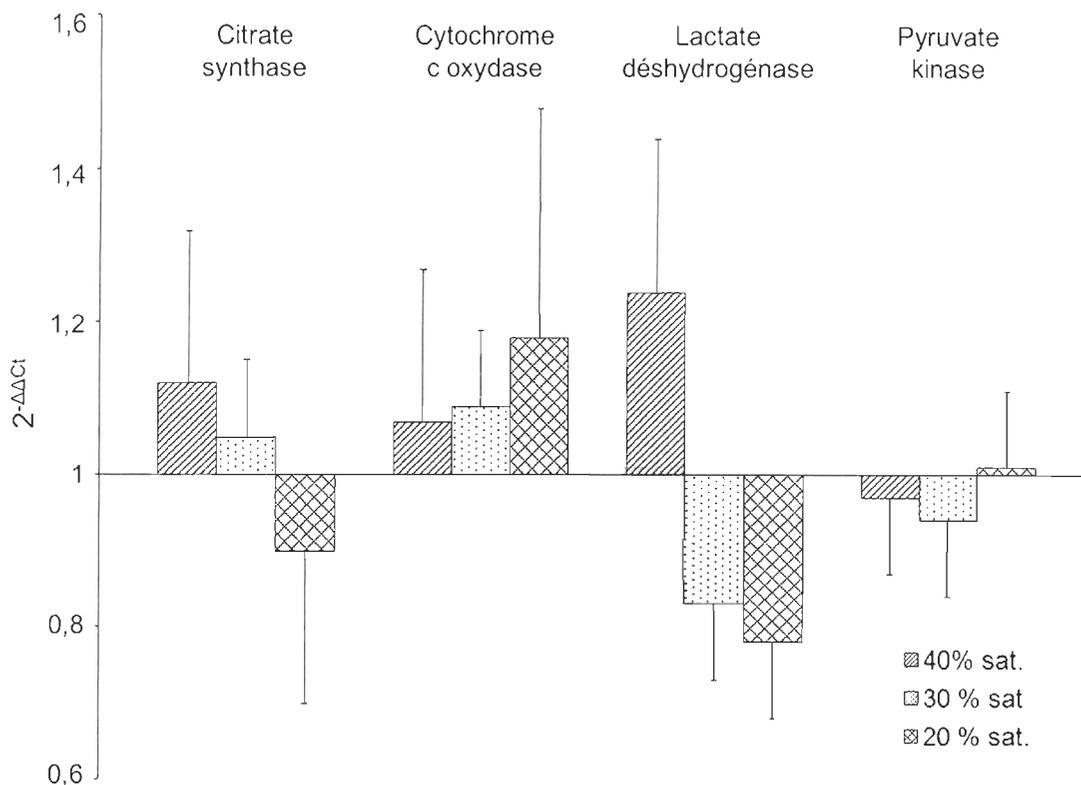


Figure 24 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin (dont la valeur est ajustée à 1) des gènes codant pour la citrate synthase, la cytochrome c oxydase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type, $n = 10$)

La mesure d'activité des enzymes glycolytiques dans le muscle, la LDH et la PK indiquait une diminution d'activité lors d'une exposition chronique à l'hypoxie. L'activité totale de ces deux enzymes était similaire entre les trois groupes exposés à l'hypoxie mais significativement plus faible que celle du groupe témoin (figure 25). Pour la LDH, les groupes en hypoxie ont eu une activité totale qui a diminué de 57,3 % par rapport au groupe témoin ($F_{[3,36]} = 17,9$; $p < 0,001$). Chez la PK, cette diminution était de 46,4 % ($F_{[3,36]} = 12,2$; $p < 0,001$). L'expression des gènes codant pour la LDH et de la PK n'a pas montré de différence significative entre les traitements dans le muscle (figure 24).

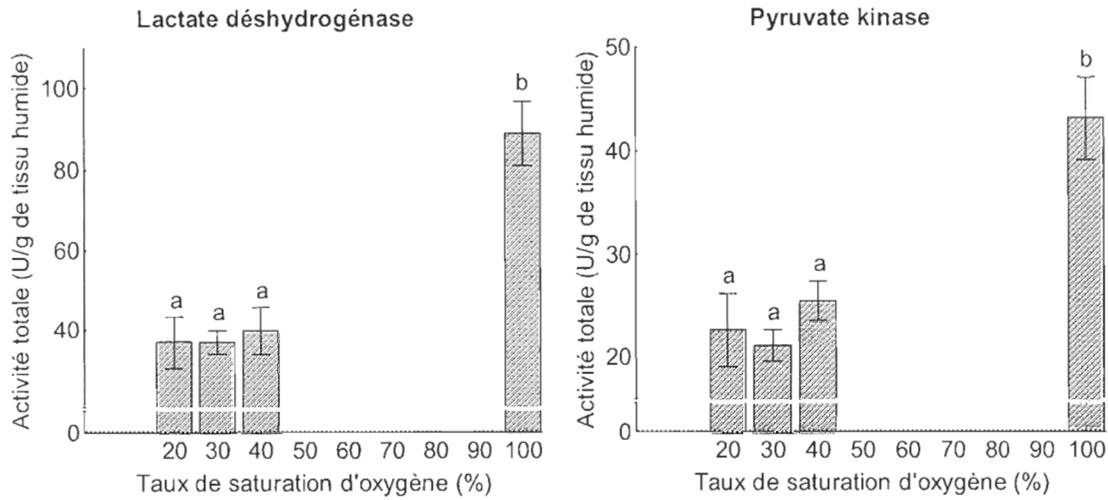


Figure 25 : Activité enzymatique totale de la lactate déshydrogénase et de la pyruvate kinase dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type, $n = 10$). Des lettres différentes indiquent des différences significatives

L'activité totale de la PEPCK dans le foie n'a pas montré de différence significative entre les traitements (tableau 18). Par contre, l'expression du gène codant pour la PEPCK était significativement plus élevée chez les trois groupes exposés à 20, 30 et 40 % sat. par rapport au groupe resté en normoxie (figure 26 ; $F_{[3,36]} = 8$; $p < 0,001$). Ceci représentait une augmentation de l'expression de ce gène de 156,6 % en hypoxie.

Tableau 18 : Activité enzymatique totale (U/g de tissu humide) dans le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours (moyenne \pm erreur type, $n= 10$ sauf pour la mesure de la SOD chez les témoins et celle de la GPx chez le groupe à 40 % où $n = 9$)

Enzyme	100 % sat.	40 % sat.	30 % sat.	20 % sat.
Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,78 \pm 0,04	0,71 \pm 0,04	0,75 \pm 0,03	0,67 \pm 0,02
Glutathion peroxydase	1,52 \pm 0,1	1,27 \pm 0,1	1,03 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2
Superoxyde dismutase	1409,7 \pm 218,8	1162 \pm 257,6	1557,3 \pm 384	899,6 \pm 181,9

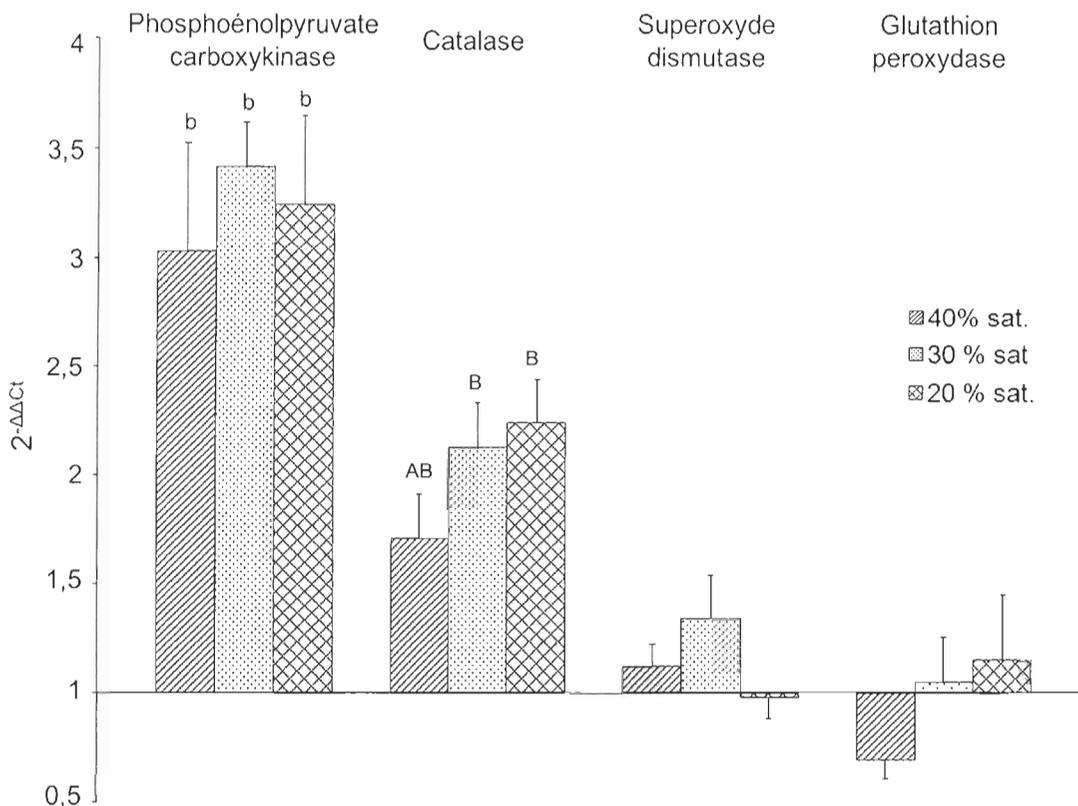


Figure 26 : Expression relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) au groupe témoin (dont la valeur est ajustée à 1) des gènes codant pour la phosphoenolpyruvate carboxykinase, la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase dans le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à différents niveaux d'oxygène pendant 7 jours ($n = 10$). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements pour un gène donné

L'activité totale des enzymes antioxydantes, là encore, n'a pas varié dans le foie malgré l'exposition chronique à l'hypoxie (tableau 18). L'expression génique de la Cat a augmenté de façon significative lorsque l'oxygène a diminué (figure 26 ; $F_{[3,36]} = 6,6$; $p = 0,001$). Son expression chez les groupes à 20 et 30 % sat. était plus élevée de 91,7 % par rapport à celle du groupe témoin. L'expression du groupe exposé à 40 % sat. était intermédiaire. Les expressions géniques de la SOD et de la GPx n'ont pas varié avec le niveau d'oxygène (figure 26).

4.2 DISCUSSION

Les flétans de Groenland sont des organismes tolérants à l'hypoxie. Cette caractéristique est confirmée par leur abondance dans les eaux profondes du Saint-Laurent (DFO, 2010 ; Aït Youcef *et al.*, 2013) et leur très basse O_{2crit} (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a). Dans le chapitre 3, les réponses enzymatiques et génomiques des flétans du Groenland adultes et juvéniles à une exposition aiguë à l'hypoxie ont été étudiées. Chez les juvéniles, l'exposition à une hypoxie aiguë résulte en une diminution de l'activité de la LDH et de la Cat dans le muscle, ce qui suggère que ces poissons diminuent leurs capacités métaboliques maximales, possiblement suite à une baisse de la demande énergétique dans ce tissu ou encore à une réponse de régulation engendrée par des coûts métaboliques de base plus élevés. Pour répondre à cette question, des mesures de consommation d'oxygène aurait été souhaitables. Cependant, dans cette expérience à court terme, les autres activités enzymatiques ne varient pas, avec par exemple de très forts niveaux d'activité pour les enzymes antioxydantes et une augmentation de l'expression des gènes de la COX et de la LDH dans le muscle, ce qui montre leur capacité de survie élevée à de faibles niveaux d'oxygène pour de courtes périodes. Cependant, en milieu naturel, les organismes ne peuvent pas toujours éviter les zones hypoxiques. De plus, dans le Saint-Laurent, les couches profondes où vivent les flétans du Groenland juvéniles demeurent hypoxiques tout au long de l'année. C'est pourquoi dans ce chapitre, l'exposition des juvéniles à des niveaux intermédiaires de saturation d'oxygène pendant plusieurs jours a été étudiée. Ceci indique que les réponses enzymatiques et génomiques à court et long terme ne sont pas les mêmes. Plusieurs hypothèses ont été émises pour ce chapitre. Tout d'abord, le seuil de 20 % sat. étant proche du seuil d' O_{2crit} des organismes, les hypothèses restent les mêmes que pour le chapitre 3, à savoir que les organismes exposés à 20 % sat. diminueraient l'activité des enzymes aérobie pour augmenter celle des enzymes anaérobies. Il y aurait alors une baisse de la production de ROS suite à la diminution de l'utilisation de la chaîne respiratoire et la capacité antioxydante diminuerait. Aux niveaux d'oxygène supérieurs (30 et 40 % sat.), la contrainte hypoxique étant moins importante sur les organismes, l'hypothèse émise était qu'à ces niveaux d'oxygène, les organismes seraient capables d'avoir des capacités aérobie

et anaérobie similaires à celles observées en normoxie. Les animaux étant en hypoxie mais probablement à SMR, la production de ROS serait identique, sinon plus faible, qu'en normoxie et l'augmentation de la capacité antioxydante ne serait pas nécessaire. Dans cette partie, les résultats des analyses du métabolisme aérobie et anaérobie vont être discutés en expliquant pourquoi ils ne confirment que partiellement mes hypothèses. Ensuite, la même démarche est effectuée concernant les résultats des défenses antioxydantes, où là encore, l'hypothèse de départ n'est pas supportée.

L'activité des enzymes du métabolisme aérobie est faible dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles. Cette caractéristique est retrouvée chez plusieurs autres espèces de poissons, telle que le turbot où l'activité de la CS est de $0,5 \pm 0,14$ U/g de tissu et celle de la COX est de $0,74 \pm 0,11$ U/g de tissu dans le muscle (Abele *et al.*, 2007). Ces faibles valeurs sont normales dans le muscle car l'activité des enzymes du métabolisme aérobie est liée à la densité de mitochondries (Abele *et al.*, 2007). Le muscle ayant une fonction principalement anaérobie, la quantité de mitochondrie y est plus faible et la capacité aérobie aussi.

Une exposition de plusieurs jours à l'hypoxie entraîne dans le muscle une diminution de l'activité spécifique de la CS chez les flétans du Groenland juvéniles, quel que soit le niveau d'hypoxie, ce qui vient à l'encontre de mon hypothèse de départ. Comme c'est l'activité spécifique de la CS et non l'activité totale qui diminue, cela signifie que ce n'est pas le nombre de molécules enzymatiques qui diminue dans le muscle mais bien l'activité de la molécule elle-même. Des diminutions d'activité ont déjà été remarquées dans le muscle du tambour croca exposé plusieurs jours à 25 % et 50 % sat. (Cooper *et al.*, 2002) et dans le muscle de la carpe après 24 h d'exposition à environ 5,8 % sat. ($0,5$ mg O_2/L ; Zhou *et al.*, 2000). Chez le tambour croca, l'activité de la CS diminue de façon linéaire avec l'oxygène alors que chez le flétan du Groenland, les activités de CS des trois groupes exposés à 20 %, 30 % et 40 % sat. sont similaires. Ceci laisse penser que chez le flétan du Groenland, la capacité aérobie diminue à partir d'un seuil d'oxygène situé entre 100 % et

40 % sat.. De plus, dans le chapitre 3, aucune diminution d'activité de la CS n'avait été enregistrée. Il est possible que les juvéniles soient capables de maintenir les niveaux de CS dans le muscle lors d'une hypoxie aigüe (exposés durant $2,4 \pm 0,6$ heures sous le seuil d' O_{2crit}), malgré le niveau d'oxygène critique, ou encore que l'activité des enzymes a eu le temps de se modifier dans cette deuxième expérience plus longue. Comme on sait que le registre aérobie des juvéniles de flétans du Groenland diminue en hypoxie (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a), on peut supposer que cette baisse du registre aérobie est liée à la diminution d'activité enzymatique, laquelle reflèterait l'activité métabolique maximale. Aucune autre réponse, que ce soit au niveau enzymatique ou génomique, n'est enregistrée dans le muscle du flétan du Groenland juvénile après plusieurs jours d'exposition à différents niveaux d'hypoxie. Chez d'autres espèces, plusieurs jours d'hypoxie entraînent une augmentation de l'expression du gène de la COX, comme par exemple dans le muscle du gobie *G. mirabilis* (6 jours d'exposition à 10 % sat. ; Gracey *et al.*, 2001) ou de la carpe (une semaine d'exposition à environ 5,5 % sat. ; Zhou *et al.*, 2000) et dans les branchies de la morue franche (24 jours d'exposition à moins de 45 % sat. ; Hall *et al.*, 2009). Chez les juvéniles de flétan du Groenland, une augmentation de l'expression de ce gène avait été notée dans le muscle lors de l'exposition aigüe à l'hypoxie mais ce n'est plus le cas après plusieurs jours en hypoxie moins sévère. Ceci appuie l'hypothèse mentionnée plus haut, comme quoi une exposition plus longue à l'hypoxie forcerait les flétans juvéniles à économiser plus d'énergie et qu'ils ne pourraient donc plus réguler à la hausse l'expression de certains gènes. Il y a peut être aussi des processus intermédiaires peu connus entre l'expression du gène et l'activité de l'enzyme pour lequel il code (Nikinmaa et Rytönen, 2011, 2012). Il est possible que des facteurs environnementaux tels que l'hypoxie ait un effet sur les processus de transcription (Olsvik *et al.*, 2006). La transcription est le processus par lequel un ribosome lit les différents codons d'un brin d'ARNm pour lier les acides aminés correspondant à chacun de ces codons, processus aboutissant à une chaîne polypeptidique et donc à une protéine. L'hypoxie pourrait par exemple affecter la qualité du brin d'ARNm, la capacité du ribosome à lire les codons ou à produire des peptides de bonne qualité.

Comme ces différents paramètres n'ont pas été mesurés dans la présente étude, ma compréhension des différentes réponses aux niveaux enzymatique et génomique est limitée.

Chez les flétans du Groenland exposés une semaine à différents niveaux d'hypoxie une diminution de l'activité des enzymes glycolytiques (LDH et PK) est observée dans le muscle. Cette diminution ne permet pas d'augmenter la capacité glycolytique en hypoxie (Abbaraju et Rees, 2012), comme c'est le cas chez la sole qui passe brutalement au métabolisme anaérobie et stoppe sa locomotion en hypoxie (Dalla Via *et al.*, 1998). Cependant, les réponses chez les flétans du Groenland sont compréhensibles étant donné que les enzymes glycolytiques ont des résultats très variables dans le muscle selon les espèces, le temps et l'intensité d'exposition (Abbaraju et Rees, 2012). Contrairement à ce qu'on pourrait penser, il est assez rare d'observer une augmentation des enzymes glycolytiques dans le muscle. Chez plusieurs espèces, comme la carpe exposée plusieurs jours à environ 5,8 % sat. (0,5 mg O₂/L, Zhou *et al.*, 2000) ou le choquemort *Fundulus heteroclitus* exposé jusqu'à 35 jours à environ 17,2 ou 28,7 % sat. (respectivement 1,5 ou 2,5 ppm, Greaney *et al.*, 1980), l'activité de la LDH dans le muscle ne varie pas. Ceci peut s'expliquer par le fait que le muscle blanc a déjà une forte capacité glycolytique et serait ainsi adapté à l'hypoxie (Greaney *et al.*, 1980). Très souvent, une diminution de l'activité de la LDH dans le muscle est observée après plusieurs jours en hypoxie, par exemple, chez le fondule (Martínez *et al.*, 2006), chez le choquemort (Abbaraju et Rees, 2012) ou chez la carpe (Zhou *et al.*, 2000). Chez le fondule, une diminution de l'activité de la PK est aussi observée dans le muscle en réponse à une exposition longue à l'hypoxie (Martínez *et al.*, 2006). Ces diminutions de capacité anaérobie, que l'on retrouve chez les flétans du Groenland juvéniles permettraient de réduire les dépenses énergétiques de l'organisme (Zhou *et al.*, 2000 ; Martínez *et al.*, 2006). Chez les flétans du Groenland juvéniles, les trois groupes exposés à l'hypoxie ont des niveaux d'activités similaires, ce qui laisse penser que la diminution d'activité ne diminue pas de façon linéaire avec l'oxygène mais à partir d'un certain seuil situé entre 40 % et 100 % sat.. Sachant que le métabolisme maximal diminue de façon linéaire avec le niveau

d'oxygène dissous (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a), ces résultats enzymatiques sont un peu surprenants. Il serait intéressant de refaire ces analyses sur un nombre d'individus plus élevé pour voir si les résultats obtenus correspondent. De plus, une exposition aigüe à l'hypoxie avait provoqué seulement une diminution de l'activité de la LDH et pas de celle de la PK chez les juvéniles (chapitre 3). Ceci laisse penser qu'une exposition prolongée oblige les flétans du Groenland juvéniles à diminuer leur capacité métabolique de façon plus importante, comme cela avait été suggéré plus haut.

Aucune réponse d'activité de la PEPCK n'est observée dans le foie en réponse à l'hypoxie. Par contre, l'expression du gène de la PEPCK est plus importante chez les trois groupes exposés à 20 %, 30 % et 40 % sat., comparativement au groupe témoin. Cette réaction va dans le même sens que ce qui a déjà été observé au niveau enzymatique dans le foie du fondule après quatre semaines d'exposition à l'hypoxie (Martínez *et al.*, 2006), même si la relation ARN - enzyme n'est pas forcément directe et qu'il faudrait la vérifier. Ainsi, malgré l'hypoxie prolongée, les flétans du Groenland juvéniles auraient encore suffisamment d'énergie pour réguler l'expression de certains gènes. Il est aussi possible que certains organes aient la priorité par rapport à d'autres pour l'apport en oxygène et que le foie soit prioritaire par rapport au muscle. Dans ce cas, la diminution métabolique toucherait en priorité le muscle, alors que dans le foie, si l'approvisionnement en oxygène est maintenu, moins d'ajustements métaboliques seraient requis.

Dans le foie des flétans du Groenland juvéniles, aucune réponse des enzymes antioxydantes n'est observée lors d'une exposition longue à l'hypoxie. Dans la plupart des autres études, des augmentations de l'activité de ces enzymes sont enregistrées (Lushchak et Bagnyukova, 2006), comme par exemple une augmentation de l'activité de la SOD chez le tambour croca exposé durant 12 h à 10 % ou 25 % sat. (Cooper *et al.*, 2002). Selon Ross *et al.* (2001), le fait de posséder une capacité antioxydante importante serait un des mécanismes permettant aux organismes estuariens de diminuer leurs coûts énergétiques pour vivre dans ces zones variables. Cependant, ces auteurs ne précisent pas si ces niveaux

d'oxygène sont inférieurs ou non à l' O_{2crit} des individus, ils considèrent que 10 % sat. est une hypoxie sévère et 25 % sat. une hypoxie modérée. Durant l'expérience, les flétans du Groenland étaient exposés à des niveaux d'oxygène dissous leur permettant normalement d'utiliser leur métabolisme aérobie, au moins à 30 et 40 % sat., même s'il a été démontré plus haut que leur capacité aérobie maximale était réduite. Par conséquent, la production de ROS restait équivalente ou diminuait légèrement par rapport à celle en normoxie. Les flétans du Groenland n'augmentent pas leur capacité antioxydante, ce qui semble logique. De plus, le maintien d'une importante capacité antioxydante (notamment au niveau de l'activité de la SOD) leur confère une bonne protection contre les variations d'oxygène (ou ré-oxygénation), qui pourraient modifier la production de ROS. À 20 % de sat., comme la consommation d'oxygène devrait être plus réduite, la production de ROS devrait diminuer et il n'y a aucune raison d'augmenter le niveau de défense antioxydante.

Par contre, au niveau des analyses génomiques, une augmentation de l'expression du gène de la Cat est observée chez les flétans du Groenland juvéniles exposés aux différents niveaux de saturation d'oxygène pendant une semaine. Cette augmentation est progressive comme le montre l'expression de la Cat du groupe à 40 % sat. similaire à celles de tous les autres groupes. D'autres études montrent une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes chez des espèces exposés à une longue période d'hypoxie. Dans le foie de la morue franche, les gènes codants pour la SOD et la GPx sont moins exprimés chez les individus exposés à six semaines d'hypoxie modérée (46 % sat.) par rapport aux témoins en normoxie (Olsvik *et al.*, 2006) et c'est la même chose pour les gènes codants pour la Cat et la GPx dans les branchies de civelles d'anguille européenne *Anguilla anguilla* (Pierron *et al.*, 2007). Selon les auteurs, ce phénomène serait dû à une diminution du stress oxydatif ou à un effet inhibiteur de l'hypoxie sur la transcription. Ceci n'étant pas observé chez les flétans du Groenland juvéniles, il n'y aurait pas de tels effets chez cette espèce.

La dernière réponse observée chez les flétans du Groenland exposés une semaine à différents niveaux de saturation d'oxygène est une augmentation progressive des concentrations en protéines lorsque l'oxygène diminue. Généralement, lorsqu'il y a une diminution du métabolisme, comme en hypoxie, une diminution de la synthèse des protéines est observée, ce qui permet à l'organisme de diminuer ses dépenses énergétiques (Lewis et Driedzic, 2010). Chez le flétan du Groenland, il est possible que l'organisme ne soit pas forcé d'arriver à de telles extrémités car il a encore suffisamment d'oxygène à ce stade. En effet, Dupont-Prinet *et al.* (2013a) ont montré que jusqu'à 23 % sat., le registre aérobie des flétans du Groenland juvéniles diminuait de 56 % par rapport à celui enregistré en normoxie. À ces niveaux d'oxygène, il est donc compréhensible que l'organisme ne doive pas faire de compromis au niveau de la synthèse protéique. Par contre, il est plus étonnant qu'une telle diminution de cette synthèse ne soit pas observée à 20 % de saturation car Dupont-Prinet *et al.* (2013a) ont montré qu'à 19 % sat., le registre aérobie diminuait cette fois de 73 %. Il est aussi possible que le stress provoqué par l'hypoxie entraîne une perte d'eau dans les tissus (Mazeaud *et al.*, 1977) et donc une impression que la concentration en protéines augmente par rapport au poids du tissu de départ lors de l'analyse.

En conclusion, l'hypothèse de départ comme quoi les enzymes reflèteraient la diminution du métabolisme aérobie et l'augmentation du métabolisme anaérobie en hypoxie est peut être un peu trop simpliste (Cooper *et al.*, 2002). Chez les flétans du Groenland juvéniles, l'exposition à l'hypoxie durant une semaine entraîne principalement une stagnation ou une diminution des capacités métaboliques maximales. Ces diminutions peuvent être liées à la diminution de la locomotion (Martínez *et al.*, 2006) et plusieurs études ont montré que les poissons étaient moins mobiles en hypoxie (Dalla Via *et al.*, 1998 ; Chabot et Dutil, 1999 ; Wannamaker et Rice, 2000). Ceci permettrait principalement aux organismes de limiter leurs dépenses énergétiques et d'augmenter leur temps de survie en hypoxie. Chez les juvéniles, l'exposition à une hypoxie chronique entraîne la diminution de processus plus nombreux que lors d'une exposition aiguë à l'hypoxie (chapitre 3). On ne

peut pas vraiment vérifier s'il y a une acclimatation au fur et à mesure du temps avec les données disponibles ici. Cependant, dans cette étude, le flétan du Groenland est affectée de la même manière quelque soit le niveau d'hypoxie chronique (40, 30 ou 20 % sat.). Or dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, le flétan du Groenland se retrouve dans des conditions d'oxygène entre 30 et 40 % sat. pour les adultes et même entre 20 et 25 % sat. pour les juvéniles. Comme une réponse identique est observée à 20 % sat., ce qui est très proche de la valeur d' O_{2crit} des flétans, ceci démontre en premier lieu que cette espèce est très résistante aux conditions hypoxiques. De plus, dans le milieu naturel, il est fort probable que le flétan du Groenland soit capable de s'adapter et de s'ajuster au niveau physiologique, vu qu'il survit à dans des zones où les conditions d'oxygène sont identiques à celles de mon étude. Ceci expliquerait les fortes populations de flétan du Groenland retrouvées dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent malgré les faibles taux d'oxygène enregistrés dans cette région.

Comme dans de précédentes études (Martínez *et al.*, 2006 ; Everett *et al.*, 2012), plus de réponses au niveau enzymatique sont observées dans le muscle que dans le foie. Il est donc possible que le foie soit privilégié par rapport au muscle pour l'apport en oxygène. En effet, les tissus les plus importants reçoivent de l'oxygène en priorité lors d'une limitation de ce paramètre, ce qui explique que les réponses apparaissent tout d'abord dans les tissus considérés comme moins importants au niveau vital (Martínez *et al.*, 2006 ; Everett *et al.*, 2012). Durant mes expériences, l'activité locomotrice des organismes était nulle quand ces derniers étaient observés. En éliminant les processus coûteux en énergie tels que la nage, ils limitent leurs dépenses énergétiques. La fonction locomotrice du muscle n'étant plus utilisée (ce tissu fonctionnant principalement en anaérobie), l'apport en oxygène vers ce tissu peut être réduit en hypoxie, ce qui n'est pas le cas du foie qui doit maintenir ses fonctions de dégradations de produits métaboliques, tout du moins, au début de la phase hypoxique. La diminution de certains processus par rapport à d'autres est peut être aussi due à la quantité d'énergie que ces derniers utilisent. Chez le médaka *Oryzias latipes*, les

processus métaboliques utilisant beaucoup d'énergie sont inhibés en hypoxie et ceux impliquant une sauvegarde de l'énergie sont augmentés (Ju *et al.*, 2007).

L'augmentation de l'expression de certains gènes chez les flétans juvéniles suggère que ceux-ci ne diminuent pas l'utilisation de tous les processus. Malgré l'exposition prolongée à l'hypoxie, ils semblent encore capables de mettre en place certaines défenses et seraient plutôt résistants à la baisse en oxygène. De plus, comme expliqué précédemment (chapitre 3), les flétans du Groenland juvéniles ont parfois un comportement pélagique pour capturer des proies (Fréchet, 1987 ; Savenkoff *et al.*, 2007 ; Vollen et Albert, 2008 ; Albert *et al.*, 2011 ; Aït Youcef *et al.*, 2013). Ils ont alors accès à des zones moins hypoxiques. Le retour à l'hypoxie leur donnerait la possibilité de récupérer de la dette en oxygène au besoin et d'augmenter leur registre aérobie pour avoir une possibilité plus importante de capture des proies.

Pour finir, comme dans le chapitre précédent (chapitre 3), des différences entre réponses enzymatiques et géniques sont observées. Mais comme expliqué par certains auteurs, même si on part du principe que les gènes qui codent pour les enzymes répondent dans le même sens que ceux-ci (Everett *et al.*, 2012), ce n'est pas toujours le cas (Nikinmaa et Rytkönen, 2011, 2012). Il advient donc de toujours évaluer cette affirmation de façon plus précise. Comme expliqué précédemment (chapitre 3), il est possible que l'hypoxie ait un effet inhibiteur sur le processus de traduction (lorsque le ribosome lit le brin d'ARNm pour produire une protéine). Il est aussi possible que les réponses au niveau enzymatique et génique n'apparaissent pas aussi rapidement l'une que l'autre. Par exemple, il se pourrait qu'au départ, le changement d'activité enzymatique enregistré soit en fonction des enzymes présents. Il y aurait ensuite un ajustement de l'expression génique pour répondre aux changements du milieu et plus tard, un ajustement de l'activité enzymatique en fonction de la réponse génique (Ton *et al.*, 2002). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait faire une expérience sur une plus longue période et faire des échantillonnages à différents intervalles de temps.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce travail, deux organismes estuariens, la crevette nordique et le flétan du Groenland, ont été exposés à deux types d'hypoxie, une hypoxie très sévère de courte durée (quelques heures) et une hypoxie plus modérée sur plusieurs jours. Chez la crevette, la réponse a été étudiée pour deux stades de développement différents, les mâles et les femelles. En effet, la crevette est une espèce protandre, donc les mâles se transforment en femelles après quelques années de croissance. Chez le flétan, les réponses entre juvéniles et adultes ont été comparées sans faire de distinction entre les sexes, car ce paramètre était impossible à déterminer au début de l'expérience. Deux tissus ont été visés spécifiquement pour cette étude : le muscle, tissu impliqué principalement dans la locomotion et qui est capable de fonctionner à de hauts taux métaboliques (Bennett, 1978 ; Hochachka, 1985), et le foie/hépatopancréas qui a un rôle important au niveau de la détoxification et la dégradation des produits métaboliques et qui est très sensible au stress oxydatif (Ruppert *et al.*, 2004).

RÉPONSES DE LA CREVETTE NORDIQUE À L'HYPOXIE

Chez la crevette nordique, l'exposition aiguë à une hypoxie très sévère cause des réponses différentes chez les mâles et les femelles. C'est dans le tissu musculaire plutôt qu'au niveau hépatique que les différences sont les plus marquées. Ceci pourrait être dû au fait que le foie serait priorisé pour l'apport en oxygène par rapport au muscle.

Dans le muscle des femelles, il y a une diminution de la capacité aérobie maximale (diminution de l'activité spécifique de la CS) en réponse à une exposition aiguë (figure 27). En effet, la CS intervenant dans le cycle de Krebs (figure 3), on peut présumer que les femelles ont une capacité aérobie moindre. Cependant, les niveaux de COX, enzyme qui intervient dans la chaîne respiratoire, ne varient pas par rapport au groupe témoin. Comme

le cycle de Krebs fait partie intégrante du processus de la chaîne respiratoire (figure 2), on peut penser que si ce dernier est limité, le processus de phosphorylation oxydative l'est aussi. Bien que l'activité mesurée de la COX ne varie pas par rapport au groupe témoin, il est possible que la chaîne respiratoire n'utilise pas ces enzymes à leur capacité maximale et soit limitée par la diminution de l'utilisation du cycle de Krebs. Étant donné que les crevettes sont exposées à un niveau d'oxygène inférieur à leur O_{2crit} (niveau d'oxygène minimum auquel les organismes peuvent maintenir leur SMR), cette diminution de la capacité aérobie maximale était attendue, notamment parce que les niveaux d'oxygène devraient ne plus être suffisants pour permettre l'apport d'énergie nécessaire au maintien des fonctions vitales de l'organisme. Cependant, chez les femelles exposées de façon aiguë à des niveaux d'oxygène sévères, une diminution de la capacité glycolytique dans le muscle, soit la baisse de l'activité de la LDH et de la PK (figure 27), est aussi observée. Comme la PK intervient dans le processus de glycolyse et que la LDH permet celui de fermentation, mécanismes qui permettent de produire de l'énergie en absence d'oxygène, une baisse d'activité de ces deux enzymes indiquerait que les crevettes femelles ont moins la capacité de produire de l'énergie *via* ces processus.

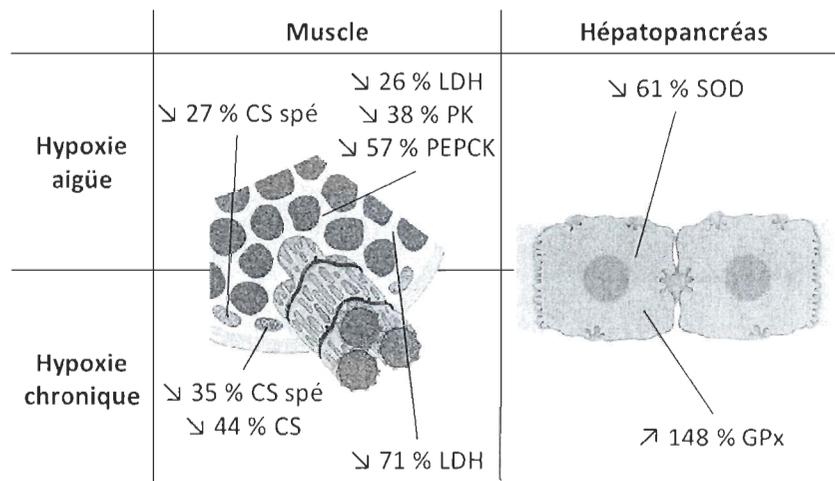


Figure 27 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques femelles exposées à l'hypoxie aiguë ou chronique (↘ = diminution d'activité et ↗ = augmentation d'activité)

À ce niveau d'oxygène sévère, les crevettes femelles semblent donc diminuer à la fois leurs capacités métaboliques aérobie et anaérobie. Ces régulations à la baisse, comme la diminution du taux métabolique mesurée en respirométrie qui démontrent que le métabolisme des crevettes est inférieur au SMR, permettraient à la crevette nordique d'économiser de l'énergie. Cette économie d'énergie serait une stratégie de survie de la crevette nordique à ce niveau d'oxygène sévère.

Le processus de dépression métabolique est défini comme une diminution du métabolisme sous le seuil de SMR et soutenable pendant une longue période (Guppy et Withers, 1999). Bien que de nombreux organismes utilisent ce processus face à un stress intense, il n'est cependant pas encore bien connu à ce jour (Bickler et Buck, 2007). Ce processus serait la stratégie la plus protectrice face à l'hypoxie, permettant à l'organisme de conserver l'énergie *via* la diminution de processus coûteux en énergie (par exemple, la synthèse de protéines), de limiter l'accumulation de produits toxiques et donc d'augmenter le temps de survie (Hochachka, 1986 ; Hochachka *et al.*, 1996 ; Guppy et Withers, 1999 ; Boutilier, 2001 ; Hochachka et Lutz, 2001 ; Larade et Storey, 2009). Il a été démontré que la dépression métabolique est plus efficace face à l'hypoxie que l'accumulation de glycogène ou l'utilisation de la fermentation anaérobie. Ces deux derniers mécanismes augmentent la tolérance à l'hypoxie/anoxie d'un facteur 3 à 4 alors que la dépression métabolique peut l'augmenter d'un facteur 20, comme chez les espèces de *Mytilus*, ou même d'un facteur de 60 comme chez les tortues (Hochachka, 1986 ; Hochachka et Lutz, 2001). Face à une longue exposition à de faibles concentrations en oxygène dissous, certains auteurs affirment que les organismes utilisent la dépression métabolique (Bickler et Buck, 2007).

Ce volet de mon étude a été réalisé à des niveaux très sévères d'oxygène dissous auxquels les animaux sont restés exposés au moins une heure, ce qui les oblige à diminuer leur métabolisme, comme le prouve leur consommation d'oxygène sous leur SMR. Cette affirmation est confirmée par d'autres auteurs expliquant que la majorité des organismes,

face à un stress environnemental, utilisent la diminution métabolique presque instantanément (Guppy et Withers, 1999 ; Boutilier, 2001 ; Forgan et Forster, 2012). Cependant, il est probable que la baisse du métabolisme soit seulement une diminution temporaire du métabolisme et non une dépression métabolique en tant que tel. Comme les crevettes ne sont restées que quelques heures sous leur SMR, il est impossible d'affirmer qu'elles auraient pu survivre à ce taux métaboliques pendant une longue période. Il serait intéressant de vérifier ce paramètre dans des expériences futures. Pour cela il serait possible de vérifier si certains paramètres caractérisant une dépression métabolique, tels qu'une diminution du pH cellulaire, la présence d'ARNm latent, le changement de l'état de phosphorylation des protéines, le maintien du processus de pompage ionique et la diminution de la synthèse protéique (Guppy et Withers, 1999), sont présents. Il serait aussi possible de mesurer les concentrations de lactate dans l'organisme à la fin de la phase en hypoxie, puis de remettre l'organisme en normoxie tout en mesurant sa consommation d'oxygène. Si l'organisme a accumulé une dette en oxygène, et qu'il n'a pu entrer en dépression métabolique, il devrait y avoir une augmentation des concentrations de lactate suite à l'exposition sous O_{2crit} et une augmentation de la consommation d'oxygène plus importante qu'à SMR lors du retour en normoxie.

Chez les crevettes mâles, l'exposition à l'hypoxie aigüe ne provoque pas le même type de réponse que chez les femelles. Les mâles ont une capacité aérobie et glycolytique maximale similaire en hypoxie aigüe et en normoxie dans le muscle (figure 28). Au niveau aérobie, le maintien des activités de la CS et de la COX est assez surprenant cela signifie que la capacité aérobie maximale est maintenue alors que dans le même temps, les mesures de consommation d'oxygène montrent que les crevettes diminuent leur consommation d'oxygène en hypoxie et que leur registre aérobie est plus faible. Il est important de préciser plusieurs choses ici. Premièrement, les mesures enzymatiques dans la présente étude ont été enregistrées dans certains tissus spécifiques (muscle et/ou hépatopancréas) et non dans l'organisme entier comme ce fut le cas pour les mesures de respirométrie. Bien que ces organes, tout du moins le muscle, représentent une grande proportion de l'organisme entier

(le muscle représente environ 70 à 90 % des tissus mous et l'hépatopancréas entre 9 et 16 % ; Hellou *et al.*, 1997), ils ne sont pas forcément représentatifs de ce qui se passe dans l'organisme entier. Deuxièmement, il est possible que la réponse enzymatique ne soit pas immédiate et qu'il faille un certain temps à la crevette nordique pour ajuster l'activité de ces enzymes. Comme mon expérience n'a duré que quelques heures, il est possible que des variations enzymatiques plus importantes soient en cours mais n'aient pas pu être enregistrées en si peu de temps. Il serait intéressant de laisser la crevette nordique plus longtemps sous son SMR pour voir si d'autres résultats apparaissent. Au niveau anaérobie, la capacité anaérobie maximale des mâles diminue peu à court terme car malgré une baisse d'activité de la PEPCK, l'activité de la LDH et de la PK ne varie pas par rapport au groupe témoin. Cependant, la PEPCK étant impliquée dans le processus de néoglucogénèse (figure 6), une baisse de la capacité pourrait refléter une diminution de la production de glucose par cette voie. Par la suite, il pourrait y avoir une diminution des stocks de glucose dans l'organisme, ce qui pourrait alors entraîner une limitation des processus de glycolyse et de fermentation dont le glucose est l'élément de départ. Il y aurait alors une diminution plus importante de la capacité anaérobie.

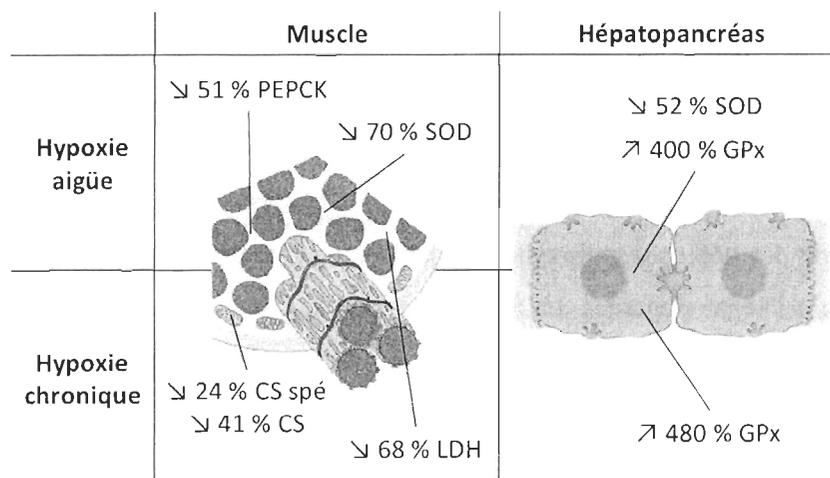


Figure 28 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et l'hépatopancréas des crevettes nordiques mâles exposées à l'hypoxie aigüe ou chronique (↘ = diminution d'activité et ↗ = augmentation d'activité)

La diminution d'activité de la PEPCK chez les mâles s'est produite alors même que la consommation d'oxygène de ces derniers était sous SMR. Il est probable que l'utilisation de ce processus ne soit possible que durant une courte période et que ce ne soit pas le reflet d'une dépression métabolique, comme expliqué plus haut. Cependant, comme il y a moins de réponses au niveau enzymatique, on peut penser que les mâles sont plus résistants que les femelles car la capacité de nombreux processus ne varie pas (aérobiose, glycolyse, fermentation... etc.).

Concernant les réponses des défenses antioxydantes lors d'une exposition aiguë à l'hypoxie, là encore, les réponses des femelles et des mâles diffèrent (figures 27 et 28). Dans cette étude, les défenses antioxydantes enzymatiques ont été analysées mais pas le stress oxydatif lui-même. Le stress oxydatif est produit par une accumulation trop importante de ROS (tels que l'anion superoxyde O_2^- ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2), eux mêmes formés à 90 % par la chaîne de transport des électrons (respiration) et les 10 % restants par l'auto-oxydation de certaines enzymes telles que les oxydases (Lushchak, 2011a). Le stress oxydatif entraîne des perturbations métaboliques telles que l'inactivation d'enzymes suite à des dommages causés aux structures protéiques (Lushchak et Bagnyukova, 2006). Lors de l'exposition des crevettes femelles à une hypoxie aiguë, j'ai observé une diminution de l'utilisation du métabolisme aérobie *via* une baisse de la consommation d'oxygène. Il est donc probable que la quantité de ROS produits diminue en hypoxie, qu'il y ait ainsi moins de ROS présents dans le milieu cellulaire et donc moins de chances d'avoir une exposition à un stress oxydatif. Ceci serait confirmé par le fait qu'il y a une diminution des défenses antioxydantes des crevettes femelles *via* une baisse d'activité de la SOD dans l'hépatopancréas. La SOD catalysant la dismutation de l'anion superoxyde, si la chaîne respiratoire est moins utilisée, il y a moins de formation d' O_2^- et il n'est plus nécessaire de maintenir une activité de cette enzyme aussi élevée qu'en normoxie.

Les crevettes mâles exposées à une hypoxie aiguë sont les seules chez qui une réponse des défenses antioxydantes dans le muscle, *via* une diminution d'activité de la SOD

(figure 28) est observée. Ce tissu n'ayant pas pour principale fonction de produire des défenses antioxydantes mais plutôt une fonction locomotrice, il est possible que cette diminution d'activité soit due à la diminution du métabolisme enregistrée *via* une baisse de la consommation d'oxygène ou à l'immobilité des organismes. Dans l'hépatopancréas, une diminution d'activité de la SOD et une augmentation de celle de la GPx sont notées (figure 28). En hypoxie aigüe, comme ici, la diminution de la consommation d'oxygène limite la production de ROS. La diminution de la SOD dans l'hépatopancréas semble logique. Cependant, malgré cette diminution, les niveaux d'activité de la SOD dans ce tissu restent très élevés et maintiennent une bonne capacité antioxydante. De plus, l'activité de la GPx devient plus importante en hypoxie aigüe. Cette enzyme, en transformant le peroxyde d'hydrogène formé par la SOD en oxygène et en eau, va éviter l'accumulation de cet élément et empêcher la formation d'éventuel stress oxydatif en cas de variation d'oxygène. Il est possible que le maintien de niveaux importants de SOD combiné à l'augmentation de l'activité de la GPx soit une réponse préparatoire les crevettes mâles exposées à une hypoxie aigüe en cas d'augmentation brutale de ROS lors d'une ré-oxygénation par exemple. Leur forte capacité antioxydante les protège bien contre ce risque.

Lors d'une exposition à long terme à des niveaux d'hypoxie intermédiaires (20 %, 30 % et 40 % sat.), contrairement à ce qui a été observé dans l'expérience précédente, les crevettes nordiques ont des réponses enzymatiques semblables entre les deux sexes, que ce soit dans le muscle ou dans l'hépatopancréas. Pour les deux sexes, une baisse d'activité de la CS et de la LDH est enregistrée dans le muscle. Chez les deux sexes, la baisse de l'activité de la CS intervient dès 40 % sat. et est identique quelque soit le niveau d'hypoxie. Ceci signifierait que les crevettes, exposées de façon chronique à l'hypoxie, auraient une capacité aérobie limitée à partir d'un seuil d'oxygène supérieur à 40 % sat.. Cette diminution de la capacité aérobie pourrait avoir un lien avec la limitation du registre aérobie observée en hypoxie. Les crevettes auraient aussi une capacité anaérobie moindre en hypoxie chronique, comme le montre l'activité de la LDH plus faible chez les trois groupes en hypoxie par rapport au groupe en normoxie. Chez les mâles, là encore, le seuil à partir duquel

commence la baisse d'activité doit être situé entre 40 % et 100 % sat. car les trois groupes en hypoxie ont la même réponse. Cependant, la réponse est un peu plus complexe chez les femelles car bien que les trois groupes en hypoxie aient une activité de la LDH plus faible que celle en normoxie, la réponse n'est pas linéaire avec le niveau d'oxygène. Il est difficile d'interpréter cette réponse.

Les réponses des défenses antioxydantes en hypoxie chronique sont identiques chez les femelles et chez les mâles. Pour les deux sexes, il y a une augmentation de l'activité de la GPx dans l'hépatopancréas en hypoxie. Chez les mâles, la réponse est la même quelque soit le niveau d'oxygène, alors que chez les femelles l'activité de l'enzyme augmente progressivement et c'est seulement à partir de 20 % sat. que la différence avec le groupe témoin est significative. Cette hausse de capacité antioxydante, bien que définie comme l'une des réponses les plus significatives de la tolérance à l'hypoxie (Bickler et Buck, 2007) est surprenante alors que dans le même temps, les animaux sont probablement à SMR et la production de ROS identique, sinon plus faible, qu'en normoxie. Cependant, cette augmentation de l'activité de la GPx peut être expliquée par deux facteurs différents. Premièrement, même si ce processus est encore mal connu, l'hypoxie peut entraîner une augmentation de la production de ROS, en provoquant l'auto-oxydation de composants cellulaires sous la contrainte hypoxique (Lushchak, 2011b). Les organismes qui mettent en place des défenses oxydatives vont donc être capables de se défendre contre les dommages consécutifs à ce type de stress. Deuxièmement, il a déjà été démontré que la capacité oxydative peut augmenter en prévision de l'apparition du stress oxydatif et ceci avant même l'apparition de ce dernier, pour anticiper l'augmentation brutale de ROS lors de la ré-oxygénation ou de variations d'oxygène. Ce processus a déjà été observé chez les organismes aquatiques en général (Storey, 1996 ; Hochachka et Lutz, 2001 ; Lushchak, 2011b), chez la tortue d'eau douce *Trachemys scripta elegans* (Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002) ou chez les poissons (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Là encore, si les crevettes nordiques augmentent leur capacité antioxydante en prévision de ce stress, cela signifie que, comme beaucoup d'espèces de poissons ou d'invertébrés estuariens rencontrant

des conditions d'oxygène variables, elles sont plus résistantes à l'hypoxie que les espèces vivant dans des conditions plus stables (Demple, 1999). Il est à noter que les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes des crevettes nordiques, notamment celle de la SOD, sont très élevés. Plusieurs auteurs ont démontré que la capacité à gérer le stress oxydatif était reliée aux niveaux de défense dans l'organisme (Hochachka et Lutz, 2001 ; Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002 ; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005 ; Lushchak, 2011b). Ceci signifie que les crevettes nordiques auraient, même en normoxie, une grande capacité à se protéger contre l'apparition d'un stress oxydatif. Pour confirmer les stratégies de défense des organismes contre le stress oxydatif dans mon étude sur les crevettes nordiques, il serait intéressant de faire l'analyse de la peroxydation des lipides membranaires (Botsoglou *et al.*, 2002) qui pourrait servir d'indicateur d'impact négatif de ce type de stress.

Chez la crevette nordique, on peut donc supposer que la réponse ultime à l'hypoxie est l'économie d'énergie, ce qui entraîne une limitation des capacités métaboliques maximales dans le muscle. Chez les crevettes, le muscle blanc représente une grande partie de la masse de l'organisme (70 à 90 % des tissus mous ; Hellou *et al.*, 1997). Ce tissu est utilisé pour des efforts intenses et de courte durée, soit le comportement de fuite rapide par flexion de l'abdomen. Dans mes expériences, le niveau d'activité était réduit en hypoxie car les crevettes bougeaient plus rarement lorsqu'elles étaient en hypoxie que lorsqu'elles étaient en normoxie, ce qui est courant chez la plupart des organismes (Dalla Via *et al.*, 1998 ; Wannamaker et Rice, 2000). Le muscle étant un tissu principalement dédié à la locomotion, l'économie de mouvement des organismes peut leur permettre d'économiser de l'énergie et limiter dans le même temps, les capacités métaboliques maximales. Par exemple, il a été démontré par Martínez *et al.* (2006) que chez le fondule, l'exposition chronique à l'hypoxie entraînait des modifications d'activité d'un moins grand nombre d'enzymes intervenant dans le métabolisme des glucides et que ces réponses étaient moindres dans le cœur et le cerveau, comparés au muscle et au foie. Ceci est expliqué par les auteurs par le fait que ces organes reçoivent l'apport sanguin en priorité, ce qui améliore leur apport en oxygène et suggérerait que les deux premiers tissus sont privilégiés au niveau

de l'apport en oxygène de par leurs fonctions vitales (Soengas et Aldegunde, 2002 ; Martínez *et al.*, 2006). Il serait intéressant de faire des analyses enzymatiques dans d'autres tissus (cerveau, cœur... etc.) pour voir quelles autres fonctions peuvent être supprimées en hypoxie par les crevettes nordiques et au contraire, lesquelles sont conservées à tout prix. Il serait aussi intéressant de faire des expériences dans lesquelles les organismes sont en présence d'un courant. Ceci stimulerait leur locomotion, permettrait de voir quelles autres fonctions sont affectées si les crevettes sont obligées de rester en mouvement et si elles parviennent à survivre dans ce cas.

La fonction locomotrice du muscle n'étant pas essentielle à la survie à court terme, il est probable que la baisse de la capacité métabolique maximale et la réduction de la capacité locomotrice soient liées. Une baisse des mouvements de l'organisme a déjà été observée, notamment chez les poissons (Dalla Via *et al.*, 1998 ; Wannamaker et Rice, 2000). Cependant, il faut bien prendre en compte que cette étude a été réalisée en laboratoire, et il est donc possible qu'en milieu naturel, les crevettes nordiques ne puissent pas se permettre de diminuer leur capacité locomotrice pour conserver une capacité de fuite en présence de prédateur par exemple. Par contre, en hypoxie modérée, la capacité métabolique, même plus faible, permet à la crevette de conserver une activité équivalente à celle en normoxie, excepté que la crevette ne pourra plus effectuer de dépenses énergétiques importantes (par exemple la nage rapide). Ce paramètre peut être associé à la diminution du registre aérobie observée en hypoxie. Concernant les défenses antioxydantes, elles apparaissent surtout dans l'hépatopancréas où leurs niveaux d'activité sont élevés même en normoxie. Cette forte capacité antioxydante des crevettes nordiques leur confère une bonne protection en cas de variations d'oxygène dans le milieu (ré-oxygénation) et d'une éventuelle augmentation de la production de ROS.

Somme toute, les crevettes mâles et femelles semblent très résistantes à l'hypoxie, ce qui leur permet d'utiliser des habitats hypoxiques tels que l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. Cependant, les mâles, par leur capacité à maintenir leur métabolisme aérobie et

leur capacité à augmenter leurs défenses oxydatives à court terme, semblent plus résistants que les femelles. Ceci est paradoxal car leur taux métabolique par unité de masse est plus important à cause de leur petite taille. En effet, en règle générale, les individus plus petits ont un taux métabolique par gramme plus important que les individus de grande taille (Kleiber, 1947). Cette résistance plus importante des mâles est confirmée par l' O_{2crit} des mâles plus faible que celle des femelles, ce qui laisserait à ces derniers une marge aérobie plus importante à un même niveau d'oxygène. Il faudrait donc diminuer encore le niveau de saturation d'oxygène pour que les mâles répondent de la même façon que les femelles. Chez les femelles, l'exposition chronique semble moins problématique que l'exposition aiguë. En effet, lors de la deuxième expérience, les crevettes femelles semblaient mieux réguler, de façon globale, l'activité enzymatique des indicateurs étudiés, étaient capables d'augmenter la capacité de la GPx et donc les niveaux de leurs défenses antioxydantes. Ceci démontre leur capacité d'acclimatation. De plus, la présence des crevettes nordiques mâles, mais aussi femelles, dans les zones chroniquement hypoxiques de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, indique qu'elles sont capables de résister à l'hypoxie chronique. Mes données ne permettent pas de vérifier s'il y a une acclimatation au cours du temps. Cependant, les réponses enzymatiques des crevettes nordiques sont généralement identiques à 40, 30 et 20 % sat., et ces conditions d'oxygène sont similaires à celles retrouvées dans le milieu naturel. La crevette nordique est donc très résistante aux faibles conditions d'oxygène mais serait aussi capable de s'ajuster au niveau physiologique pour se maintenir dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. Ceci expliquerait les fortes populations de crevettes nordiques retrouvées dans cette région. Il serait tout de même intéressant de voir les réponses à l'hypoxie chez cette espèce au cours du temps et à différents niveaux d'oxygène. Ceci permettrait de mieux définir comment la crevette s'acclimate aux conditions hypoxiques au fur et à mesure du temps.

RÉPONSES DU FLÉTAN DU GROENLAND À L'HYPOXIE

Chez le flétan du Groenland, des analyses génomiques ont été réalisées chez les juvéniles, en supplément aux analyses enzymatiques. Chez cette espèce, l'exposition à

l'hypoxie entraîne des réponses plus ciblées, le nombre d'enzymes touchées étant moindre, mais des différences notables entre la réponse des juvéniles et des adultes à une exposition aigüe ou chronique sont à noter.

Exposés à l'hypoxie aigüe, les réponses des adultes et des juvéniles sont très différentes. Chez les adultes, très peu de réponses enzymatiques sont observées dans chacun des tissus (figure 29). Dans le muscle, l'activité des enzymes du métabolisme aérobie ne varie pas par rapport au groupe témoin, ce qui signifie que même à des niveaux sévères de saturation d'oxygène, les adultes ont une capacité aérobie, du moins à court terme, similaire à celle observée en normoxie. Comme chez les crevettes nordiques, cette réponse enzymatique ne reflète pas les résultats de Dupont-Prinet *et al.* (2013a) qui montrent bien qu'en hypoxie aigüe, les flétans du Groenland diminuent leur consommation d'oxygène. Là encore, deux paramètres sont à prendre en compte. Tout d'abord, comme l'exposition des organismes sous O_{2crit} n'a duré que quelques heures, il est possible que la capacité enzymatique des organismes n'ait pas encore été ajustée. Ensuite, les résultats de mon étude ont été obtenus par des analyses réalisées dans deux tissus uniquement. Bien que le muscle représente la majeure proportion de la masse des flétans du Groenland, le foie n'en représente qu'une faible proportion, entre 0,3 et 4,6 %, selon Gundersen *et al.* (1999) et en moyenne 1,7 % pour les flétans du Groenland de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (Aït Youcef, communication personnelle). Les mesures enregistrées dans ces deux tissus ne représentent donc pas exactement ce qui se passe au niveau de l'organisme entier comme c'est le cas des mesures de respirométrie.

La même stabilité est notée pour l'activité des enzymes glycolytiques en hypoxie aigüe. Les activités de la LDH et de la PK ne varient pas en hypoxie aigüe, donc là encore, les adultes ont une capacité glycolytique similaire en normoxie ou en hypoxie aigüe dans le muscle. Il est possible qu'à court terme, les adultes ont besoin d'avoir la même capacité anaérobie pour faire face à l'hypoxie, ce qui confirmerait l'hypothèse de Bickler et Buck (2007) qui expliquent que les organismes utilisent leur métabolisme anaérobie pour

produire de l'énergie lors d'une exposition aiguë à l'hypoxie. Cependant, chez les adultes, une diminution de l'activité de la PEPCK dans le muscle est enregistrée. Cette enzyme intervenant au niveau de la néoglucogenèse, il est probable que la capacité à produire du glucose des adultes soit moins importante en hypoxie aiguë, ce qui peut poser problème à plus long terme en limitant par exemple les processus de glycolyse ou de fermentation qui utilisent le glucose au début de leur processus et donc en limitant la capacité anaérobie plus tard.

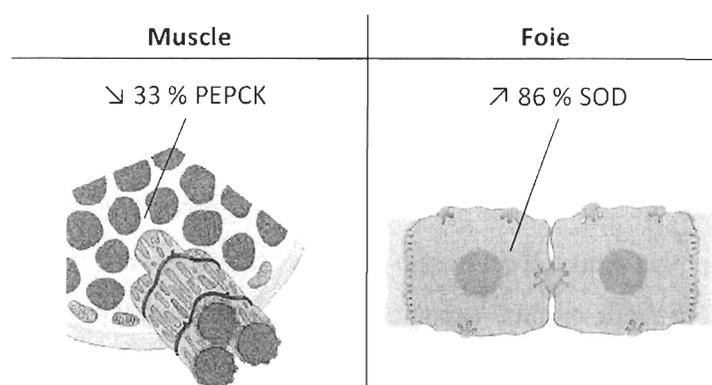


Figure 29 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques observées dans le muscle et le foie des flétans du Groenland adultes exposés à l'hypoxie aiguë (∇ = diminution d'activité et ↗ = augmentation d'activité)

Bien que les flétans du Groenland adultes aient une capacité aérobie en hypoxie aiguë similaire à celle en normoxie, leur consommation d'oxygène réduite (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a) et la limitation de l'oxygène dans le milieu suggère une baisse de la production de ROS. Cependant, chez les adultes de forts niveaux d'activité de SOD dans le muscle ont été observés, ce qui permet la dismutation des O_2^- formés par la chaîne respiratoire. Les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes étant en lien avec leur capacité à gérer le stress oxydatif (Hochachka et Lutz, 2001 ; Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002 ; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005 ; Lushchak, 2011b), le flétan du Groenland aurait une bonne capacité antioxydante, dès le départ, même en normoxie. La hausse de l'activité de la SOD dans le foie des adultes, ce qui indique encore sa forte capacité antioxydante, lui permet de

lutter contre l' O_2^- en cas de ré-oxygénation par exemple. Par contre, la SOD formant du H_2O_2 , il pourrait y avoir une augmentation de la production de cet élément. Comme les niveaux d'activités de Cat dans le muscle sont très élevés même en hypoxie aigüe, il est probable que cette enzyme ait la capacité de catalyser la décomposition du H_2O_2 en formant de l'eau, ce qui prouverait la forte capacité antioxydante du flétan du Groenland en cas de variations d'oxygène et de ré-oxygénation.

Chez les flétans du Groenland juvéniles, les réponses à l'hypoxie aigüe sont différentes (figure 30). Leur capacité aérobie ne varie pas car le niveau d'activité de la CS, impliquée dans le cycle de Krebs ne montre pas de différence significative entre les traitements. Comme précédemment, ceci ne reflète pas la diminution de la consommation d'oxygène et du registre aérobie observée en respirométrie. Dans le même temps, l'activité de la LDH diminue, ce qui signifie que les flétans du Groenland juvéniles ont aussi un potentiel anaérobie plus faible. Il est possible que ces diminutions d'activités enzymatiques, lesquelles devraient refléter les capacités métaboliques maximales, résultent d'une diminution de la demande énergétique du tissu. Au niveau des défenses antioxydantes, aucune réponse n'est observée dans le foie des juvéniles et une diminution de l'activité de la Cat est observée dans le muscle. Ceci signifie que la capacité des juvéniles à éliminer le H_2O_2 diminue et qu'il n'est plus nécessaire de maintenir la même capacité antioxydante. Cependant, la capacité des animaux à se protéger contre le stress oxydatif étant liée à leur niveaux d'enzyme antioxydantes (Hochachka et Lutz, 2001 ; Hermes-Lima et Zenteno-Savin, 2002 ; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005 ; Lushchak, 2011b), les flétans juvéniles, comme les adultes, ont dès le départ une bonne protection contre l'éventuelle apparition d'un stress oxydatif, lors d'une ré-oxygénation par exemple.

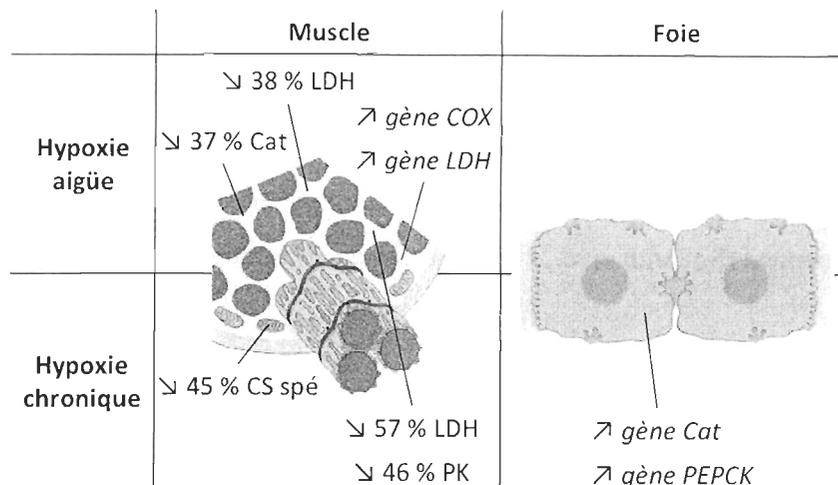


Figure 30 : Schéma récapitulatif des réponses enzymatiques et génomiques observées dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles exposés à l'hypoxie aigüe ou chronique (↘ = diminution d'activité et ↗ = augmentation d'activité)

J'ai utilisé deux méthodes pour observer les réponses des flétans du Groenland juvéniles à l'hypoxie : les analyses d'activité enzymatique et celles d'expression génique. L'expression génique analyse le brin d'ARNm alors que l'activité enzymatique est mesurée sur la protéine issue de ce brin suite à la traduction (figure 31). La plupart des études utilisent un seul type de données, en partant du principe que ces deux types d'analyses vont donner des résultats similaires. Cependant, j'ai observé que les analyses génomiques réalisées chez les juvéniles donnent des réponses un peu contradictoires par rapport aux analyses enzymatiques.

Nikinmaa et Rytönen (2011) qui ont analysé plusieurs travaux en génomique chez les organismes aquatiques, notamment chez les poissons et les invertébrés, ont montré que les études sur les niveaux d'ARNm et celles sur les niveaux de protéines doivent être traitées indépendamment. En effet, l'étude de l'expression de l'ARNm ne reflète pas forcément l'expression de la protéine. Bien que généralement, une augmentation du niveau d'ARNm soit vue comme une augmentation de la quantité de protéines, ce n'est pas toujours le cas. Il se peut par exemple, qu'un isozyme soit synthétisé et que l'activité enzymatique

enregistrée ne reflète pas forcément la traduction d'un seul brin d'ARNm. La même quantité de protéines peut être synthétisée avec une variation de 30 fois le niveau d'ARNm et la quantité de protéines peut varier de 20 fois avec le même niveau d'ARNm (Nikinmaa et Rytönen, 2011). Par exemple, aucun changement n'est enregistré pour l'ARNm de HIF1 (donc pour le gène HIF1) en hypoxie alors qu'on sait que le nombre de molécules de HIF 1 peut varier fortement (Soitamo *et al.*, 2001 ; Nikinmaa et Rytönen, 2011).

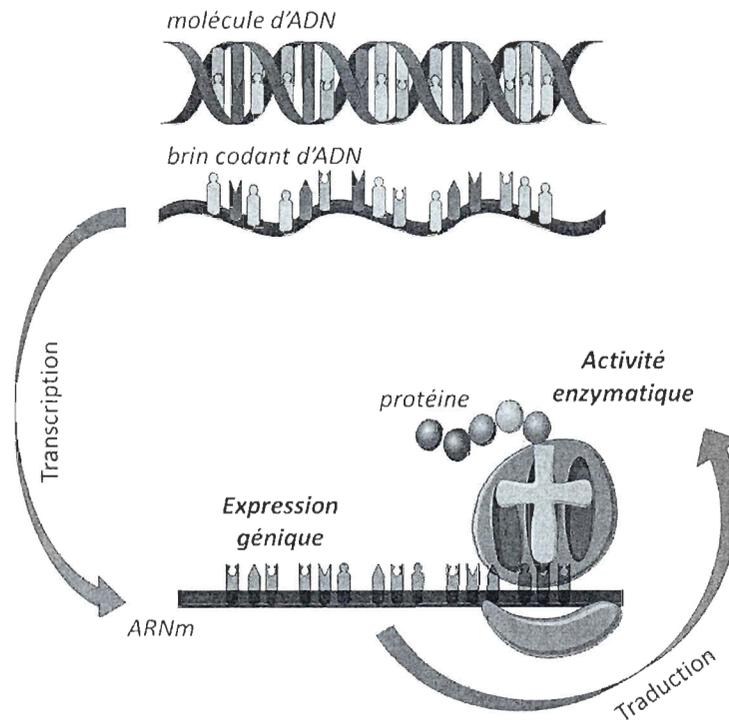


Figure 31 : Processus menant à la formation d'une protéine à partir d'un brin d'ADN

Ces différences entre les réponses géniques et enzymatiques peuvent être dues à un facteur temporel, car généralement, des variations d'ARNm sont observées en seulement quelques minutes ou heures alors qu'il faut quelques heures/jours pour observer celles au niveau protéique (Nikinmaa et Rytönen, 2011, 2012). Il est aussi connu que des facteurs environnementaux ou des contaminants peuvent affecter l'efficacité de la traduction (Pytharopoulou *et al.*, 2008), l'ARNm ou la stabilité de la protéine. Tout ceci peut avoir un

impact sur le produit génique (Nikinmaa et Rytönen, 2011). Il est donc nécessaire d'évaluer la relation entre le transcrite et le niveau de la protéine de façon plus précise (Nikinmaa et Rytönen, 2011, 2012) pour tenter de mieux comprendre les processus intermédiaires entre les niveaux génique et enzymatique. Dans mon étude, une réponse en hypoxie aigüe dans le muscle des flétans du Groenland juvéniles est observée seulement pour les gènes codant pour la COX et pour la LDH. Les niveaux de COX sont trop faibles pour être mesurables dans le muscle, mais au niveau de la LDH, les résultats enzymatiques et génomiques donnent des résultats inverses. Alors que l'activité de la LDH diminue dans le muscle, l'expression du gène codant pour cette enzyme augmente. Ce phénomène est difficile à expliquer étant donné le niveau de connaissance actuel des processus intermédiaires entre ces deux niveaux de réponses. Cependant, comme les mesures génomiques sont prises au niveau du brin d'ARNm et celles d'enzymologie sur la protéine, il est fort probable que l'hypoxie aigüe ait un effet sur le processus de traduction (figure 31). En inhibant ce processus (par exemple, en bloquant l'action du ribosome qui traduit les codons en peptides), si le gène n'est plus exprimé, normalement, il ne devrait plus y avoir de synthèse.

L'expérience à long terme à des niveaux d'oxygène intermédiaires a été réalisée uniquement chez les flétans juvéniles. Dans cette expérience, les réponses observées sont totalement différentes des réponses observées chez les juvéniles lors de l'expérience précédente. En effet, cette fois, une diminution de la capacité aérobie maximale est observée *via* une baisse d'activité spécifique de la CS en hypoxie, et c'est donc l'activité par unité enzymatique qui est plus faible et non le nombre d'enzymes présentes dans le tissu. Ceci est attendu car les niveaux d'oxygène dans le milieu sont plus faibles, ainsi que le registre aérobie (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a). Encore une fois, une baisse de la capacité anaérobie maximale est enregistrée mais cette fois, ce n'est pas l'enzyme de la néoglucogénèse (PEPCK) qui réagit mais celles de la glycolyse (LDH et PK) dont l'activité diminue. Ces baisses des capacités métaboliques maximales suggèrent une économie d'énergie des flétans du Groenland juvéniles lors d'une hypoxie à long terme. Il n'y a pas de

réponses différentes des flétans du Groenland juvéniles aux différents traitements d'oxygène. Quelque soit le niveau d'oxygène utilisé ici (40 %, 30 % et 20 % sat.), le même effet est enregistré. Le seuil de réponse des flétans juvéniles se situe donc sûrement entre 40 % et 100 % sat.. Dans cet intervalle, il est possible que la diminution du registre aérobie des flétans du Groenland soit suffisante pour que les activités enzymatiques soient régulées à la baisse. La durée de l'expérience permet, contrairement aux résultats d'hypoxie aigüe, d'observer cette diminution de la capacité aérobie car les activités enzymatiques ont eu le temps de s'ajuster. Côté défenses antioxydantes, aucune réponse enzymatique n'est observée. Les animaux étant probablement à SMR, il est probable que la production de ROS ne soit pas très importante et qu'il n'y ait pas besoin de protection supplémentaire et c'est pourquoi aucune enzyme antioxydante n'augmente son activité. De plus, les forts niveaux de SOD dans le muscle et le foie des flétans du Groenland juvéniles leur confèrent tout de même une forte capacité antioxydante en cas de ré-oxygénation et d'éventuelle apparition de stress oxydatif.

En hypoxie chronique, comme en hypoxie aigüe, les réponses génomiques sont différentes des réponses enzymatiques. Dans le foie, l'expression du gène codant pour la PEPCCK et celui codant pour la Cat est plus importante en hypoxie, alors que rien ne laissait présager cette réponse quand on regardait les réponses enzymatiques, puisque l'activité ne varie pas quelque soit le niveau d'oxygène en hypoxie chronique. Comme précédemment, ces résultats pourraient être expliqués par une inhibition de la traduction par l'hypoxie (figure 31) ou une différence temporelle des réponses à ces deux niveaux.

Je démontre que les flétans du Groenland sont résistants à l'hypoxie. Ce ne sont pas les mêmes enzymes qui réagissent durant une hypoxie aigüe ou lors d'une hypoxie intermédiaire à long terme. Plusieurs possibilités sont envisagées. On peut imaginer que les processus mis en place en réponse à ces deux types d'hypoxie ne soient pas les mêmes. En hypoxie chronique, à la fois les capacités aérobies et anaérobies maximales sont maintenues alors qu'en hypoxie aigüe, seule la capacité aérobie est maintenue. Cependant, il semble

plus plausible que les réponses enzymatiques mettent un certain temps à répondre et que toutes les réponses ne soient pas observées dans l'expérience à court terme alors qu'au bout de quelques jours, les activités enzymatiques ont eu le temps de s'ajuster. Mes données ne permettent pas de démontrer une acclimatation à l'hypoxie au cours du temps. Cependant, le flétan du Groenland est affecté de la même manière quelque soit le niveau d'hypoxie chronique (40, 30 ou 20 % sat.) par rapport à la normoxie. Or dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, le flétan du Groenland ne rencontre pas vraiment de conditions de normoxie mais se retrouve surtout dans des conditions d'oxygène entre 30 et 40 % sat. pour les adultes et même entre 20 et 25 % sat. pour les juvéniles. Comme une réponse identique est observée à 20 % sat., ce qui est très proche de la valeur d' O_{2crit} des flétans, ceci démontre que cette espèce est très résistante aux conditions hypoxiques et qu'elle serait capable de s'ajuster au niveau physiologique dans le milieu naturel. Ceci expliquerait les fortes populations de flétan du Groenland retrouvées dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent malgré les faibles taux d'oxygène enregistrés dans cette région. Il serait intéressant de prendre des mesures enzymatiques dans les différents tissus à des intervalles de temps variables pour voir l'acclimatation de l'espèce au cours du temps et estimer le temps de réponses au niveau enzymatique. Contrairement aux crevettes nordiques, où les femelles étaient moins résistantes que les mâles à l'hypoxie malgré leur plus grande masse et leur SMR plus faible (par gramme de tissu), ce sont les flétans du Groenland adultes qui semblent les plus résistants à l'hypoxie aigüe. Leur plus grande taille et plus faible SMR (par gramme de tissu) leur confère cependant un avantage qui pourrait, à lui seul, expliquer leur plus grande tolérance. De plus, ils maintiennent à la fois leur capacité aérobie et une bonne partie de leur capacité glycolytique et ce sont les seuls à augmenter leur capacité antioxydante, ce qui leur offre une meilleure protection que celle des juvéniles.

DANS LE MILIEU NATUREL

Plusieurs études ont porté sur l'impact de l'hypoxie sur différentes espèces. Ces études ont montré que les organismes évitaient l'hypoxie et préféraient les zones normoxiques quand celles-ci étaient disponibles (Kramer, 1987 ; Pihl *et al.*, 1991 ; Wannamaker et Rice,

2000 ; Wu *et al.*, 2002). Dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, les populations de crevettes nordiques et de flétans du Groenland restent très élevées malgré des niveaux de saturation d'oxygène pouvant atteindre 20 % sat. (Gilbert *et al.*, 2005). Des niveaux aussi faibles sont retrouvés à la tête des différents chenaux, dans la couche d'eau profonde, tout spécialement où sont retrouvées les plus fortes concentrations de flétans du Groenland juvéniles (chenal Laurentien ; Aït Youcef *et al.*, 2013) et de crevettes nordiques (chenaux Anticosti et Esquiman ; Savard et Bourdages, 2012). Gilbert *et al.* (2007), en utilisant la méthode de Perry et Smith (1994), montrent même une relation positive entre flétans du Groenland et crevettes nordiques et les faibles teneurs en oxygène dissous. La présence des crevettes nordiques et des flétans du Groenland dans l'estuaire laisse supposer une grande résistance de ces espèces à l'hypoxie (DFO, 2008, 2009, 2010 ; Aït Youcef *et al.*, 2013). Aït Youcef *et al.* (2013) ont démontré que la présence des flétans du Groenland juvéniles dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent était liée aux faibles taux de saturation d'oxygène. Cependant il est peu probable que de faibles niveaux d'oxygène donnent un avantage physiologique à ces espèces. Pour un organisme, le milieu idéal doit apporter un fort apport énergétique, favorisant sa croissance et sa survie, et un faible risque de mortalité. Dans la nature, un milieu idéal est très rare et les organismes doivent faire des compromis (e.g. Froeschke et Stunz, 2012). Plusieurs auteurs montrent que si des organismes restent dans un environnement où un facteur environnemental leur est défavorable, c'est que ces organismes doivent y trouver d'autres avantages (Kramer, 1987 ; Gilbert *et al.*, 2007) ou qu'il n'existe pas d'habitat alternatif. Donc si les crevettes nordiques et les flétans du Groenland restent dans l'estuaire malgré l'hypoxie, c'est que d'autres facteurs biotiques ou abiotiques doivent leur être favorables et compenser pour la contrainte hypoxique. Les estuaires sont de bons habitats car ils sont riches en proies et apportent une protection contre la prédation (Beck *et al.*, 2001). Par exemple, Froeschke et Stunz (2012) ont montré par des expériences de laboratoire que le sar salême *Lagodon rhomboides* et la courbine atlantique *Micropogonias undulatus* juvéniles évitent, en conditions hypoxiques, l'habitat jugé idéal en normoxie, même si on ajoute de la nourriture. L'oxygène est donc un facteur plus limitant que l'oxygène pour ces deux espèces. Par contre, en cas de prédation dans la

zone non hypoxique, ils vont se réfugier dans la zone hypoxique pour éviter les prédateurs. L'impact de la prédation est donc plus important que celui de l'hypoxie. Ainsi, pour des espèces vivant dans un milieu hypoxique, il peut y avoir une diminution de la prédation dans le milieu hypoxique (Robb et Abrahams, 2003) et inversement, une augmentation du risque de prédation quand ils sortent de la zone hypoxique (Froeschke et Stunz, 2012). Il devient donc préférable pour ces espèces de rester dans la zone hypoxique malgré la contrainte d'oxygène. Cependant, dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, la prédation sur les flétans du Groenland adultes provient principalement du phoque, de la laimargue, du béluga et du narval (Bowering, 1983). L'impact de l'hypoxie sur la laimargue n'est pas connu mais ce paramètre ne devrait pas affecter le phoque, le béluga ou le narval qui sont des mammifères marins. La pression de prédation sur les flétans du Groenland adultes ne devrait donc pas être modifiée à cause de l'hypoxie. Par contre, le flétan du Groenland s'alimente principalement sur la crevette nordique, le capelan et une large population de zooplancton tels que les euphausiacés, mysidacés et amphipodes présents dans cet écosystème (Fréchet, 1987 ; Vollen et Albert, 2008 ; Savenkoff *et al.*, 2009 ; Bernier et Chabot, 2012). Il s'avère que ces proies sont très abondantes dans les régions où le flétan du Groenland est retrouvé (Archambault *et al.*, 2012). Cette forte abondance de proie doit être profitable et permet au flétan de limiter les dépenses énergétiques liées à la recherche et à la capture de proies. Pour les juvéniles, la prédation est généralement le fait de la morue et du cannibalisme (Bowering, 1983). La morue étant plus sensible à l'hypoxie que les flétans du Groenland juvéniles (Chabot et Claireaux, 2008) et l'impact du cannibalisme étant limité dans l'estuaire du Saint-Laurent (Bernier et Chabot, 2012), cette région, avec ses faibles niveaux d'oxygène dans le fond, représenterait une protection pour les juvéniles. De plus, comme pour les flétans du Groenland adultes, l'abondance de proies dans le milieu leur est favorable.

Les prédateurs principaux de la crevette nordique sont le flétan du Groenland, le sébaste *Sebastes spp.* et la morue franche (Savenkoff *et al.*, 2006). Bien que le flétan du Groenland soit très résistant à l'hypoxie, ce n'est pas le cas de la morue et l'impact de

l'hypoxie sur le sébaste est inconnu. Il y aurait au moins une faible diminution de la prédation sur la crevette nordique si elle se trouve dans des zones hypoxiques. De plus, la crevette consomme notamment, des annélides, de petits crustacés, du phytoplancton, des détritus, des copépodes et des euphausiacés. Donc, l'estuaire représente une source de nourriture abondante, et il est tout à fait possible que ce soit bénéfique à la crevette nordique de rester dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent.

L'oxygène diminue régulièrement en progressant du détroit de Cabot vers l'estuaire et les pourcentages de saturation enregistrés peuvent atteindre 18 % sat. dans cette zone (Gilbert *et al.*, 2007). Les flétans du Groenland juvéniles et les crevettes femelles ont des O_{2crit} de 14,9 % et 14 % sat. respectivement et il n'y a donc que 3 % et 4 % d'écart avec les conditions d'oxygène qui peuvent être retrouvées dans le milieu (Dupont-Prinet *et al.*, 2013a ; b). Plusieurs auteurs prédisent des diminutions d'oxygène dans les eaux mondiales, notamment les zones côtières (Justić *et al.*, 1996 ; Diaz, 2001 ; Wu, 2002 ; Pörtner et Peck, 2010). Dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, l'augmentation de température des eaux aurait plusieurs effets augmentant l'hypoxie dans le milieu (de Vernal *et al.*, 2011 ; Genovesi *et al.*, 2011). Tout d'abord, l'augmentation de température va abaisser la concentration d'oxygène des eaux, mais cela va aussi favoriser la stratification des couches d'eaux et donc diminuer l'échange entre les masses d'eaux. Une augmentation de la température de l'eau va aussi augmenter la consommation d'oxygène des organismes (Gillooly *et al.*, 2001) et donc faire diminuer encore plus le niveau d'oxygène de la couche d'eau profonde au fur et à mesure de la progression de cette dernière vers l'estuaire. Si de telles diminutions ont lieu dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, même si ces organismes survivent dans le milieu, leur marge de manœuvre au niveau métabolique pourrait être fortement réduite, ce qui limiterait leurs possibilités d'acclimatation si une autre contrainte biotique (prédateurs, proies, compétiteurs...etc.) ou abiotique (température, pH...etc.) apparaissait dans le milieu. Il est probable que ces organismes n'auraient plus accès à certains habitats devenus trop hypoxiques. D'autres impacts, tels qu'une diminution de leur croissance ou de leur reproduction, pourraient être enregistrés chez ces organismes.

De plus, leur distribution serait modifiée si d'autres habitats leur deviennent inaccessibles, ce qui pourrait avoir un impact écologique important, notamment sur les flétans du Groenland juvéniles pour qui l'estuaire représente une nourricerie (Archambault *et al.*, 2012 ; Aït Youcef *et al.*, 2013). Une étude sur l'impact de l'hypoxie sur les œufs de flétans du Groenland (Mejri *et al.*, 2012) montre que ces derniers sont très résistants à l'hypoxie car un développement embryonnaire normal jusqu'à l'éclosion peut se produire jusqu'à 20 % sat.. Par contre, entre 20 et 35 % sat., les œufs de moins bonne qualité ont un succès d'éclosion plus faible que les autres. L'hypoxie sévère, sous 10 % sat., empêche le développement embryonnaire et donc l'éclosion des œufs. Comme le développement des embryons et la qualité des œufs sont meilleurs avec des femelles ayant un bon indice de condition (Mejri *et al.*, 2012), il ne faudrait pas que la condition des adultes se dégrade. De plus, les impacts à long terme sur les individus exposés à l'hypoxie avant leur éclosion n'ont pas été analysés. Tout ceci peut avoir un impact négatif sur leur population à long terme (Froeschke et Stunz, 2012). De plus, le flétan du Groenland est une espèce sensible aux variations de température et à la fenêtre de température restreinte (entre 0,5 et 6 °C ; Scott et Scott, 1988) et est donc rarement retrouvé dans les régions où la température est supérieure à 6°C. Une augmentation de la température des eaux pourrait donc forcer le flétan du Groenland à migrer hors de l'estuaire et du Golfe avant même que l'impact de l'hypoxie se fasse trop ressentir.

Dans le milieu naturel, il faut aussi prendre en compte que les organismes peuvent se comporter différemment par rapport aux expériences de laboratoire. Ils peuvent ainsi gérer des situations environnementales différemment de ce que les expériences en laboratoire peuvent permettre de prédire. En hypoxie, certaines espèces ont tendance à remonter dans la colonne d'eau pour atteindre des zones moins hypoxiques, que ce soit en laboratoire (Kramer, 1987) ou dans le milieu naturel (Pihl *et al.*, 1991). Dans le Saint-Laurent, bien que ce soient des espèces benthiques, le flétan du Groenland et la crevette nordique font tous deux des migrations verticales pour s'alimenter. La crevette nordique fait des migrations verticales diurnes, remontant dans la colonne d'eau le soir et retournant au fond le matin

(Garcia, 2007). Les flétans du Groenland sont qualifiés de poissons bathypélagiques (Scott et Scott, 1988) et se nourrissent principalement sur le fond (Rodriguez-Marin *et al.*, 1995 ; Solmundsson, 2007). Cependant, des études dans le mer de Barents (Vollen et Albert, 2008 ; Albert *et al.*, 2011) ou la baie de Baffin (Jørgensen, 1997) montrent que ces organismes peuvent avoir un comportement pélagique. Ces incursions pélagiques auraient pour but d'aller chercher des proies pélagiques présentes dans ces écosystèmes, telles que la crevette nordique, le capelan et différentes espèces de zooplancton telles que des euphausiacés, des mysidacés et des amphipodes (Vollen et Albert, 2008 ; Albert *et al.*, 2011). Ces proies sont également présentes dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent (Fréchet, 1987 ; Savenkoff *et al.*, 2009 ; Bernier et Chabot, 2012), ce qui pourrait expliquer un comportement pélagique du flétan du Groenland dans cet écosystème. Chez cette espèce, ces incursions dans la colonne d'eau peuvent atteindre plusieurs centaines de mètres et sont en relation avec des cycles journaliers et saisonniers (Vollen et Albert, 2008). Bien que ce comportement pélagique du flétan du Groenland semble surestimé (Albert *et al.*, 2011), cette capacité lui permettrait, ainsi qu'à la crevette nordique, non seulement de s'alimenter, mais aussi de profiter de conditions d'oxygène plus favorables. En diminuant leur exposition à l'hypoxie, les organismes pourraient redémarrer certains processus aérobie par exemple, leur permettant de refaire des réserves énergétiques et de combler leur dette en oxygène éventuelle. Cependant, le fait de remonter dans une zone plus oxygénée peut aussi provoquer un stress oxydatif et provoquer d'autres dommages. Le flétan du Groenland et la crevette nordique ayant de forts niveaux de défenses antioxydantes, il est possible que cette ré-oxygénation n'ait pas un impact trop défavorable sur eux. Il serait intéressant d'exposer ces organismes à l'hypoxie puis à une période de ré-oxygénation pour analyser les conséquences de ce processus. Il faudrait mesurer si la ré-oxygénation provoque des dommages membranaires, en testant par exemple la peroxydation des lipides chez ces deux espèces.

IMPACTS SUR LES PÊCHERIES

Dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent, si les niveaux d'oxygène continuent de diminuer, un impact économique pourrait se faire ressentir. En effet, les populations de crevettes nordiques et de flétans du Groenland font l'objet de pêches commerciales très importantes, respectivement 1 000 t dans l'estuaire dans les années 2000 (Savard, 2011), et 36 000 t en 2010 dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent réunis (DFO, 2011a) pour la crevette nordique et 3 800 t annuelles pour l'année 2010-2011 (DFO, 2011b) pour le flétan du Groenland. Les pêcheries les plus importantes sont souvent associées avec les zones où la production primaire est importante grâce aux apports terrestres (*run-off*) ou océaniques (*upwelling*), les nutriments passant le long du réseau trophique jusqu'aux espèces d'intérêt commercial (Beck *et al.*, 2001 ; Diaz, 2001). Cependant, le problème commence quand les apports deviennent trop importants et dépassent la capacité de la chaîne alimentaire à les assimiler, provoquant par exemple des phénomènes d'eutrophisation et ensuite d'hypoxie. Il peut alors y avoir des réactions en chaînes au niveau des organismes (changements physiologiques, changements de comportements... etc.), des populations (modifications de la reproduction, naissances, mortalité, migrations... etc.) et finalement de l'écosystème où le réseau trophique est modifié (Diaz et Rosenberg, 1995 ; Breitburg *et al.*, 1997 ; Diaz, 2001 ; Ekau *et al.*, 2010 ; Pörtner et Peck, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010). Ainsi, depuis les années 60, l'augmentation des zones hypoxiques/anoxiques a entraîné des changements dans les populations de poissons, remplaçant les poissons démersaux par des espèces planctoniques omnivores (e.g. Diaz, 2001 ; Wu, 2002 ; Ekau *et al.*, 2010). Plusieurs pêcheries importantes ont été touchées dans différents milieux, par exemple celle du homard de Norvège dans le Kattegat (Suède-Danemark), celle de la morue dans la mer Baltique, où encore dans la mer Noire où sur les 26 pêcheries de poissons démersaux existantes dans les années 60, seules six le sont encore (e.g. Diaz, 2001 ; Wu, 2002 ; Ekau *et al.*, 2010). Dans le Saint-Laurent, bien que les populations de flétans du Groenland ont déjà été plus importantes dans le passé, notamment avant les années 1980 (Bowering, 1982), les populations sont maintenant stables dans cette région. Les populations de crevettes nordiques ont augmenté quant à elles régulièrement depuis les années 80 et sont stables

depuis les années 2000 (DFO, 2011a ; Savard et Bourdages, 2012). Les populations de ces deux espèces se maintiennent malgré les niveaux de saturation d'oxygène très faibles, mais stables depuis les années 80, il est peu probable que l'hypoxie cause de telles chutes de leurs populations dans les conditions actuelles. Cependant, comme expliqué précédemment, l'augmentation progressive de la température de l'eau (Thibodeau *et al.*, 2010) due aux changements climatiques pourrait favoriser l'hypoxie de plusieurs façons (de Vernal *et al.*, 2011 ; Genovesi *et al.*, 2011) : en augmentant la stratification des couches d'eau et donc en limitant le mélange entre ces dernières et en limitant la ventilation hivernale de la couche d'eau profonde, en augmentant la proportion d'eaux chaudes en provenance du *Gulf Stream* (Gilbert *et al.*, 2005) et en augmentant le taux de respiration des organismes (Gillooly *et al.*, 2001). Tous ces paramètres vont faire diminuer les niveaux d'oxygène de l'eau dans les années à venir et les organismes risquent d'être touchés par une perte d'habitat et par une réduction de leur capacité à faire face aux différentes contraintes. Si la superficie de leur habitat diminue, ils auront donc moins de refuges pour se protéger de l'impact de la pêche. Il est donc nécessaire de continuer à surveiller leur population, ainsi qu'à contrôler les pêches autorisées (Gewin, 2010).

VARIABILITÉ DES RÉPONSES

VARIABILITÉ INTER-INDIVIDUELLE

Dans mon étude, de fortes variabilités interindividuelles ont été enregistrées, que ce soit sur les réponses au niveau enzymatique ou de l'expression génique, face à différents niveaux d'hypoxie. Ce phénomène a déjà été observé dans le cadre d'une étude sur l'hypoxie chez le tambour croca (Cooper *et al.*, 2002).

Ceci peut être dû à plusieurs facteurs. Tout d'abord, chez les organismes qui muent, comme les crevettes, les niveaux de réponses peuvent être modifiés par le phénomène de mue, comme démontré chez la crevette *P. pugio* (Brown-Peterson *et al.*, 2011). Dans mon étude, les crevettes utilisées n'étaient pas en période de mue, à savoir que leur carapace

n'était pas molle. Cependant, nous avons remarqué que l'exposition à l'hypoxie semblait déclencher des mues (Chabot, communication personnelle), il est possible que certaines crevettes aient commencé les processus physiologiques menant à la mue et que cela ait eu des répercussions sur les réponses enzymatiques observées. Cooper *et al.* (2002) ont également démontré que l'activité des enzymes peut différer en fonction de la région du tissu prélevé. Normalement, cela ne doit pas avoir d'impact dans mon étude car ce phénomène a été pris en compte lors des dissections et c'est toujours la même zone qui a été échantillonnée. Le facteur qui a le plus d'impact sur la variabilité interindividuelle des réponses serait l'historique de l'organisme. En effet, les organismes utilisés pour mes expériences ont été capturés dans le milieu naturel et donc déjà soumis à des conditions hypoxiques. À cause de sa condition générale ou de son bagage génétique, chaque individu peut avoir une tolérance à l'hypoxie différente. Selon l'intensité des conditions hypoxiques rencontrées, certains individus peuvent s'être acclimatés à de faibles conditions d'oxygène alors que d'autres non, (Pörtner et Grieshaber, 1993 ; Rees *et al.*, 2001 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Bickler et Buck, 2007) ce qui implique des réponses différentes au niveau enzymatique.

La variabilité interindividuelle observée dans mon étude est accentuée par le nombre restreint d'individus utilisés. Plusieurs auteurs ont montré dans leurs recherches que cette variabilité peut cacher certaines réponses ou en diminuer l'importance (Cooper *et al.*, 2002 ; Brown-Peterson *et al.*, 2011 ; Everett *et al.*, 2012). Il serait intéressant de faire des expériences avec un plus grand nombre d'individus pour diminuer l'impact de cette variabilité interindividuelle sur les analyses et voir si les réponses observées restent les mêmes.

VARIABILITÉ INTER-TISSUS

Dans mon étude, les réponses des métabolismes aérobie et anaérobie ont été mesurées dans le muscle, choisi car il peut fonctionner à de forts taux métaboliques (Bennett, 1978 ;

Hochachka, 1985) et a une fonction anaérobie importante. Les niveaux de défenses antioxydantes ont quant à elles été analysées dans le foie/hépatopancreas car ce tissu a non seulement un rôle de détoxification et de dégradation des produits métaboliques, mais est aussi le plus sensible au stress oxydatif (Ruppert *et al.*, 2004) et les réponses antioxydantes y sont très marquées. Les réponses des différents tissus à l'hypoxie s'est avérée différente. Cette hétérogénéité des réponses est due aux interactions entre les demandes énergétiques, le rôle métabolique du tissu et l'apport en oxygène à chaque tissu (Martínez *et al.*, 2006). L'apport en oxygène aux différents tissus n'a pas vraiment pu être pris en compte dans mon étude car uniquement deux tissus ont été analysés et il n'y a pas eu plusieurs échantillonnages au cours du temps. Lors d'une exposition à l'hypoxie, certains organes reçoivent de l'oxygène en priorité et sont donc protégés de l'hypoxie en début d'exposition (Everett *et al.*, 2012). Chez le fondule, des études analysant un plus grand nombre de tissus montrent que le cerveau et le cœur semblent moins affectés que le foie et le muscle lors d'une exposition à l'hypoxie, peut être parce qu'ils sont privilégiés pour l'apport en oxygène (Martínez *et al.*, 2006). Dans mon étude, j'aurais donc analysé les deux tissus les plus susceptibles d'être affectés par l'hypoxie et montrant le plus de réponses. Cependant, il serait intéressant d'analyser d'autres tissus, tels que le cœur ou le cerveau, pour voir comment ces organes répondent à l'hypoxie et si avec ces réponses, les stratégies des organismes face à ce stress sont mieux compréhensibles. De plus, en hypoxie chronique, il serait intéressant de faire plusieurs échantillonnages à des échelles de temps différentes pour voir, du foie ou du muscle, quel est le tissu privilégié en oxygène, et si le facteur "temps" pourrait expliquer une partie des différences de réponses entre ces deux tissus.

PERSPECTIVES

Cette étude a permis d'améliorer les connaissances sur les impacts de l'hypoxie sur deux espèces commercialement importantes dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent et les réponses de ces dernières. Pour améliorer encore ces connaissances et aller plus loin dans la compréhension de la résistance de ces deux espèces à l'hypoxie, il serait intéressant d'effectuer certaines recherches complémentaires.

Tout d'abord, il serait intéressant d'exposer ces espèces à l'hypoxie pendant des durées plus importantes et de faire des analyses à différents intervalles de temps. Bien que la réponse principale à l'hypoxie chronique soit une diminution de la capacité métabolique, chez certaines espèces de poisson, les niveaux enzymatiques reviennent à la normale après un certain temps (Greaney *et al.*, 1980). Des mesures temporelles permettraient de voir les variations enzymatiques entre le début et la fin de l'expérience et de voir s'il y a une acclimatation du flétan du Groenland ou de la crevette nordique au cours du temps en observant si les activités enzymatiques reviennent à leur niveau normal.

Il serait également important de faire des analyses enzymatiques dans plusieurs autres tissus que le muscle et le foie, comme par exemple dans le cerveau ou le cœur, comme l'ont déjà fait d'autres auteurs chez d'autres espèces (Lushchak *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2006). Cela permettrait d'étudier de façon plus globale la réponse de ces organismes aux faibles conditions d'oxygène et de voir si certains tissus sont privilégiés au niveau de l'apport en oxygène.

Des mesures de réserves énergétiques, comme des dosages de glycogène, pourraient être réalisées. Il est possible que ces deux espèces aient de grandes réserves énergétiques qui leur permettent de survivre longtemps malgré des taux métaboliques réduits. En effet, de fortes réserves énergétiques augmentant les chances de survie lors de conditions environnementales contraignantes (Hochachka, 1997). Ces expériences devraient être réalisées hors période de mue ou de reproduction, car ces processus demandent beaucoup d'énergie aux organismes, et à différentes période de l'année pour voir si un effet saisonnier est observé.

De mesures de sous-produits métaboliques tels que des dosages de lactate seraient utiles pour vérifier s'il y a une accumulation de produits toxiques dans l'organisme des animaux et de vérifier s'ils se créent une dette en oxygène lorsqu'ils sont exposés à l'hypoxie.

Dans mon étude, les défenses antioxydantes enzymatiques ont été mesurées mais pas le stress oxydatif lui-même. Normalement, ces deux paramètres réagissent l'un par rapport à l'autre mais il serait intéressant de vérifier ce point. Si le stress oxydatif est important chez ces organismes en hypoxie, les augmentations ou le maintien d'une forte capacité antioxydante sont en réponse à ce dernier mais si le stress oxydatif est faible, l'augmentation des défenses est un processus de préparation à une ré-oxygénation.

Mes résultats permettent de mieux comprendre les réponses secondaires au stress hypoxique mais il serait important de voir les réponses tertiaires. Il est possible que des niveaux d'oxygène plus faibles que ceux utilisés ici aient un impact sur la crevette nordique et le flétan du Groenland. Il est possible que la croissance, l'alimentation ou la reproduction par exemple soient affectées et que cela ait un impact au niveau de la population et de l'écosystème.

Concernant les études des impacts de l'hypoxie sur les différentes espèces, le problème principal est la difficulté de comparer ces études entre elles. Chaque espèce a bien entendu son caractère propre, sa résistance spécifique et des réponses différentes à cette contrainte. Les études utilisent chacune un plan expérimental différent, avec une durée et une intensité d'exposition aux faibles niveaux d'oxygène variables, des tissus différents et un nombre limité d'enzymes et/ou de gènes analysés, ce qui augmente encore la difficulté de comparaison (Ross *et al.*, 2001 ; Martínez *et al.*, 2006 ; Abbaraju et Rees, 2012). Il serait intéressant, bien que difficilement réalisable, de normaliser les plans expérimentaux, les durée et intensité d'exposition, les tissu analysés... etc. pour les différentes études dans le futur.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Pour la première fois, la réponse enzymatique et génique à un stress hypoxique aigu et chronique a été étudiée chez la crevette nordique et le flétan du Groenland. Mes résultats illustrent l'importance de ne pas faire de généralisation lorsque l'on décrit la réponse à l'hypoxie, tel que déjà indiqué par Cooper *et al.* (2002) et Webster (2003).

Chez la crevette nordique, on constate que l'hypoxie aiguë semble plus problématique pour les femelles que l'hypoxie chronique car leurs capacités aérobie et anaérobie maximales chutent, ainsi qu'une partie de leurs défenses antioxydantes. Les mâles semblent plus résistants à l'hypoxie aiguë car ils sont capables, malgré une diminution de leur capacité anaérobie, d'avoir une capacité aérobie similaire à celle observée en normoxie et d'augmenter leur potentiel antioxydant. En hypoxie chronique, les deux sexes résistent bien à la contrainte en oxygène, grâce à l'utilisation combinée d'une diminution d'activité enzymatique qui devrait refléter une baisse des capacités métaboliques maximales et possiblement une diminution de la demande énergétique dans les tissus, et de l'augmentation de défenses antioxydantes. Il faut noter que les mêmes réponses sont observées quelque que soit le niveau d'hypoxie chronique auquel la crevette nordique a été exposée dans cette étude. Il est probable que la crevette nordique mette en place ces réponses à partir de niveaux d'oxygène plus importants que ceux étudiés ici, limitant ses dépenses énergétiques très rapidement, ce qui lui laisse une plus grande marge de manœuvre lorsque l'oxygène devient encore plus limitant. En règle générale, la crevette nordique exposée à l'hypoxie semble limiter ses dépenses énergétiques, ce qui lui permet sans doute de survivre dans des milieux hypoxiques tels que l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. Mes résultats démontrent que la crevette nordique est capable de maintenir d'importants niveaux d'enzymes antioxydantes, et même parfois d'augmenter ces niveaux enzymatiques, lui donnant ainsi une grande capacité de protection en cas d'apparition de

stress oxydatif. Cette espèce devrait donc parvenir à éviter des dommages membranaires en cas de variations d'oxygène dans le milieu.

Le flétan du Groenland limite également ses dépenses énergétiques, *via* une baisse de la capacité enzymatique liée tant au métabolisme aérobie qu'anaérobie, couplée à un maintien des défenses antioxydantes, pour survivre aux faibles conditions d'oxygène, que cette contrainte soit aigüe ou chronique. Chez les juvéniles, au niveau enzymatique, l'hypoxie aigüe ou chronique a sensiblement les mêmes impacts. Les adultes semblent plus résistants que les juvéniles aux faibles taux de saturation d'oxygène car ils sont capables d'augmenter leurs défenses antioxydantes et d'avoir une capacité aérobie en hypoxie aigüe similaire à celle observée en normoxie.

L'utilisation des méthodes de génomique et d'enzymologie chez les flétans du Groenland juvéniles a donné des résultats complémentaires. Ceci me permet d'envisager que l'hypoxie aurait un effet inhibiteur sur le processus de traduction.

Les crevettes nordiques et les flétans du Groenland sont capables de réguler leurs activités enzymatiques reliées tant au métabolisme aérobie qu'anaérobie à la baisse en hypoxie, tout en maintenant de fortes défenses antioxydantes pour se protéger contre de possibles dommages oxydatifs. Mes résultats permettent de conclure que ces deux espèces sont résistantes à l'hypoxie et peuvent survivre à de faibles niveaux d'oxygène, ce qui explique le maintien de leur présence dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbaraju, N. V., et Rees, B. B. (2012). Effects of dissolved oxygen on glycolytic enzyme specific activities in liver and skeletal muscle of *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 615-624.
- Abele-Oeschger, D., Sartoris, F. J., et Pörtner, H.-O. (1997). Hydrogen peroxide causes a decrease in aerobic metabolic rate and in intracellular pH in the shrimp *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 117: 123-129.
- Abele, D., Roecken, D., Graeve, M., et Buck, B. H. (2007). Body growth, mitochondrial enzymatic capacities and aspects of the antioxidant system and redox balance under calorie restriction in young turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). *Aquaculture Research*, 38: 467-477.
- Aït Youcef, W., Lambert, Y., et Audet, C. (2013). Spatial distribution of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* in relation to abundance and hypoxia in the Estuary and Gulf of St. Lawrence. *Fisheries Oceanography*, 22: 41-60.
- Albert, O. T., Lambert, Y., Vollen, T., Freitas, C., et Heggebakken, L. (2011). Distinguishing pelagic and demersal swimming of deepwater flatfish by recording of body angles. *American Fisheries Society Symposium*, 76: 507-527.
- Archambault, D., Bourdages, H., Bernier, B., Fréchet, A., Gauthier, J., Grégoire, F., Lambert, J., et Savard, L. (2012). Preliminary results from the groundfish and shrimp multidisciplinary survey in August 2011 in the Estuary and northern Gulf of St. Lawrence. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat, Research Document*, 2011/112: vi + 97 p.
- Baden, S. P., Loo, L.-O., Pihl, L., et Rosenberg, R. (1990). Effects of eutrophication on benthic communities including fish: Swedish west coast. *Ambio*, 19: 113-122.
- Bailey, D. M., Genard, B., Collins, M. A., Rees, J.-F., Unsworth, S. K., Battle, E. J. V., Bagley, P. M., Jamieson, A. J., et Priede, I. G. (2005). High swimming and metabolic activity in the deep-sea eel *Synaphobranchus kaupii* revealed by integrated in situ and in vitro measurements. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78: 335-346.

- Barnes, R., King, H., et Carter, C. G. (2011). Hypoxia tolerance and oxygen regulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* from a Tasmanian population. *Aquaculture*, 318: 397-401.
- Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpern, B., Hays, C. G., Hoshino, K., Minello, T. J., Orth, R. J., Sheridan, P. F., et Weinstein, M. P. (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience*, 51: 633-641.
- Bennett, A. F. (1978). Activity metabolism of the lower vertebrates. *Annual Review of Physiology*, 40: 447-469.
- Bergström, B. (2000). The biology of *Pandalus*. *Advances in Marine Biology*, 38: 55-245.
- Bernier, B., et Chabot, D. (2012). Assessment of Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) stock status in the Gulf of St. Lawrence (4RST) in 2010 and diet description for this population. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat, Research Document*, 2012/XX: ix + 87 p.
- Bickler, P. E., et Buck, L. T. (2007). Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, 69: 145-170.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., et Trakatellis, A. G. (2002). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1931-1937.
- Boutilier, R. G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *Journal of Experimental Biology*, 204: 3171-3181.
- Bowering, W. (1982). Population dynamics of Greenland halibut in the Gulf of St. Lawrence. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 3: 141-147.
- Bowering, W. (1983). Le Turbot de Groenland. Dans *Le Monde Sous-Marin*, Pêches et Océans (Ed.), Ottawa, Ministère des Pêches et Océans Canada: 5 p.
- Bradford, S. M., et Taylor, A. C. (1982). The respiration of *Cancer pagurus* under normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Experimental Biology*, 97: 273-288.
- Breitburg, D. L., Loher, T., Pacey, C. A., et Gerstein, A. (1997). Varying effects of low dissolved oxygen on trophic interactions in an estuarine food web. *Ecological Monographs*, 67: 489-507.
- Brouwer, M., Brown-Peterson, N. J., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., et Denslow, N. (2008). Changes in mitochondrial gene and protein expression in grass shrimp,

- Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Marine Environmental Research*, 66: 143-145.
- Brouwer, M., Brown-Peterson, N. J., Larkin, P., Patel, V., Denslow, N., Manning, S., et Brouwer, T. H. (2007). Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 341: 16-31.
- Brouwer, M., Larkin, P., Brown-Peterson, N., King, C., Manning, S., et Denslow, N. (2004). Effects of hypoxia on gene and protein expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research*, 58: 787-792.
- Brown-Peterson, N., Manning, C., Denslow, N., et Brouwer, M. (2011). Impacts of cyclic hypoxia on reproductive and gene expression patterns in the grass shrimp: field versus laboratory comparison. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, 73: 127-141.
- Brown-Peterson, N. J., Larkin, P., Denslow, N., King, C., Manning, S., et Brouwer, M. (2005). Molecular indicators of hypoxia in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine Ecology Progress Series*, 286: 203-215.
- Brown-Peterson, N. J., Manning, C. S., Patel, V., Denslow, N. D., et Brouwer, M. (2008). Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Biological Bulletin*, 214: 6-16.
- Burke, E. M. (1979). Aerobic and anaerobic metabolism during activity and hypoxia in two species of intertidal crabs. *Biology Bulletin*, 156: 157-168.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., et Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.
- Chabot, D. (2004). Chronic non-lethal levels of hypoxia limit distribution and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northern Gulf of Saint-Lawrence, Canada. Dans *Proceedings of the Seventh International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality*, Rupp, G. L., et White, M. D. (Ed.), Tallinn, Estonia, U.S. Environmental Protection Agency, Ecosystems Research Division, Athens, Georgia, USA, EPA 600/R-04/049: 183-205.
- Chabot, D., et Claireaux, G. (2008). Environmental hypoxia as a metabolic constraint on fish: The case of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 287-294.

- Chabot, D., et Dutil, J.-D. (1999). Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology*, 55: 472-491.
- Childress, J. J., et Somero, G. N. (1979). Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 52: 273-283.
- Chippari-Gomes, A. R., Gomes, L. C., Lopes, N. P., Val, A. L., et Almeida-Val, V. M. F. (2005). Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 141: 347-355.
- Choi, J., Roche, H., et Caquet, T. (2000). Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: Potential biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 495-500.
- Claireaux, G., et Dutil, J.-D. (1992). Physiological response of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) to hypoxia at various environmental salinities. *Journal of Experimental Biology*, 163: 97-118.
- Claireaux, G., Webber, D., Kerr, S., et Boutilier, R. (1995). Physiology and behaviour of free-swimming Atlantic cod (*Gadus morhua*) facing fluctuating temperature conditions. *Journal of Experimental Biology*, 198: 49-60.
- Cooper, R. U., Clough, L. M., Farwell, M. A., et West, T. L. (2002). Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279: 1-20.
- Czyzyk-Krzeska, M. F. (1997). Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Respiration Physiology*, 110: 99-111.
- D'Amours, D. (1993). The distribution of cod (*Gadus morhua*) in relation to temperature and oxygen level in the Gulf of St. Lawrence. *Fisheries Oceanography*, 2: 24-29.
- Dalla Via, J., Van den Thillart, G., Cattani, O., et Cortesi, P. (1998). Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 2108-2113.
- Daoud, D. (2008). *Acquisition et allocation de l'énergie chez la crevette nordique, Pandalus borealis à différentes températures*. Thèse de doctorat en Océanographie, Rimouski, Université du Québec à Rimouski : 185 p.
- Daoud, D., Chabot, D., Audet, C., et Lambert, Y. (2007). Temperature induced variation in oxygen consumption of juvenile and adult stages of the northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347: 30-40.

- de Vernal, A., St-Onge, G., et Gilbert, D. (2011). Oceanography and Quaternary geology of the St. Lawrence Estuary and the Saguenay Fjord. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 14: 012004.
- Demple, B. (1999). Radical ideas: genetic responses to oxidative stress. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 26: 64-68.
- DFO (2008). Assessment of the *Greenland Halibut* stock in the Gulf of the St. Lawrence (4RST) in 2007. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Science Advisory Report 2008/044*.
- DFO (2009). Assessment of the *Greenland Halibut* stock in the Gulf of the St. Lawrence (4RST) in 2008. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Science Advisory Report 2009/020*.
- DFO (2010). Assessment of the *Greenland Halibut* stock in the Gulf of the St. Lawrence (4RST) in 2009. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Science Advisory Report 2010/028*.
- DFO (2011a). Assessment of shrimp stock stock in the Estuary and Gulf of St. Lawrence in 2011. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Science Advisory Report 2012/006*.
- DFO (2011b). Assessment of the *Greenland Halibut* stock in the Gulf of the St. Lawrence (4RST) in 2010. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Science Advisory Report 2011/013*.
- Diaz, R. J. (2001). Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality*, 30: 275-281.
- Diaz, R. J., et Rosenberg, R. (1995). Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: An annual review*, 33: 245-303.
- Dupont-Prinet, A., Vagner, M., Chabot, D., et Audet, C. (2013a). Impact of hypoxia on the metabolism of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 461-469.
- Dupont-Prinet, A., Pillet, M., Chabot, D., Hansen, Tremblay, R., et Audet, C. (2013b). Hypoxia tolerance of northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Experimental Marine Biology and Ecology* (acceptation finale décembre 2012).
- Ekau, W., Auel, H., Pörtner, H.-O., et Gilbert, D. (2010). Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7: 1669-1699.

- Everett, M. V., Antal, C. E., et Crawford, D. L. (2012). The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317: 9-23.
- Forgan, L. G., et Forster, M. E. (2012). Oxygen dependence of metabolism and cellular adaptation in vertebrate muscles: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182: 177-188.
- Fréchet, A. (1987). Biology and fishery of Greenland halibut in the Gulf of St. Lawrence. *NAFO Scientific Council Studies*, 95: 11 p.
- Froeschke, J., et Stunz, G. (2012). Hierarchical and interactive habitat selection in response to abiotic and biotic factors: The effect of hypoxia on habitat selection of juvenile estuarine fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 93: 31-41.
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. Dans *Environmental Relations and Behavior*, Hoar, W. S. et Randall, D. J. (Eds.), New York, Academic Press, vol. IV: 1-98.
- Garcia, E. G. (2007). The northern shrimp (*Pandalus borealis*) offshore fishery in the northeast Atlantic. *Advances in Marine Biology*, 52: 147-266.
- Garcia, H. E., et Gordon, L. I. (1992). Oxygen solubility in seawater: Better fitting equations. *Limnology and Oceanography*, 37: 1307-1312.
- Genovesi, L., De Vernal, A., Thibodeau, B., Hillaire-Marcel, C., Mucci, A., et Gilbert, D. (2011). Recent changes in bottom water oxygenation and temperature in the Gulf of St. Lawrence: Micropaleontological and geochemical evidence. *Limnology and Oceanography*, 56: 1319-1329.
- Gewin, V. (2010). Dead in the water. *Nature*, 466: 812-814.
- Gilbert, D., Chabot, D., Archambault, P., Rondeau, B., et Hébert, S. (2007). Appauvrissement dans les eaux profondes du Saint-Laurent marin : Causes possibles et impacts écologiques. *Le naturaliste canadien*, 131: 67-75.
- Gilbert, D., Sundby, B., Gobeil, C., Mucci, A., et Tremblay, G.-H. (2005). A seventy-two-year record of diminishing deep-water oxygen in the St. Lawrence Estuary: The northwest Atlantic connection. *Limnology and Oceanography*, 50: 1654-1666.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., et Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293: 2248-2251.

- Gracey, A. Y., Troll, J. V., et Somero, G. N. (2001). Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 1993-1998.
- Greaney, G. S., Place, A. R., Cashion, R. E., Smith, G., et Powers, D. A. (1980). Time course of changes in enzyme activities and blood respiratory properties of killifish during long-term acclimation to hypoxia. *Physiological Zoology*, 53: 136-144.
- Gundersen, A. C., Kjesbu, O. S., Nedreaas, K. H., et Stene, A. (1999). Fecundity of northeast Arctic Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 25: 29-36.
- Guppy, M., et Withers, P. (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews*, 74: 1-40.
- Hall, J. R., Short, C. E., Petersen, L. H., Stacey, J., Gamperl, A. K., et Driedzic, W. R. (2009). Expression levels of genes associated with oxygen utilization, glucose transport and glucose phosphorylation in hypoxia exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4: 128-138.
- Hammen, C. S. (1969). Lactate and succinate oxido-reductases in marine invertebrates. *Marine Biology*, 4: 233-238.
- Hand, S. C., et Somero, G. N. (1983). Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals: adaptations to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment. *Biological Bulletin*, 165: 167-181.
- Hellou, J., Parsons, D., et Mercer, G. (1997). Organochlorine contaminants in the northern shrimp, *Pandalus borealis*, collected from the Northwest Atlantic. *Marine Environmental Research*, 44: 99-113.
- Herbert, N., et Steffensen, J. (2005). The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Marine Biology*, 147: 1403-1412.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., et Storey, K. B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120: 437-448.
- Hermes-Lima, M., et Zenteno-Savin, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 133: 537-556.

- Hochachka, P. W. (1985). Fuels and pathways as designed systems for support of muscle work. *Journal of Experimental Biology*, 115: 149-164.
- Hochachka, P. W. (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231: 234-241.
- Hochachka, P. W. (1997). Oxygen-A key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. *American Zoologist*, 37: 595-603.
- Hochachka, P. W., Buck, L. T., Doll, C. J., et Land, S. C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9493-9498.
- Hochachka, P. W., et Lutz, P. L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130: 435-459.
- Hofmann, A. F., Peltzer, E. T., Walz, P. M., et Brewer, P. G. (2011). Hypoxia by degrees: Establishing definitions for a changing ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 58: 1212-1226.
- Holthuis, L. B. (1980). FAO catalogue-shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries, *FAO Fisheries Synopsis - S125*, vol. 1.
- Jamieson, P. M., Nyirenda, M. J., Walker, B. R., Chapman, K. E., et Seckl, J. R. (1999). Interactions between oestradiol and glucocorticoid regulatory effects on liver-specific glucocorticoid-inducible genes: possible evidence for a role of hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of Endocrinology*, 160: 103-109.
- Johansen, J. L., Herbert, N. A., et Steffensen, J. F. (2006). The behavioural and physiological response of Atlantic cod *Gadus morhua* L. to short-term acute hypoxia. *Journal of Fish Biology*, 68: 1918-1924.
- Jordan, A. D., et Steffensen, J. F. (2007). Effects of ration size and hypoxia on specific dynamic action in the cod. *Physiological and Biochemical Zoology*, 80: 178-185.
- Jørgensen, O. A. (1997). Pelagic occurrence of Greenland halibut, *Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum), in West Greenland waters. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 21: 39-50.
- Ju, Z., Wells, M. C., Heater, S. J., et Walter, R. B. (2007). Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 145: 134-144.
- Justić, D., Rabalais, N. N., et Turner, R. E. (1996). Effects of climate change on hypoxia in coastal waters: A doubled CO₂ scenario for the northern Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography*, 41: 992-1003.
- Kleiber, M. (1947). Body size and metabolic rate. *Physiological Reviews*, 27: 511-541.
- Knox, D., Walton, M. J., et Cowey, C. B. (1980). Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Marine Biology*, 56: 7-10.
- Koutitonsky, V., et Bugden, G. L. (1991). The physical oceanography of the Gulf of the St. Lawrence: A review with emphasis on the synoptic variability of the motion. Dans *Le Golfe du Saint-Laurent : Petit Océan ou Grand Estuaire ?*, Therriault, J. C. (Ed.), Publication Spéciale Canadienne des Sciences Halieutiques et Aquatiques, vol. 113: 57-90.
- Kramer, D. (1987). Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes*, 18: 81-92.
- Larade, K., et Storey, K. (2009). Living without oxygen: Anoxia-responsive gene expression and regulation. *Current Genomics*, 10: 76-85.
- Lewis, J., et Driedzic, W. (2010). Protein synthesis is defended in the mitochondrial fraction of gill but not heart in cunner (*Tautoglabrus adspersus*) exposed to acute hypoxia and hypothermia. *Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180: 179-188.
- Livak, K. J., et Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lushchak, V. I. (2011a). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 153: 175-190.
- Lushchak, V. I. (2011b). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101: 13-30.
- Lushchak, V. I., et Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144: 283-289.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., et Storey, K. B. (2005). Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant

- potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 1319-1330.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., et Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280: R100-R107.
- Marie, B., Genard, B., Rees, J.-F., et Zal, F. (2006). Effect of ambient oxygen concentration on activities of enzymatic antioxidant defences and aerobic metabolism in the hydrothermal vent worm, *Paralvinella grasslei*. *Marine Biology*, 150: 273-284.
- Martínez-Álvarez, R., Morales, A., et Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15: 75-88.
- Martínez, M. L., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A. O., et Rees, B. B. (2006). Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 3851-3861.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F., et Donaldson, E. M. (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- McMahon, B. R. (2001). Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Respiration Physiology*, 128: 349-364.
- Mejri, S., Tremblay, R., Lambert, Y., et Audet, C. (2012). Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. *Marine Biology*, 159: 1693-1701.
- Methling, C., Aluru, N., Vijayan, M. M., et Steffensen, J. F. (2010). Effect of moderate hypoxia at three acclimation temperatures on stress responses in Atlantic cod with different haemoglobin types. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 156: 485-490.
- Neuenfeldt, S., Andersen, K. H., et Hinrichsen, H. H. (2009). Some Atlantic cod *Gadus morhua* in the Baltic Sea visit hypoxic water briefly but often. *Journal of Fish Biology*, 75: 290-294.
- Nikinmaa, M., et Rees, B. B. (2005). Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: 1079-1090.

- Nikinmaa, M., et Rytönen, K. T. (2011). Functional genomics in aquatic toxicology - Do not forget the function. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4, Supplement): 16-24.
- Nikinmaa, M., et Rytönen, K. T. (2012). From genomes to functions in aquatic biology. *Marine Genomics*, 5: 1-6.
- Olsvik, P. A., Kristensen, T., Waagbø, R., Tollefsen, K. E., Rosseland, B. O., et Toften, H. (2006). Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 2893-2901.
- Paglia, D. E., et Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70: 158-169.
- Pannunzio, T. M., et Storey, K. B. (1998). Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221: 277-292.
- Parrilla-Taylor, D. P., et Zenteno-Savín, T. (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 318: 379-383.
- Pelletier, D., Guderley, H., et Dutil, J.-D. (1993). Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rates? *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 83-93.
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V. C., et Oliva-Teles, A. (2012). The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 155: 506-516.
- Perry, R. I., et Smith, S. J. (1994). Identifying habitat associations of marine fishes using survey data: an application to the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 589-602.
- Petersen, L., et Gamperl, A. K. (2011). Cod (*Gadus morhua*) cardiorespiratory physiology and hypoxia tolerance following acclimation to low-oxygen conditions. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84: 18-31.
- Petersen, L. H., et Gamperl, A. K. (2010a). Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Experimental Biology*, 213: 808-819.

- Petersen, L. H., et Gamperl, A. K. (2010b). In situ cardiac function in Atlantic cod (*Gadus morhua*): effects of acute and chronic hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 213: 820-830.
- Petersen, M. F., et Steffensen, J. F. (2003). Preferred temperature of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* with different haemoglobin genotypes at normoxia and moderate hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 206: 359-364.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356.
- Petrescu, I., Bojan, O., et Saied, M. (1979). Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Analytical Biochemistry*, 96: 279-281.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J. P., Elie, P., et Massabuau, J. C. (2007). Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environmental Science and Technology*, 41: 3005-3011.
- Pihl, L., Baden, S. P., et Diaz, R. J. (1991). Effects of periodic hypoxia on distribution of demersal fish and crustaceans. *Marine Biology*, 108: 349-360.
- Plante, S., Chabot, D., et Dutil, J. D. (1998). Hypoxia tolerance in Atlantic cod. *Journal of Fish Biology*, 53: 1342-1356.
- Pörtner, H. O., et Grieshaber, M. K. (1993). Critical $P_{O_2}(s)$ in oxyconforming and oxyregulating animals gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. Dans *The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life*, Bicudo, J. E. P. W. (Ed.), Boca Raton, CRC Press: 330-357.
- Pörtner, H. O., et Peck, M. A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 77: 1745-1779.
- Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C. D., Leotsinidis, M., et Kalpaxis, D. L. (2008). Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. *Aquatic Toxicology*, 89: 18-27.
- Quinn, G. P., et Keough, M. J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*, Cambridge, Cambridge University Press: 537 p.

- Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D., et Zhang, J. (2010). Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*, 7: 585-619.
- Racotta, I. S., Palacios, E., et Méndez, L. (2002). Short Communication: Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35: 269-275.
- Rees, B. B., Sudradjat, F. A., et Love, J. W. (2001). Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *Journal of Experimental Zoology*, 289: 266-272.
- Richmond, C., Marcus, N. H., Sedlacek, C., Miller, G. A., et Oppert, C. (2006). Hypoxia and seasonal temperature: Short-term effects and long-term implications for *Acartia tonsa dana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328: 177-196.
- Robb, T., et Abrahams, M. V. (2003). Variation in tolerance to hypoxia in a predator and prey species: an ecological advantage of being small? *Journal of Fish Biology*, 62: 1067-1081.
- Rodriguez-Marin, E., Punzon, A., et Paz, J. (1995). Feeding patterns of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in Flemish Pass (northwest Atlantic). *NAFO Scientific Council Studies*, 23: 43-54.
- Ross, S. W., Dalton, D. A., Kramer, S., et Christensen, B. L. (2001). Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 130: 289-303.
- Ruppert, E., Fox, R., et Barnes, R. (2004). *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*, Thomson-Brooks/Cole (Eds.), Toronto, Belmont, Calif.: 963 p.
- Savard, L. (2011). Catches per unit of effort and numbers at length of the northern shrimp commercial fishery in the Estuary and the northern Gulf of St. Lawrence from 1982 to 2011. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document*, 2012/005: ii + 70 p.
- Savard, L., et Bourdages, H. (2012). Update of the estimation of northern shrimp (*Pandalus borealis*) biomass and abundance from the trawl survey in the Estuary and the northern Gulf of St. Lawrence in 2011. *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document*, 2012/004: ii + 33 p.
- Savenkoff, C., Castonguay, M., Chabot, D., Hammill, M. O., Bourdages, H., et Morissette, L. (2007). Changes in the northern Gulf of St. Lawrence ecosystem estimated by

- inverse modelling: Evidence of a fishery-induced regime shift? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73: 711-724.
- Savenkoff, C., Savard, L., Morin, B., et Chabot, D. (2006). Main prey and predators of northern shrimp (*Pandalus borealis*) in the northern Gulf of St. Lawrence during the mid-1980s, mid-1990s, and early 2000s. *DFO Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2639*: v + 28 p.
- Savenkoff, C., Valois, S., Chabot, D., et Hammil, M. O. (2009). Input data and parameter estimates for ecosystem models of the northern Gulf of St. Lawrence (2003–2005). *DFO Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2829*: vi + 117 p.
- Schurmann, H., Claireaux, G., et Chartois, H. (1998). Change in vertical distribution of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during a hypoxic episode. *Hydrobiologia*, 371-372: 207-213.
- Schurmann, H., et Steffensen, J. (1992). Lethal oxygen levels at different temperatures and the preferred temperature during hypoxia of the Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology*, 41: 927-934.
- Scott, W. B., et Scott, M. G. (1988). Atlantic fishes of Canada. Dans *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, Department of Fisheries and Oceans (Eds.), Toronto, University of Toronto Press, vol. 219: 731 p.
- Seibel, B. A. (2011). Critical oxygen levels and metabolic suppression in oceanic oxygen minimum zones. *Journal of Experimental Biology*, 214: 326-336.
- Simard, Y., et Savard, L. (1990). Variability, spatial patterns and scales of similarity in size-frequency distributions of the northern shrimp (*Pandalus borealis*) and its migrations in the Gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 794-804.
- Soengas, J. L., et Aldegunde, M. (2002). Energy metabolism of fish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131: 271-296.
- Soitamo, A. J., Råbergh, C. M. I., Gassmann, M., Sistonen, L., et Nikinmaa, M. (2001). Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 19699-19705.
- Solmundsson, J. (2007). Trophic ecology of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) on the Icelandic continental shelf and slope. *Marine Biology Research*, 3: 231-242.

- Steffensen, J. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. *Fish Physiology and Biochemistry*, 6: 49-59.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: Animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1715-1733.
- Thibodeau, B., de Vernal, A., Hillaire-Marcel, C., et Mucci, A. (2010). Twentieth century warming in deep waters of the Gulf of St. Lawrence: A unique feature of the last millennium. *Geophysical Research Letters*, 37: L17604.
- Thibodeau, B., de Vernal, A., et Mucci, A. (2006). Recent eutrophication and consequent hypoxia in the bottom waters of the lower St. Lawrence Estuary: Micropaleontological and geochemical evidence. *Marine Geology*, 231: 37-50.
- Ton, C., Stamatiou, D., Dzau, V. J., et Liew, C. C. (2002). Construction of a zebrafish cDNA microarray: Gene expression profiling of the zebrafish during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296: 1134-1142.
- Ton, C., Stamatiou, D., et Liew, C. C. (2003). Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiological Genomics*, 13: 97-106.
- Voet, D., et Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. Hoboken, N. J. (Ed.), New York, Wiley, J. and Sons: 1591 p.
- Vollen, T., et Albert, O. T. (2008). Pelagic behavior of adult Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Fishery Bulletin*, 106: 457-470.
- Wang, T., Lefevre, S., Thanh Huong, D. T., Cong, N., et Bayley, M. (2009). The effects of hypoxia on growth and digestion. *Fish Physiology*, 27: 361-396.
- Wannamaker, C. M., et Rice, J. A. (2000). Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249: 145-163.
- Webster, K. A. (2003). Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 206: 2911-2922.
- Woo, S., Jeon, H.-Y., Kim, S.-R., et Yum, S. (2011). Differentially displayed genes with oxygen depletion stress and transcriptional responses in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6: 348-356.
- Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia : From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 35-45.

- Wu, R. S. S., Lam, P. K. S., et Wan, K. L. (2002). Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). *Environmental Pollution*, 118: 351-355.
- Yaikin, J., Quiñones, R. A., et González, R. R. (2002). Aerobic respiration rate and anaerobic enzymatic activity of *Petrolisthes laevigatus* (Anomura, Porcellanidae) under laboratory conditions. *Journal of Crustacean Biology*, 22: 345-352.
- Zammit, V. A., et Newsholme, E. A. (1976). The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochemical Journal*, 160: 447-462.
- Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A. J., Levin, L., Naqvi, S. W. A., Middelburg, J. J., Scranton, M., Ekau, W., Pena, A., Dewitte, B., Oguz, T., Monteiro, P. M. S., Urban, E., Rabalais, N. N., Ittekkot, V., Kemp, W. M., Ulloa, O., Elmgren, R., Escobar-Briones, E., et Van der Plas, A. K. (2010). Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences*, 7: 1443-1467.
- Zhou, B. S., Wu, R. S. S., Randall, D. J., Lam, P. K. S., Ip, Y. K., et Chew, S. F. (2000). Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *Journal of Fish Biology*, 57: 1160-1171.

ANNEXES

**ANNEXE I : RÉSULTATS DES CORRÉLATIONS DE PEARSON ENTRE ACTIVITÉ ENZYMATIQUE TOTALE
ET SPÉCIFIQUE CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES POUR L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE
HYPOXIE AIGÛE**

Tissu	Enzyme	n	R	p
Muscle	Citrate synthase	47	0,756	0,000
	Cytochrome c oxydase	47	0,839	0,000
	Lactate déshydrogénase	47	0,787	0,000
	Pyruvate kinase	47	0,851	0,000
	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	47	0,942	0,000
	Superoxyde dismutase	47	0,957	0,000
	Catalase*	40	0,890	0,000
Hépatopancréas	Glutathion peroxydase	47	0,974	0,000
	Superoxyde dismutase	47	0,988	0,000

* pour les données de catalase, une corrélation de Spearman a été réalisée au lieu d'une corrélation de Pearson

**ANNEXE II : RÉSULTATS DES CORRÉLATIONS DE PEARSON ENTRE ACTIVITÉ ENZYMATIQUE TOTALE
ET SPÉCIFIQUE CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES POUR L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À UNE
HYPOXIE CHRONIQUE**

Tissu	Enzyme	n	R	p
Muscle	Citrate synthase	82	0,772	0,000
	Cytochrome c oxydase	79	0,936	0,000
	Lactate déshydrogénase	80	0,982	0,000
	Pyruvate kinase	82	0,783	0,000
Hépatopancréas	Glutathion peroxydase	82	0,946	0,000
	Superoxyde dismutase	82	0,963	0,000

**ANNEXE III : RÉSULTATS DES CORRÉLATIONS DE PEARSON ENTRE ACTIVITÉ ENZYMATIQUE
TOTALE ET SPÉCIFIQUE CHEZ LES FLÉTANS DU GROENLAND POUR L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À
UNE HYPOXIE AIGÛE**

Tissu	Enzyme	n	R	p
Muscle	Citrate synthase	46	0,928	0,000
	Lactate déshydrogénase	46	0,959	0,000
	Pyruvate kinase	46	0,881	0,000
	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	44	0,922	0,000
	Superoxyde dismutase	46	0,676	0,000
	Catalase	44	0,807	0,000
Foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	46	0,711	0,000
	Glutathion peroxydase	46	0,948	0,000
	Superoxyde dismutase	41	0,975	0,000

**ANNEXE IV : RÉSULTATS DES CORRÉLATIONS DE PEARSON ENTRE ACTIVITÉ ENZYMATIQUE
TOTALE ET SPÉCIFIQUE CHEZ LES FLÉTANS DU GROENLAND POUR L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION À
UNE HYPOXIE CHRONIQUE**

Tissu	Enzyme	n	R	p
Muscle	Citrate synthase	38	0,856	0,000
	Lactate déshydrogénase	40	0,935	0,000
	Pyruvate kinase	40	0,868	0,000
Foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	40	0,731	0,000
	Glutathion peroxydase	39	0,939	0,000
	Superoxyde dismutase	39	0,980	0,000

**ANNEXE V : ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (U/MG DE PROTÉINE) CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES
EXPOSÉES À UNE HYPOXIE SÉVÈRE OU RESTÉES EN NORMOXIE (MOYENNE ± ERREUR TYPE)**

Sexe	Tissu	Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Femelles	Muscle	Citrate synthase	0,01 ± 0,001	0,008 ± 0,001*
		Cytochrome c oxydase	0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001
		Lactate déshydrogénase	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,01**
		Pyruvate kinase	0,33 ± 0,06	0,17 ± 0,03*
		Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,01 ± 0,003	0,004 ± 0,001*
		Superoxyde dismutase	0,97 ± 0,3	0,5 ± 0,1
		Catalase	1,42 ± 0,3	1,27 ± 0,3
	Hépatopancréas	Glutathion peroxydase	0,01 ± 0,003	0,02 ± 0,002
		Superoxyde dismutase	64,4 ± 12,7	25,7 ± 5,9*
	Mâles	Muscle	Citrate synthase	0,011 ± 0,001
Cytochrome c oxydase			0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001
Lactate déshydrogénase			0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Pyruvate kinase			0,3 ± 0,04	0,32 ± 0,04
Phosphoénolpyruvate carboxykinase			0,006 ± 0,001	0,003 ± 0,0004*
Superoxyde dismutase			1,01 ± 0,2	0,32 ± 0,1***
Catalase			0,65 ± 0,1	0,8 ± 0,2
Hépatopancréas		Glutathion peroxydase	0,004 ± 0,002	0,02 ± 0,003***
		Superoxyde dismutase	64,9 ± 11,1	28,9 ± 7,6**

Pour les témoins, n = 13 pour les femelles sauf pour la mesure de la Cat (n = 12) et n = 10 pour les mâles sauf pour la mesure de la Cat (n = 8) et en hypoxie aigüe, n = 10 pour les femelles sauf pour la mesure de la Cat (n = 8) et n = 14 pour les mâles sauf pour la mesure de la Cat (n = 12). La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001).

**ANNEXE VI : ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (U/MG DE PROTÉINE) CHEZ LES CREVETTES NORDIQUES
EXPOSÉES À DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE OU RESTÉES EN NORMOXIE (MOYENNE
± ERREUR TYPE)**

Sexe	Tissu	Enzyme	20 % sat.	30 % sat.	40 % sat.	100 % sat.	
Femelles	Muscle	Citrate synthase	0,006 ± 0,001 ^a	0,007 ± 0,001 ^a	0,006 ± 0,001 ^a	0,01 ± 0,001 ^b	
		Cytochrome c oxydase	0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,0002	0,001 ± 0,0002	0,001 ± 0,0001	
		Lactate déshydrogénase	0,01 ± 0,003 ^a	0,06 ± 0,02 ^b	0,02 ± 0,01 ^{ab}	0,13 ± 0,01 ^c	
		Pyruvate kinase	0,28 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,33 ± 0,1	
	Hépatopancréas	Glutathion peroxydase	0,03 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,004 ^{ab}	0,02 ± 0,003 ^{ab}	0,01 ± 0,003 ^a	
		Superoxyde dismutase	68 ± 12,5	87,4 ± 22,7	73,5 ± 15,8	64,4 ± 12,7	
	Mâles	Muscle	Citrate synthase	0,008 ± 0,001 ^a	0,007 ± 0,001 ^a	0,008 ± 0,001 ^a	0,01 ± 0,001 ^b
			Cytochrome c oxydase	0,001 ± 0,0002	0,001 ± 0,0003	0,001 ± 0,0002	0,001 ± 0,0001
Lactate déshydrogénase			0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	
Pyruvate kinase			0,35 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,3 ± 0,04	
Hépatopancréas		Glutathion peroxydase	0,03 ± 0,003 ^b	0,03 ± 0,003 ^b	0,03 ± 0,003 ^b	0,004 ± 0,002 ^a	
		Superoxyde dismutase	106,2 ± 19,2 ^b	37,3 ± 13,1 ^a	117 ± 28,6 ^b	63,9 ± 11,1 ^{ab}	

Pour les femelles, n = 13 pour le groupe témoin, n = 10 pour les groupes à 40 % sat. et 20 % sat. (sauf pour la mesure de la LDH où n = 9) et n = 9 pour le groupe à 30 % sat. et chez les mâles, n = 10. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes.

**ANNEXE VII : ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (U/MG DE PROTEINE) CHEZ LES FLÉTANS DU GROENLAND
EXPOSÉS À UNE HYPOXIE SÉVÈRE OU RESTÉS EN NORMOXIE (MOYENNE ± ERREUR TYPE)**

Sexe	Tissu	Enzyme	Normoxie	Hypoxie aigüe
Juvéniles	Muscle	Citrate synthase	0,016 ± 0,002	0,013 ± 0,001
		Lactate déshydrogénase	0,63 ± 0,1	0,37 ± 0,05*
		Pyruvate kinase	0,3 ± 0,03	0,26 ± 0,02
		Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001
		Superoxyde dismutase	219,6 ± 16,3	204,5 ± 20
		Catalase	10,41 ± 0,8	6,59 ± 1,1*
	Foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,004 ± 0,0003	0,003 ± 0,0002
		Glutathion peroxydase	0,007 ± 0,001	0,006 ± 0,001
		Superoxyde dismutase	6,4 ± 1	4,71 ± 0,7
	Adultes	Muscle	Citrate synthase	0,01 ± 0,003
Lactate déshydrogénase			0,93 ± 0,2	1,24 ± 0,2
Pyruvate kinase			0,3 ± 0,08	0,43 ± 0,08
Phosphoénolpyruvate carboxykinase			0,003 ± 0,0003	0,002 ± 0,0003*
Superoxyde dismutase			246,7 ± 39,4	225,7 ± 18,6
Catalase			9,45 ± 1,3	12,6 ± 1,2
Foie		Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,003 ± 0,0002	0,03 ± 0,0001
		Glutathion peroxydase	0,006 ± 0,002	0,006 ± 0,001
		Superoxyde dismutase	1,09 ± 0,3	2,23 ± 0,3*

Pour les témoins, n = 10 sauf pour la mesure de la SOD dans le foie (n = 8 pour les adultes et n = 9 pour les juvéniles) et pour la mesure de la Cat chez les adultes (n = 8) et en hypoxie aigüe, n = 14 pour les adultes sauf pour la mesure de la SOD dans le foie (n = 12) et n = 12 pour les juvéniles. La présence d'astérisque indique une différence significative entre témoins et individus exposés à une hypoxie aigüe (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001).

**ANNEXE VIII : ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (U/MG DE PROTÉINE) CHEZ LES FLÉTANS DU GROENLAND
EXPOSÉS À DIFFÉRENTS NIVEAUX D'HYPOXIE CHRONIQUE OU RESTÉS EN NORMOXIE (MOYENNE ±
ERREUR TYPE ; N = 10)**

Sexe	Tissu	Enzyme	20 % sat.	30 % sat.	40 % sat.	100 % sat.
Juvéniles	Muscle	Citrate synthase	0,008 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,002 ^a	0,02 ± 0,002 ^b
		Lactate déshydrogénase	0,18 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,1 ^a	0,63 ± 0,1 ^b
		Pyruvate kinase	0,11 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,3 ± 0,03 ^b
	Foie	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,003 ± 0,0001	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0002	0,004 ± 0,0002
		Glutathion peroxydase	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001
		Superoxyde dismutase	3,72 ± 0,8	0,92 ± 1,9	5,06 ± 1,1	6,4 ± 1

Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes.

