

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**PROFIL DE SYNTHÈSE DE PROTÉINES ANTIGEL CHEZ LE LOUP DE
MER (*Anarhichas lupus* & *A. minor*) :**

**Caractérisation selon l'espèce, l'âge, la saison et la température et applications en
mariculture en eaux froides**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**comme exigence partielle
du programme de**

MAÎTRISE EN GESTION DE LA FAUNE ET DE SES HABITATS

PAR

MARIÈVE DESJARDINS

Juin 2005

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.

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.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce projet. Sans eux, rien n'aurait été possible.

Merci tout d'abord aux valeureux techniciens aquacoles (Jean-Claude Blais et Tony Grenier), pour leur travail efficace et soutenu. Sans leurs nombreux sauvetages de poissons expérimentaux en perdition, leurs sacrifices, leurs miracles d'ingéniosité et leur indéfectible motivation, mon projet aurait pris l'eau...salée!

Merci au Dr. Garth Fletcher ainsi qu'à toute son équipe du Ocean Sciences Center au Memorial University of Newfoundland (Dr Ming Kao, Madonna King, Dr Margaret Shears, Dr Robert Evans et Tracy Grantor) et d'Aquabounty Technologies (Shinn Hwang) pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse et leur bonne humeur contagieuse.

Merci au Dr Nathalie Le François, co-directrice de mes travaux, ainsi qu'à son assistant de recherche, Simon Lamarre.

Grand merci à mon directeur, le Dr Pierre Blier, zen d'entre les zens, qui m'a fait une confiance sereine et inébranlable jusqu'à la fin. Mes discussions avec lui furent toujours des moments de qualité, « zenifiants » (voir dictionnaire Desjardins/Français) et essentiels à ma progression.

Et enfin, merci à mes parents, à mon frerot et à mes grandes amies (Jacynthe, Élane et spécialement Véronique, avec laquelle j'ai partagé jusqu'au sprint final de

rédaction !) qui de l'extérieur, n'ont jamais manqué de m'insuffler un peu d'énergie lorsqu'elle venait à manquer dans ma bulle ès science... Vive la télépathie, internet... et le forfait « 20\$ ami »!

Vous faites tous partie intégrante de ma réussite!

Je tiens également à remercier les organisations qui m'ont soutenue personnellement (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, Fondation de l'UQAR, Québec-Océan) ou à travers le financement du projet (CORPAQ; projet no. 101104: Blier, Le François & Fletcher). Sans oublier le Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière (division du MAPAQ) dont les installations ont gracieusement été mises à ma disposition et dont chaque employé m'a aidé, à sa façon.

Petit épilogue...

La Maîtrise fut pour moi plus qu'une initiation à la recherche. Ce fut une véritable expérience de vie, avec tout ce qu'elle comporte de difficile, mais de (Ô combien!!!) enrichissant. Ce fut un défi, à la fois un combat, pour la plupart du temps mené en solitaire et où mon pire ennemi fut souvent moi-même... Mais je me suis bien botté le derrière!

J'en sors avec un grand sourire plein de dents, un « big cheese »!

Et je dis : « A+ »!

RÉSUMÉ

Récemment, la mariculture et les biotechnologies marines ont été désignées comme axes de développement prioritaires dans l'Est québécois. Au Québec, région tempérée, le principal défi en mariculture consiste à trouver des espèces alliant bonne performance à l'élevage et tolérance aux conditions environnementales prévalentes (basses températures hivernales et présence d'un couvert de glace). Suite à une comparaison de 47 espèces indigènes du Saint-Laurent, deux espèces de Loup de mer (famille : *Anarhichadidae*), le Loup atlantique (*Anarhichas lupus*) et le Loup tacheté (*A. minor*), ont été désignées meilleures espèces candidates pour l'élevage en eaux froides. En plus de démontrer un taux de croissance élevé dans ces conditions, ces deux espèces offrent également des possibilités quant à la diversification de la production maricole. En effet, certains produits dérivés tels que la peau et surtout, certaines biomolécules en demande sur le marché, pourraient être extraits de la biomasse résiduelle, conférant ainsi une valeur ajoutée substantielle au produit de base (le filet). La présente étude a été menée afin de valider le potentiel des espèces visées pour la capacité de synthèse d'un agent plasmatique responsable de la survie dans les eaux glaciales, la protéine antigel (PAG), laquelle démontre également un potentiel commercial. Cette validation a été obtenue par la caractérisation du profil saisonnier de synthèse de PAG chez les deux espèces de loups.

L'hystérèse thermique (baisse du point de congélation plasmatique attribuable aux PAG) et les concentrations de PAG ont été mesurées à partir du plasma de poissons acclimatés à deux traitements thermiques différents (température saisonnière et fixée à 10°C) et exposés aux fluctuations naturelles de photopériode. La contribution colligative des osmolytes et le point de congélation plasmatique total ont également été estimés. L'effet de la saison et de la température (facteurs abiotiques) ainsi que l'influence de certains facteurs biotiques, tels que l'espèce (loups atlantiques et tachetés) et l'âge (loups atlantiques adultes et juvéniles) a également été évalué.

Les résultats ont démontré que tous les poissons étaient capables de développer une protection antigel et ce, à l'année. Alors que les concentrations plasmatiques de PAG se résumaient à l'état de traces chez le Loup tacheté, le Loup atlantique (exposé au régime de température saisonnier) montrait un niveau de production élevé, tous âges confondus. Chez les adultes et les juvéniles 1+ et 2+ de cette dernière espèce, les valeurs plasmatiques maximales respectives d'hystérèse thermique (1.06 ± 0.18 , 1.00 ± 0.15 et $1.01 \pm 0.11^\circ\text{C}$) et de concentrations de PAG (14.66 ± 4.54 , 12.73 ± 3.71 et 12.84 ± 2.92 mg PAG/ml plasma) ont été atteintes en février, avec des points de congélation totaux effectifs de -1.80 ± 0.20 , -1.76 ± 0.21 et de $-1.71 \pm 0.15^\circ\text{C}$, respectivement (point de congélation minimal des eaux de l'environnement de provenance des spécimens : -1.7°C). La contribution colligative des osmolytes plasmatiques variait faiblement autour de 0.70°C durant l'année chez tous les poissons. D'après ces résultats, le Loup atlantique représente hors de tout doute un excellent candidat en vue d'un élevage en cages marines dans des eaux périodiquement glaciales et d'une diversification de la production par le biais de l'extraction des PAG à partir de la biomasse résiduelle

d'élevage. De plus, l'observation d'une importante variabilité interindividuelle de l'hystérèse thermique chez cette espèce pourrait être utilisée dans le cadre d'un programme de sélection génétique visant l'optimisation de ce trait désirable.

La synthèse de PAG, bien que fortement reliée à la température ($R^2 : 0.99$) dans les groupes exposés aux fluctuations naturelles de température, semble toutefois être contrôlée par la photopériode puisqu'une élévation de l'hystérèse thermique a simultanément été observée chez les groupes exposés aux traitements de température saisonniers et fixe à 10°C. La température modulerait vraisemblablement le niveau de rétention des PAG, en agissant sur les taux d'élimination et/ou de dénaturation de la protéine et de son ARNm. L'observation d'une corrélation positive ($R^2 : 0.5$) entre l'indice hépatosomatique et l'hystérèse thermique chez les jeunes loups atlantiques soumis au régime de température fixe à 10°C suggère un contrôle indirect de la photopériode sur la synthèse de PAG par le biais de l'augmentation du volume hépatique, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle central de la photopériode.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
 CHAPITRE PREMIER	
1.1 Introduction générale	1
1.1.1 Problématique	1
1.1.2 Aquaculture	5
1.1.3 Protéines antigél : aspects théoriques	9
1.1.4 Protéines antigél : aspects pratiques	20
1.1.5 Objectifs et hypothèses de l'étude	24
1.2 Méthodologie générale	28
1.2.1 Montage expérimental	28
1.2.2 Mesures et prélèvements sanguins	29
1.2.3 Mesure des paramètres plasmatiques	30
1.2.4 Facteur de condition et indice hépatosomatique	33
1.2.5 Analyses statistiques	34
 CHAPITRE 2	
Seasonal modulation of antifreeze protein synthesis into wolffish species (<i>Anarhichas lupus</i> and <i>A. minor</i>)	35
2.1 Résumé	36
2.2 Introduction	37
2.3 Matériel & méthodes	40
2.4 Résultats	44
2.5 Discussion	54

CHAPITRE 3

Ontogeny of antifreeze protein synthesis in Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>)	61
3.1 Résumé	62
3.2 Introduction	63
3.3 Matériel & méthodes	66
3.4 Résultats	71
3.5 Discussion	79

CHAPITRE 4

4.1 Conclusion générale	87
4.2 Bibliographie générale	93

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 1. Mean condition factor (K) values in Atlantic and Spotted wolffish (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature).

CHAPITRE 3

Table 1. Pearson correlation coefficient values obtained among seawater temperature (SWT), thermal hysteresis (TH), colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point (MP) and hepatosomatic index (HSI) in Atlantic wolffish during a full seasonal cycle (age 1+, 2+ and adult [A]) (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Table 2. Mean seasonal seawater temperature (SWT), colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point (MP), total estimated freezing point (FP), hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) plasma exposed to seasonal temperature treatment (ST) and photoperiod (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Table 3. Mean seawater temperature (SWT), colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point (MP), total estimated freezing point (FP), hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) plasma exposed to 10°C fixed temperature treatment (FT) and seasonal photoperiod (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Table 4. Mean maximum (February) plasmatic AFP concentrations (mg/ml) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data were calculated from data from Desjardins et al., in prep.).

Table 5. Spearman correlation coefficient values obtained from condition factor (K), hepatosomatic index (HSI) and length (L) against thermal hysteresis (TH) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult [A]) in December, January and February (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE PREMIER

Figure 1. Températures de surface et étendue des glaces (zones blanches) dans l'Atlantique canadien au mois de **a)** février et **b)** août 2003 (Département de Pêches et Océan Canada, région des Maritimes; Ocean Sciences Division web site Remote Sensing : http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/ocean/ias/seawifs/seawifs_3.html)

Figure 2. Périodes **a)** de prise et **b)** de débâcle des glaces dans l'Atlantique canadien (Atlas du Canada; <http://atlas.gc.ca/site/francais/maps/environment/seaice>)

Figure 3. Morphologie cristalline produite par l'adsorption de PAG à la surface d'un cristal; a) forme bipyramidale hexagonale (détail: PAG adsorbées [en rouge] et fronts de croissance courbés résultants [en bleu]); b) axes de croissance principaux d'un cristal (tiré de Jia et Davies, 2002; avec permission)

Figure 4. Osmomètre nanolitre : **a)** dispositif complet, **b)** unité de congélation, **c)** plaque d'aluminium percée de 12 nano-puits

CHAPITRE 2

Figure 1. Ice crystals grown in presence of a) high, b) low and c) trace AFP concentrations in Atlantic wolffish plasma; d) crystal in absence of AFP; e) ice crystal grown in spotted wolffish plasma.

Figure 2. Mean seasonal profiles of plasmatic freezing point (FP) depression related to thermal hysteresis (TH) and colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point (MP) in Atlantic wolffish at ST a) and FT c); in spotted wolffish in ST b) and FT d) against experimental seawater temperature (SWT) (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature).

Figure 3. Principal Factor Analysis testing the correlation between plasmatic variables (thermal hysteresis [TH] and colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point [MP]) and seawater temperature (SWT), condition factor (K) and growth rate (GR) in Atlantic wolffish at ST (ST: seasonal temperature); factor 1 and 2 accounts for 46.5 and 25.1 % of the variance, respectively.

Figure 4. Relation between mean plasmatic thermal hysteresis and seawater temperature in Atlantic wolffish at ST (ST : seasonal T°) from July to February.

Figure 5. Mean seasonal profiles of plasmatic sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) concentrations in Atlantic wolffish at ST a) and FT c) and in spotted wolffish in ST b) and FT d) against experimental seawater (SW) temperature (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature).

CHAPITRE 3

Figure 1. Specimen location; egg masses were harvested in shallow waters of Conception Bay (Newfoundland) and adult specimens used in our previous study (Desjardins et al., in prep) were caught on the Beaugé Bank (North Shore of St. Lawrence Gulf, Québec).

Figure 2. Mean seasonal profiles of plasmatic thermal hysteresis (TH) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) at ST a) and FT b) against mean experimental seawater (SW) temperature (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature).

Figure 3. Principal Factor Analysis testing the correlation among plasmatic variables (thermal hysteresis [TH] and colligative contribution of osmolyte expressed as the melting point [MP]), seawater temperature (SWT), liver weight (LW) and hepatosomatic index (HSI) in 2+ Atlantic wolffish at a) ST (ST: seasonal temperature) and b) FT (FT: 10°C fixed temperature).

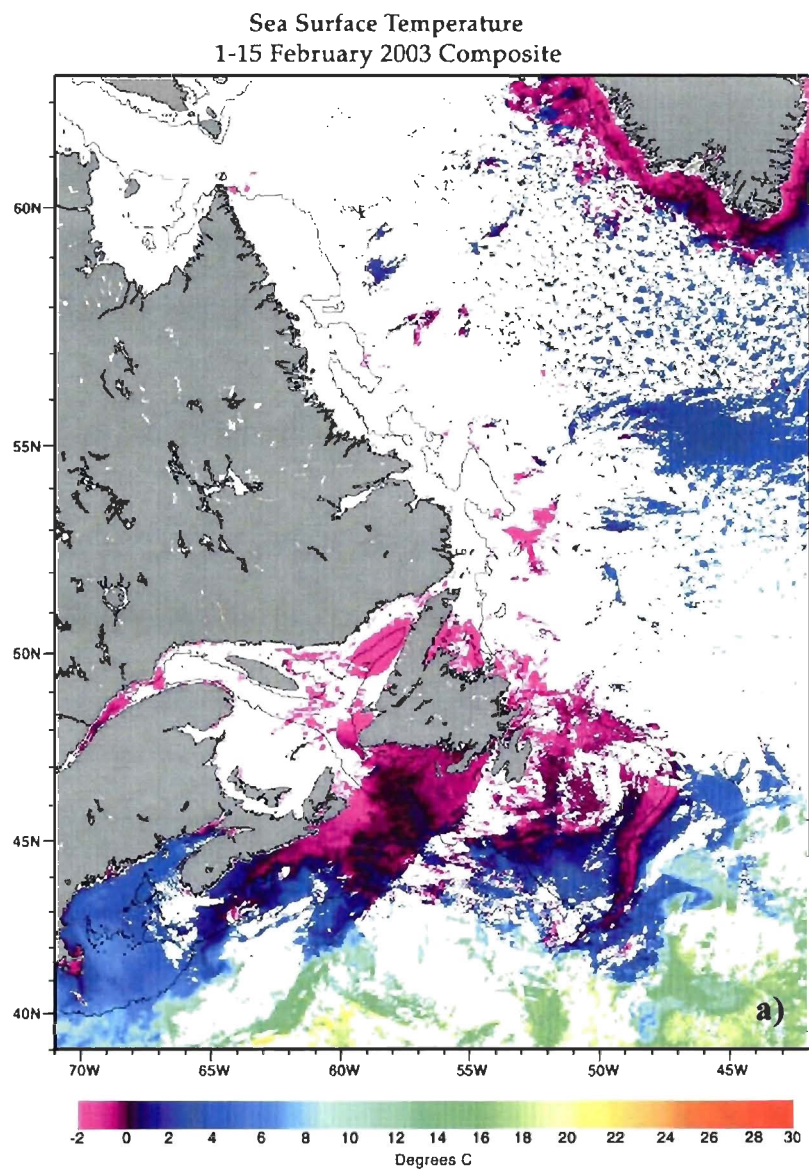
CHAPITRE PREMIER

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1.1 Problématique

Face à l'effondrement drastique des stocks canadiens et mondiaux de poissons marins résultant de la surpêche (Francis *et coll.*, 1978; Brêthes, 1995; New, 1997; Watson et Pauly, 2001; Choi *et coll.*, 2004) et à la demande sans cesse croissante en produits de la mer (Schwarz *et coll.*, 2002), l'aquaculture en eau salée (mariculture) est une industrie promise à un bel avenir (New, 1997; De Silva, 2000). Désormais qualifiée de « Révolution bleue », sa vague déferle sur le monde entier. L'engouement qu'elle suscite n'épargne pas les pays des zones tempérées à subarctiques. Au Canada, des efforts sont présentement consacrés à l'évaluation du potentiel maricole des côtes de l'Est québécois, lesquelles regorgent de sites favorables pour cette activité économique (Le François *et coll.*, 2002). Cependant, un obstacle majeur freine le développement de cette activité dans le St-Laurent (et la majorité de la zone Est canadienne): la basse température relative des eaux de surface et surtout, la présence d'un couvert de glace hivernal prolongé (Symonds, 1986; El-Sabh et Silverberg, 1990; Drinkwater *et coll.*, 1999; Fig. 1-2). Face à ces conditions défavorables, les espèces indigènes résidentes ont donc développé certaines adaptations, dont la plus efficace est la synthèse de protéines à propriété antigél. Toutefois, les espèces les plus lucratives actuellement en élevage commercial sont pour la plupart des salmonidés, espèces bénéficiant d'une

consommateurs, mais tolérant en revanche très mal le froid (mortalité en cas de contact avec des cristaux de glace dans une eau de température inférieure à $-0.9\text{ }^{\circ}\text{C}$; Fletcher *et coll.*, 1999). En milieu naturel, ces poissons anadromes hivernent dans des zones océaniques exemptes de glaces (Reddin et Shearer, 1987).



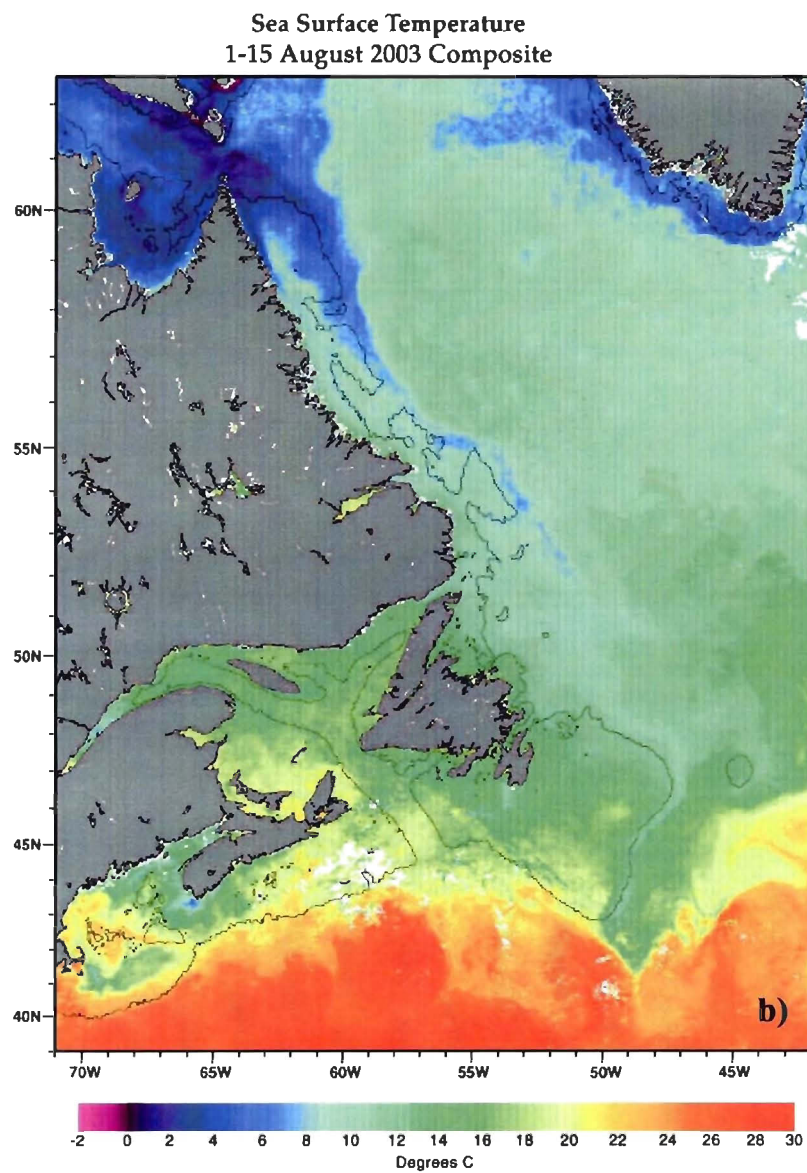


Figure 1. Étendue des glaces dans l'Atlantique canadien au mois de **a)** février et **b)** août 2003 (les zones en blanc représentent la glace) (Département de Pêches et Océan Canada, région des Maritimes; Ocean Sciences Division web site Remote Sensing : http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/ocean/ias/seawifs/seawifs_3.html)

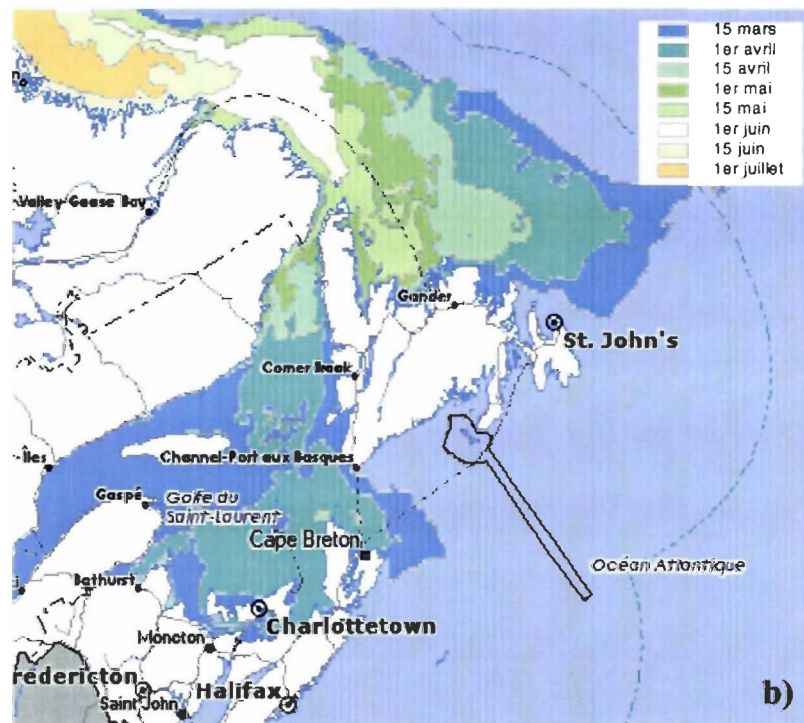
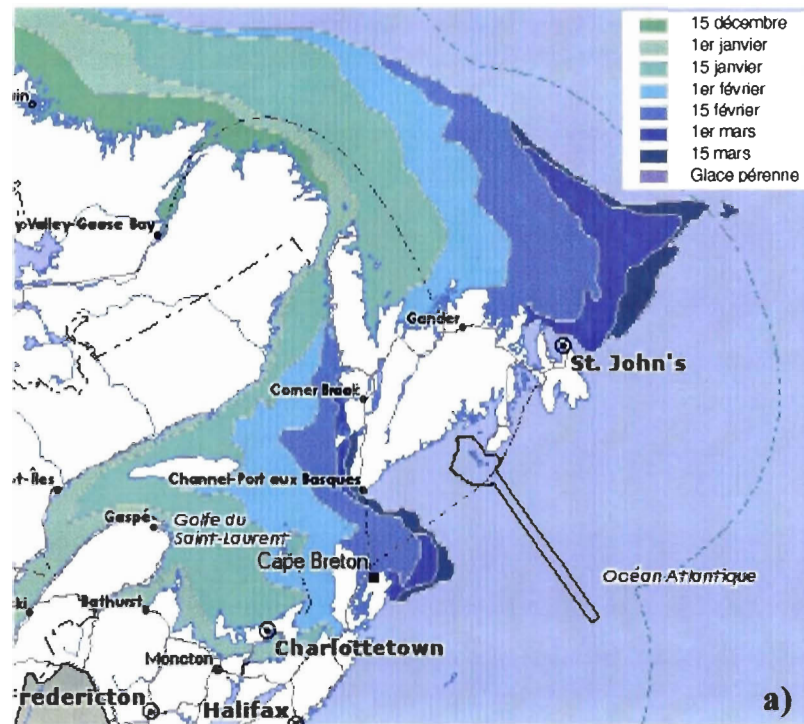


Figure 2. Périodes a) de prise et b) de débâcle des glaces dans l'Atlantique canadien (Atlas du Canada; <http://atlas.gc.ca/site/francais/maps/environnement/seaise>)

1.1.2 Aquaculture

1.1.2.1 Diversification des espèces en aquaculture

Dû à ces contraintes imposées par les conditions environnementales extrêmes et le choix restreint des espèces destinées à l'élevage, la pratique de la mariculture piscicole dans l'Atlantique canadien se limite jusqu'à présent à la Baie de Passamaquoddy (Sud du N.-B.) et à la Baie d'Espoir (Sud de T.-N.) (Fletcher *et coll.*, 1997a) ainsi qu'en Nouvelle-Écosse (Le François *et coll.*, 2002), les glaces touchant la majorité des zones plus au nord (Fig.1a). La plupart de ces élevages se consacrent au Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*). Étant donné son importance économique, certains groupes de chercheurs tentent de remédier au problème d'inadaptation au froid chez cette espèce par l'insertion, dans son bagage génétique, de gènes entiers ou de promoteurs provenant d'espèces capables de synthétiser des protéines antigel (Hew et Fletcher, 1997). Cependant, une autre voie possible (plus simple et acceptable au niveau éthique) consisterait à utiliser pour l'élevage des espèces indigènes, déjà adaptées aux conditions extrêmes rencontrées dans les eaux côtières de l'Est canadien.

En aquaculture, la tendance est présentement à la diversification (Alvial et Manríquez, 1999; Kutty, 2001; Quéméner *et coll.*, 2002 ; Lee, 2003), un éventail plus riche d'espèces permettant de mieux approvisionner les marchés et de s'adapter aux ressources et conditions naturelles propres à chaque localité. Une étude québécoise a récemment procédé à l'évaluation du potentiel maricole de 47 espèces indigènes, visées ou non par la pêche commerciale (Le François *et coll.*, 2002). Les résultats ont permis de désigner deux espèces de loups de mer, le Loup tacheté (*Anarhichas minor*) et le

Loup atlantique (*Anarhichas lupus*), comme démontrant les meilleurs potentiels à l'élevage dans les eaux du Québec, tant au niveau biologique que technique. Ces poissons, encore peu connus du grand public, ont également été identifiés comme candidats de haut intérêt par le reste du Canada atlantique (Brown *et coll.*, 1995), ainsi que par l'Europe du Nord (Tilseth, 1990), plus précisément la Norvège (Falk-Petersen *et coll.*, 1999), la Russie (Pavlov et Novikov, 1986) et l'Islande (Le François *et coll.*, 2002).

1.1.2.2 Le Loup de mer, un choix intéressant

Le Loup de mer représente un choix intéressant pour plusieurs raisons. Sa popularité grandissante est d'abord justifiée par son taux de croissance élevé en eaux froides (Moksness, 1994; Falk-Petersen *et coll.*, 1999). Leurs préférences thermiques se situent à basses températures (L. atlantique : -0.4 à 6.0°C et L. tacheté : -1.3 à 5.0°C; Barsukov, 1959 ; O'Dea et Haedrich, 2002). De plus, la production de protéines antigèle (PAG) chez cette espèce (Scott *et coll.*, 1988a; Shears *et coll.*, 1993; Enevoldsen *et coll.*, 2003) pourrait rendre possible son élevage en cage marines à l'année, advenant la synthèse de concentrations plasmatiques suffisantes (Le François *et coll.*, 2004a). Autres qualités : le Loup de mer résiste bien aux maladies (Espelid, 2002), aux stress divers et aux fortes densités d'élevages (Moksness et Pavlov, 1996; Jonassen, 2002). Les élévations de concentrations en ammoniacque (Foss *et coll.*, 2003a) et en dioxyde de carbone (Foss *et coll.*, 2003b), les faibles teneurs en oxygène dissout (Foss *et coll.*, 2002) ainsi que les fluctuations de salinité (Foss *et coll.*, 2001; Le François *et coll.*, 2004b) affectent également peu les performances de ce poisson robuste comparativement à d'autres espèces d'intérêt maricole. En station terrestre, leur nature

benthique permet de minimiser les volumes d'eau (et les coûts) nécessaires à leur bien-être (Øiestad, 1999), alors que des espèces pélagiques comme les salmonidés ou la morue (*Gadus morhua*) nécessitent des volumes d'eau importants. De plus et contrairement à la plupart des poissons marins, cette espèce démontre une ontogénie précoce : à l'éclosion, les larves ont l'aspect de juvéniles et exhibent un sac vitellin presque déjà complètement résorbé (Pavlov et Moksness, 1994), ce qui les rend prêtes à se nourrir de moulée commerciale dès l'éclosion, évitant ainsi le recours prolongé aux proies vivantes (Brown *et coll.*, 1997; Halfyard *et coll.*, 1998; Falk-Petersen et Hansen, 2001), indispensable au développement larvaire chez d'autres espèces. Autre avantage : le Loup de mer est un poisson de nature sédentaire et démontrant un très bas taux d'agressivité intraspécifique en captivité (Moksness & Pavlov, 1996), facteurs qui devraient promouvoir une plus grande efficacité de croissance par des dépenses énergétiques réduites (McCarthy *et coll.*, 1999). Enfin, le rendement en filet représente de 45 à 50% du poids total (Moksness, 1994), ce qui est considérable.

Autre point en faveur du développement de l'élevage du Loup de mer : aucune des deux espèces sélectionnées ne fait l'objet d'une pêche commerciale ciblée (Scott et Scott, 1988), ce poisson ne se tenant pas en bancs et échappant aux engins de pêche traditionnels en raison de son occupation soutenue d'anfractuosités rocheuses (Moksness et Pavlov, 1996). Les ventes occasionnelles en poissonnerie découlent donc essentiellement de prises accidentelles (Scott et Scott, 1988). Au niveau mondial, la pêche commerciale du Loup de mer est principalement menée par les Islandais et est susceptible d'être déficiente sur une base annuelle (Le François *et coll.*, 2004a). De plus, le Loup tacheté est maintenant classée espèce menacée et le Loup Atlantique,

espèce à statut préoccupant. L'installation d'un marché de niche, approvisionné par une production d'origine maricole stable à l'année, est donc favorisée et préférable à long terme. Le Loup de mer produit un filet de qualité, dépourvu d'arrêtes, à la texture ferme et au goût délicat apprécié en Europe (Richardsen et Johansen, 2002), mais dont la réputation est encore à faire en Amérique du Nord, où le produit ne bénéficie pas encore d'une visibilité importante. Le marché y semble toutefois favorable, mais aurait besoin d'être développé et stimulé (Johnson et Halfyard, 2002).

Jusqu'à présent, la Norvège est le seul producteur de Loup atlantique et tacheté d'élevage. Le Québec et Terre-Neuve (Canada), ainsi que l'Islande, s'impliquent actuellement dans des activités de R&D concernant ces espèces, en collaboration avec la Norvège. Si aucune entreprise d'élevage de poissons marins n'est encore en activité au Québec, des projets sont en développement (Gaspésie, Côte-Nord, Bas-St-Laurent).

1.1.2.3 La diversification de la production pour augmenter les profits

Dans le secteur de l'aquaculture, les profits sont traditionnellement déterminés par les coûts de production et le prix de vente du filet, lequel fluctue régulièrement tout en devenant sujet à de fortes baisses en cas de saturation du marché (Lee, 2003). La seule vente de la chair peut donc être insuffisante à l'atteinte d'une marge de profit intéressante et stable. Cet aspect est susceptible de décourager les entrepreneurs à se lancer dans ce secteur d'activité. Un moyen d'élever les bénéfices et de favoriser ainsi le développement maricole au Québec résiderait dans une diversification non pas seulement au niveau des espèces, mais également à l'échelle de la production elle-même, par la valorisation de la biomasse résiduelle d'élevage (Brown, 1998; Le

François *et coll.*, 2004a). Dans cette perspective, le Loup de mer attire encore l'attention : sa peau produit un cuir robuste et esthétique (Barsukov, 1959) pouvant être utilisé dans la confection d'articles divers (<http://www.oceanleather.com>), mais surtout, certaines biomolécules à valeur marchande élevée ont de nombreuses applications actuelles et éventuelles dans divers domaines impliquant les biotechnologies. Dans cet esprit, une étude d'envergure a été amorcée à l'UQAR (Drs Blier et Le François) en vue d'évaluer le potentiel du Loup de mer comme source d'extraction de trois classes de biomolécules très en demande sur le marché : les enzymes digestives (transformation des aliments; Haard, 1992, 1998), les polypeptides antimicrobiens de la peau et du mucus (développement d'antibiotiques en médecine; Ganz et Lehrer, 1999; Hancock, 2000), ainsi que les protéines antigél du sang (diverses applications; Le François *et coll.*, 2004a). Les résultats compilés dans ce mémoire constituent le premier volet de cette étude d'évaluation de potentiel, lequel se consacre à la caractérisation du profil de synthèse des protéines antigél chez le Loup atlantique et le Loup tacheté.

1.1.3 Protéines antigél : aspects théoriques

1.1.3.1 Stratégies d'adaptations face au froid

Les régions tempérées subissent des fluctuations de température saisonnières très prononcées. Particulièrement sous nos latitudes, les zones marines côtières sont sujettes à un couvert de glace hivernal plus ou moins prolongé (Symonds, 1986; El-Sabh et Silverberg, 1990; Drinkwater *et coll.*, 1999; Fig. 1-2). À partir du moment où le gel est initié à l'interface air-eau, les courants et le brassage de la colonne d'eau peuvent entraîner des cristaux de glace en suspension jusqu'à une certaine profondeur suivant

les conditions météorologiques locales (Reimnitz *et coll.*, 1992). Par exemple, des simulations sur modèles informatiques ont permis d'estimer que des cristaux pouvaient pénétrer jusqu'à des profondeurs de 25 m sous des vents de 10m/s (36 km/h) (Svensson et Omstedt, 1998). Cette zone de profondeur variable, chargée de particules de glace en suspension, représente un réel danger pour les organismes marins ne bénéficiant d'aucune défense physiologique contre le gel. De plus, dans le cas où ces cristaux atteignent le fond, leur agrégation subséquente formera une croûte de glace benthique appelée « anchor ice » (Eastman, 1993). Les poissons fréquentant les eaux côtières peu profondes sont donc exposés à une menace de gel permanente durant l'hiver, même suivant l'installation d'un couvert de glace stable réduisant l'hydrodynamisme induit par le vent et la pénétration conséquente de cristaux de glace en suspension.

La raison de cette vulnérabilité des poissons marins au gel est liée à leur osmolalité, environ 3 fois inférieure à l'eau de mer. Cette situation serait reliée à leur histoire évolutive (écosystème d'origine: milieu dulcicole) (Fyhn *et coll.*, 1999). Généralement, le point de congélation de leurs fluides physiologiques oscille autour de $-0,7^{\circ}\text{C}$ (Holmes et Donaldson, 1969) selon leur concentration osmotique, laquelle varie suivant les espèces et les facteurs environnementaux. L'eau de mer à pleine salinité gélant à environ $-1,9^{\circ}\text{C}$ (DeVries, 1988), il existe un écart d'un peu plus de 1°C entre le point de congélation des liquides physiologiques des poissons et celui de leur milieu environnant. Bien qu'il ait été démontré que la peau puisse contribuer à abaisser le point de congélation total d'un poisson d'environ 1°C (études *in vitro* de Valerio *et coll.*, 1992), cette protection est nettement insuffisante dans un milieu hautement à risque. En effet, des études antérieures (effectuées *in vivo*) avaient démontré que le

point de congélation de poissons marins et anadromes entiers n'était abaissé que de 0.05 à 0.2°C par rapport à leur point de congélation plasmatique (Fletcher *et coll.*, 1986, 1988), ce qui laisse présager que la peau ne constitue pas le premier site de propagation du gel dans l'organisme. Les sites potentiels incluraient les épidermes simples des branchies et du tractus digestif, ainsi que les plaies ouvertes.

Dans la mesure où il y a absence d'agents nucléateurs (cristaux de glace) dans son voisinage, un poisson peut survivre sans aucune protection sous son point de congélation physiologique, sans complications apparentes. Il est alors en état de surfusion (Scholander *et coll.*, 1957). Toutefois, advenant le contact avec un cristal de glace dans de telles circonstances, le gel s'initie rapidement et se propage à tout l'organisme, causant la mort. Afin d'éviter ce risque, différentes stratégies ont été développées chez les téléostéens fréquentant des eaux susceptibles de geler. Certaines espèces migrent dans des eaux plus chaudes (DeVries, 1983) ou vers le grand large où les glaces ne se forment pas (Reddin and Shearer, 1987) ou encore, se tiendront dans des eaux plus profondes, en état de surfusion (Scholander *et coll.*, 1957; Goddard et Fletcher, 2002) ou en dormance dans des abris sûrs (Valerio *et coll.*, 1990). D'autres par contre, affrontent ces conditions adverses (Goddard et Fletcher, 2002). Pour y parvenir, ces espèces tolérantes abaissent le point de congélation de leurs fluides physiologiques le plus près possible de celui de l'eau de mer, par accumulation de divers osmolytes plasmatiques (O'Grady et DeVries, 1982; Raymond, 1992; Raymond et DeVries, 1998), dont les protéines antigel (DeVries et Wohlschlag, 1969).

1.1.3.2 Abaissement colligatif du point de congélation

Le point de congélation/fusion d'une solution est abaissé par rapport à celui d'un solvant pur. Cet abaissement est directement proportionnel à la concentration de soluté dissout. La loi de la cryoscopie relie ces deux paramètres de la façon suivante:

$$\Delta T_f = \frac{K_f \cdot b}{1000} = \frac{(1.86^\circ\text{C} \cdot \text{kg} \cdot \text{mOsm}^{-1}) \cdot (x \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1})}{1000} \quad \text{où}$$

ΔT_f = Abaissement cryoscopique du point de congélation d'une solution

K_f = Constante cryoscopique de l'eau

b = Molalité (mOsm/kg) ou molarité (mOsm/L) de la solution

En connaissant le K_f d'un solvant (en l'occurrence l'eau), on peut déterminer le point de congélation d'une solution par le biais de sa concentration en solutés, ou l'inverse.

L'ajout d'un soluté quelconque dans un solvant augmente son entropie, en rendant plus difficile l'arrangement ordonné des molécules d'eau entre elles. Ce désordre perturbe les propriétés physiques du solvant (dont le point de congélation). En cas de gel, la formation de cristaux, structures encore plus strictement ordonnées, sera donc d'autant plus difficile. Pour compenser cette hausse d'entropie induite par l'augmentation de la concentration de soluté, il suffit de réduire l'influence d'une autre source de désordre – par exemple la température – afin de permettre aux molécules d'eau de s'organiser plus facilement en réseau cristallin, grâce à l'abaissement de leur énergie cinétique. Le point de congélation/fusion est donc une propriété colligative

d'une solution. Ce terme englobe les propriétés physiques d'un solvant qui varient selon la quantité (et non la nature chimique) des particules qui y sont dissoutes.

Chez les téléostéens marins des zones tempérées à polaires, on assiste généralement à une augmentation des concentrations plasmatiques d'osmolytes, principalement des électrolytes Na^+ et Cl^- , majoritairement responsables de l'abaissement colligatif du point de congélation chez plusieurs espèces (Fletcher, 1977). Cette réponse se produit conséquemment à une chute de température de l'eau (O'Grady et DeVries, 1982; Burton, 1986; Raymond, 1992). Dans le cas des électrolytes, le phénomène s'expliquerait de la manière suivante : les basses températures, en ralentissant le rythme des mécanismes actifs dépendant de la température (par exemple, l'enzyme Na^+K^+ -ATPase régulant l'osmolarité cellulaire) par rapport aux mécanismes passifs (indépendants de la température), causeraient un déséquilibre au niveau des échanges ioniques (Hochachka, 1986; Zachariassen, 1991). Pour empêcher l'accumulation excessive de solutés, le poisson compenserait donc partiellement par l'augmentation de l'activité de la Na^+K^+ -ATPase (Hochachka, 1988; Staurnes *et coll.*, 1994). Ainsi, les poissons de l'Antarctique, exposés à des conditions glaciales sur une base annuelle, ont dû s'adapter à tolérer une plus haute osmolarité que les espèces des milieux tempérés (Duman et DeVries, 1975), afin de réduire les coûts métaboliques dûs à un tel mécanisme de compensation. Néanmoins, l'élévation des concentrations ioniques ne peut dépasser un certain seuil sans nuire aux fonctions cellulaires vitales. Par conséquent, le niveau de protection atteint par ce processus est nettement insuffisant dans une eau glacée à pleine salinité. Par exemple, chez la Plie rouge (*Pleuronectes americanus*), un poisson évoluant dans des eaux glaciales sur une base saisonnière, cette

réponse colligative ne permet d'abaisser le point de congélation que de 0.12°C par rapport à la valeur estivale (Fletcher, 1977).

Afin d'augmenter le niveau de protection, des solutés organiques peuvent également être accumulés en plus ou moins grandes concentrations. Parmi eux, certains acides aminés, l'urée, l'oxyde de triméthylamine (OTMA) et le glycérol (Raymond, 1992; Raymond et DeVries, 1998). Ce dernier peut abaisser de 0,75°C le point de congélation chez l'Éperlan arc-en-ciel (*Osmerus mordax*), sans effet cytotoxique à des concentrations atteignant 400 mM (Raymond, 1992). Toutefois, cette protection demeure toujours insuffisante dans les milieux les plus glacials. En 1962, Gordon *et coll.* attribuèrent la capacité des poissons marins à tolérer des températures inférieures à leur point de congélation colligatif à la présence de composés à propriété antigél dans le sang. Il faudra attendre jusqu'à l'aube des années 70 avant que DeVries et Wohlschlag (1969) n'identifient ces molécules comme étant des protéines.

1.1.3.3 Mécanisme particulier des protéines antigél

L'éperlan-Arc-en-ciel, à l'instar de certaines autres espèces, produit donc un dernier composé : les protéines à propriétés antigél (communément appelées protéines antigél [PAG]) qui augmenteront sa protection antigél de 0.45°C supplémentaires, ce qui amène le point de congélation total à -2,30°C (Raymond, 1992). Chez d'autres espèces, cette contribution peut-être beaucoup plus importante. Seules ou associées aux autres osmolytes, ces protéines abaisseront le point de congélation des fluides physiologiques à un niveau sécuritaire pour l'espèce productrice, étroitement ajusté à la température du milieu fréquenté. Leur efficacité est surprenante: à elles seules, les PAG

peuvent abaisser de 200 à 300 fois le point de congélation du plasma par rapport à n'importe quel autre soluté à concentrations molaires équivalentes (DeVries, 1971), ce qui évite tout stress physiologique lié à une accumulation excessive de solutés. Elles seront ainsi responsables de 80% de la diminution du point de congélation chez la Plie rouge (Fletcher, 1977). Lorsque le nombre de moles d'un composé en solution n'explique plus à lui seul la magnitude de l'effet observé sur une propriété normalement colligative, on parle alors d'action non colligative.

Dans une solution dépourvue de PAG, les points de fusion et de congélation se situent à la même température et représentent un point d'équilibre. Toutefois, lorsque des PAG se retrouvent en solution, le point de congélation s'abaisse par rapport au point de fusion, lequel n'est pratiquement pas affecté en comparaison avec celui d'une solution exempte de PAG (ne répond qu'aux lois colligatives). L'écart résultant, appelé hystérèse thermique et exprimé en °C, est directement proportionnel à la concentration de PAG en solution et réfère à leur activité antigél (Kao *et coll.*, 1986). L'hystérèse thermique (HT) ou « activité antigél » représente donc la contribution des PAG à l'abaissement du point de congélation d'une solution.

Selon l'hypothèse la plus largement acceptée par la communauté scientifique (théorie de l'adsorption/inhibition, présentée par Raymond et DeVries en 1977) et de plus en plus vérifiée (Knight *et coll.*, 1991; Grandum *et coll.*, 1999), les PAG limitent la croissance des cristaux de glace par adsorption spécifique et irréversible (Knight et DeVries, 1994; Fig. 3) à certains plans cristallins préférentiels (Brown et Sönnichsen, 2002). La fixation de nouvelles molécules d'eau est restreinte aux espaces laissés entre les PAG adsorbées, ce qui amène des irrégularités au niveau des fronts de croissance

cristallins, lesquels se courbent en ces endroits. Cette courbure s'accroît jusqu'à un point où la liaison ordonnée des molécules d'eau entre elles devient trop difficile (Fig. 3, a), l'augmentation résultante de l'entropie freinant la croissance du cristal (effet Kelvin; Wen et Laursen, 1992; Wilson, 1993; Grandum *et coll.*, 1999). Une baisse de la température de la solution sera alors nécessaire à la réduction de l'entropie. La magnitude de cette dépression du point de congélation suivra la concentration de PAG en solution : plus cette concentration sera élevée, plus les espaces entre les PAG adsorbés seront restreints, plus la courbure critique des fronts de croissance se formant entre elles sera atteinte rapidement à une température donnée (DeVries, 1988) et plus la température de la solution devra être abaissée afin de dépasser la limite d'efficacité des PAG. À l'atteinte de cette température critique d'efficacité, les fronts de croissance englobent les PAG adsorbés et le cristal se développe rapidement selon l'axe de croissance c (Fig. 3 b), les PAG n'ayant peu ou pas d'affinité pour les plans basaux (Raymond *et coll.*, 1989). Le résultat est un cristal hexagonal caractéristique de forme bipyramidale plus ou moins effilé (Fig. 3, a), selon les concentrations de PAG en présence. En absence de PAG, un cristal croîtra principalement selon l'axe a (Raymond *et coll.*, 1989). Les cristaux de neige illustrent bien ce type de patron de développement.

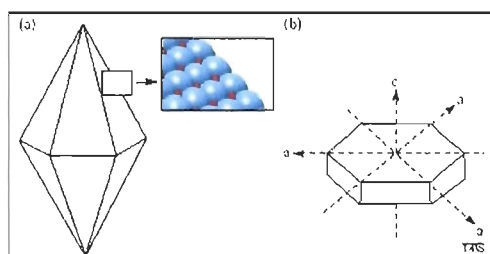


Figure 3. Morphologie cristalline produite par l'adsorption de PAG à la surface d'un cristal ; a) forme bipyramidale hexagonale (détail : PAG adsorbés [en rouge] et fronts de croissance courbés résultants [en bleu]); b) axes de croissance principaux d'un cristal (tiré de Jia et Davies, 2002).

Jusqu'à maintenant, cinq types de protéines antigel, différant selon leurs structures moléculaires (Brown et Sönnichsen, 2002) et leurs origines évolutives (Cheng et DeVries, 2002), ont été répertoriés chez les téléostéens marins, soit les types I à IV ainsi que les glycoprotéines antigel. Néanmoins, malgré ces divergences structurales et évolutives, ainsi que l'existence de préférences diverses pour les différentes surfaces cristallines, toutes ces protéines ont un mode d'action commun (Brown et Sönnichsen, 2002) et diffèrent peu quand à l'intensité de leur activité respective, lorsque comparée sur une base massique (Wöhrmann, 1997). Toutefois, des différences s'observent à l'échelle molaire, les plus grosses molécules démontrant la plus grande activité (Schrag *et coll.*, 1982; Kao *et coll.*, 1986; Baardsnes *et coll.*, 2003), vraisemblablement grâce à leur plus grande surface de contact avec la glace.

Un poisson ne sera pas menacé de geler tant que la température de son milieu se situera au-dessus de celle de son point de congélation, qu'il entre ou non en contact avec des cristaux de glace. Par exemple, certaines espèces (comme la Morue franche) n'arrivent à abaisser leur point de congélation qu'entre -1.2 et -1.6°C (Goddard et Fletcher, 1994) sans geler pour autant, car les eaux plus profondes qu'elles fréquentent durant l'hiver affichent une température généralement supérieure (Scott et Scott, 1988) à leur point de congélation. Les espèces capables de synthétiser des PAG arrivent donc à abaisser leur point de congélation près ou au-dessous de celui de l'eau de mer environnante.

1.1.3.4 Facteurs contrôlant la synthèse des protéines antigel

Les protéines antigel sont principalement synthétisées par le foie pour ensuite être exportées à l'organisme entier par la circulation sanguine (Fletcher *et coll.*, 2001). Elles sont également produites localement par d'autres tissus, dont la peau (Gong *et coll.*, 1992,1996; Low *et coll.*, 2001, 2002; Evans et Fletcher, 2004). Cette synthèse est régie par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques. L'importance respective de ces facteurs, la cascade d'événements physiologiques qu'ils provoquent ainsi que l'expression des patrons de synthèse saisonniers qui en résulte ont été étudiés chez un nombre limité d'espèces (Goddard et Fletcher, 2002).

Le cas le mieux documenté est celui de la Plie rouge (*Pleuronectes americanus*) (pour une revue, voir Miao *et coll.*, 2002 ainsi que Low *et coll.*, 2002). Chez cette espèce côtière, le profil de synthèse des PAG semblait de prime abord lié aux fluctuations de température, qu'il épouse étroitement. Cependant, le facteur environnemental responsable de l'initiation/terminaison de la production chez cette espèce fut ensuite précisément cerné: la photopériode (Fletcher, 1981; Fourney *et coll.*, 1984; Price *et coll.*, 1986). Chez la Plie rouge, l'hormone de croissance agit comme inhibiteur de la synthèse de PAG durant la période estivale. Avec l'arrivée de l'hiver, la diminution de la période d'éclairement solaire amène l'inhibition de la sécrétion de l'hormone de croissance, provoquant ainsi l'initiation de la synthèse des PAG (Fletcher *et coll.*, 1989). Chez cette espèce, la température aurait vraisemblablement un rôle de second plan, au niveau de l'élimination/dénaturation de la protéine et de son ARN messager, puisqu'une faible température demeure nécessaire à l'accumulation de concentrations suffisantes de PAG (Fletcher, 1981; Vaisius *et coll.*, 1989). Cependant,

chez la Morue franche et un proche parent du Loup de mer, la Loquette d'Amérique (*Macrozoarces americanus*), le température de l'eau semble être le stimulus dominant (Fletcher *et coll.*, 1985; Fletcher *et coll.*, 1987).

En somme, la photopériode et la température apparaissent comme étant les principaux facteurs environnementaux (abiotiques) affectant la synthèse de PAG. La profondeur de distribution des espèces (Wöhrmann, 1997; Goddard et Fletcher, 2002) et la latitude sont également susceptibles d'influencer le taux de production (Fletcher *et coll.*, 1985 ; Fletcher *et coll.*, 1998; Goddard *et coll.*, 1999; Goddard et Fletcher, 2002). Certains facteurs biotiques (liés entre eux et avec les facteurs abiotiques), tels que l'espèce, le nombre de copies de gènes des PAG (Hew *et coll.*, 1988; Scott *et coll.*, 1988b; Hayes *et coll.*, 1991), l'écologie, le niveau d'activité et les changements d'habitats durant le cycle de vie (Wöhrmann, 1997) ainsi que l'âge (Goddard *et coll.*, 1992; Goddard et Fletcher, 1994) ont également un impact.

En plus de différences au niveau de l'intensité de la synthèse, des divergences s'observent aussi au niveau de la durée de cette production, lorsque suivie sur une base annuelle. Chez certaines espèces, comme la Morue franche et la Plie rouge, la synthèse de protéines antigels se produit en saison froide seulement (Fletcher, 1981; Hew *et coll.*, 1981), alors que chez d'autres, comme la Loquette d'Amérique (*Macrozoarces americanus*), la synthèse s'effectue toute l'année, avec des concentrations maximales atteintes en hiver (Fletcher *et coll.*, 1985). Enfin, alors que des variations saisonnières sont observables chez les espèces vivant en eaux tempérées, les espèces des zones polaires (ex. : *Notothenoidea* de l'Antarctique) maintiennent pour la plupart de hauts

taux de PAG plasmatiques à l'année (Wöhrmann, 1997), dans ces eaux où la menace de gel est omniprésente (DeVries, 1983).

Chez le Loup de mer, le patron annuel de synthèse de PAG n'a jamais fait l'objet d'études. Il a été démontré que les membres du sous-ordre des *Zoarcoidei*, dont la Loquette d'Amérique, la Lycode Antarctique (*Lycodichthys dearborni*) et le Loup atlantique, produisent une PAG de type III (Li *et coll.*, 1985; Shears *et coll.*, 1993; Wang *et coll.*, 1995). Au cours d'une évaluation de la production de PAG estivale chez certaines espèces nordiques, Enevoldsen *et coll.* (2003) ont constaté l'existence d'une faible hystérèse thermique chez cette dernière espèce (ainsi que chez le Loup tacheté), ce qui laisse présager d'une capacité de synthèse annuelle, à l'instar de ce qui s'observe chez la Loquette d'Amérique (Fletcher *et coll.*, 1985).

1.1.4 Protéines antigél : aspects pratiques

1.1.4.1 Propriétés et applications des protéines antigél

En plus de leur capacité à entraver la croissance des cristaux de glace, les PAG possèdent d'autres propriétés intéressantes, trouvant de multiples applications dans le secteur des biotechnologies. Par exemple, elles ont la propriété d'inhiber la recristallisation de la glace, phénomène impliquant la redistribution de l'eau à partir de petits cristaux vers d'autres plus gros, suite à une élévation de la température au-dessus de leur point de fusion (Knight *et coll.*, 1984; Knight *et coll.*, 1995). La recristallisation peut survenir dans les produits surgelés (exemple : la crème glacée) conservés dans des congélateurs industriels, conséquemment aux opérations de dégivrage automatique.

L'incorporation de PAG dans certains produits congelés (afin d'y empêcher la formation de gros cristaux indésirables) compte donc parmi les applications potentielles des PAG (Warren *et coll.*, 1992; Payne *et coll.*, 1994; Griffith et Ewart, 1995; Fletcher *et coll.*, 1997b). De plus, l'inhibition de la recristallisation ne requérant que de faibles quantités de PAG (Knight *et coll.*, 1984), les coûts d'incorporation au produit demeureraient modiques (Feeney et Yeh, 1998).

Une seconde propriété des PAG est la protection des cellules contre les dommages induits par le froid (revue dans Tomczak et Crowe, 2002). En étudiant des cellules mammaliennes soumises à des températures hypothermiques, Rubinsky *et coll.* (1990, 1991, 1992) ont d'abord émis l'hypothèse que cette fonction protectrice s'effectuait par le biais d'un blocage des canaux ioniques membranaires. Ils se fiaient pour cela à l'hypothèse de Hochachka (1986), selon laquelle les basses températures causeraient un déséquilibre dans les échanges ioniques par altération du rythme des mécanismes actifs par rapport à celui des mécanismes passifs. D'après Rubinsky *et coll.* (1992), le blocage des canaux ioniques empêcherait la sursaturation intracellulaire en électrolytes consécutive (et ainsi, la dépolarisation membranaire). Toutefois, une étude ultérieure (Hays *et coll.*, 1996) a par la suite démontré que les PAG permettaient également de stabiliser les membranes elles-mêmes, en interagissant directement avec la double couche phospholipidique (Tomczak *et coll.*, 2003). Lorsque exposées au froid, les membranes cellulaires subissent un changement de phase (état fluide vers état gel/solide) durant lequel la double couche devient instable et est susceptible de s'endommager aux endroits où les deux états se côtoient, la transition étant progressive et non-uniforme (Tomczak et Crowe, 2002). En interagissant directement avec les

membranes et/ou les protéines membranaires, les PAG préviendraient l'affaiblissement et la rupture des membranes cellulaires durant ce changement de phase à basse température. Dans ce cas également, seules de petites quantités sont nécessaires pour assurer cette fonction protectrice (Rubinsky *et coll.*, 1990; Itskovitz-Eldor *et coll.*, 1993). Une autre utilisation sérieusement envisagée pour ces biomolécules exploiterait donc cette caractéristique : la préservation de matériel vivant (cellules, gamètes, tissus et organes) dans des conditions hypothermiques (Rubinsky *et coll.*, 1990,1991; Lee *et coll.*, 1992; Arav *et coll.*, 1993; Tablin *et coll.*, 1996; Fletcher *et coll.*, 1999; Soltys *et coll.*, 2001; Amir *et coll.*, 2003, 2004). Dans les procédés testés jusqu'à présent, la température est abaissée sous zéro, mais pas au point d'amener le gel des tissus, lesquels se retrouvent en état de surfusion, protégés par les PAG. Le temps de conservation s'en trouve ainsi augmenté.

Enfin, une dernière caractéristique des PAG est leur capacité de modifier l'axe de croissance des cristaux de glace et donc, leur morphologie (Raymond et DeVries, 1977; Ananthanarayanan, 1989; Coger *et coll.*, 1994). Lorsque présentes en concentrations élevées et exposées à une température environnante dépassant leur limite d'efficacité, les PAG causent la formation de cristaux longs et effilés comme des aiguilles (Raymond et DeVries, 1977; Wilson *et coll.*, 2002). La croissance de cristaux de ce type est susceptible d'endommager les membranes des cellules en présence, causant leur mort. L'injection locale de PAG pourrait donc éventuellement optimiser l'efficacité de la cryochirurgie, une méthode de destruction par le gel de tumeurs localisées jusqu'à maintenant plus ou moins efficace (Koushafar et Rubinsky, 1997; Pham *et coll.*, 1999; Muldrew *et coll.*, 2001).

Récemment, des études ont démontré l'innocuité des PAG purifiées chez l'homme (Crevel *et coll.*, 2002), de même que chez des individus montrant une réaction allergique à un extrait complet du poisson source (Bindslev-Jensen *et coll.*, 2003). Les applications précédemment mentionnées, bien que toujours en phase expérimentale, deviennent dès lors tout à fait envisageables dans un avenir rapproché.

1.1.4.2 Sources des protéines antigel

On retrouve les PAG distribuées à travers presque tout le règne du vivant : bactéries (Kawahara, 2002), champignons (Hoshino *et coll.*, 2003), algues unicellulaires (Raymond *et coll.*, 1994), plantes supérieures (Griffith *et coll.*, 1992; Atici et Nalbantoğlu, 2003; Pudney *et coll.*, 2003), porifères (Wilkins *et coll.*, 2002), mollusques (Theede *et coll.*, 1976), insectes (Hew *et coll.*, 1983; Wu *et coll.*, 1991), arachnides (Duman *et coll.*, 2004) et poissons. Le plasma de certaines espèces marines d'eaux froides (dont le Loup atlantique) représente toujours la source principale de l'approvisionnement en PAG, ce qui s'explique par sa plus grande disponibilité (pêches commerciales) et le fait qu'il soit évidemment plus facile à prélever sur de plus gros organismes.

Ce plasma de poisson marin, susceptible de contenir des concentrations de PAG variant entre 1 et 30 g/L de plasma, peut valoir jusqu'à 200 dollars américains le litre. Une fois obtenues sous leur forme purifiée, les PAG en elles-mêmes seront vendues 5000 dollars américains le gramme (Dr Fletcher, A/F Protein Canada Inc., com. pers.). La demande pour cette ressource s'annonçant forte (prévision de A/F Protein Canada Inc., seule compagnie distributrice de ce produit), certains chercheurs expérimentent

présentement des moyens visant l'atteinte d'une production à grande échelle en faisant appel au génie génétique et plus précisément, à la technique de l'ADN recombinant. Cette méthode implique la création d'êtres génétiquement modifiés (OGM) produisant la protéine à son état naturel (Solomon et Appels, 1999; Li *et coll.*, 2001) ou sous une forme améliorée suite à l'application de mutations dirigées sur le gène implanté chez ces organismes transgéniques (Li *et coll.*, 1991; Mueller *et coll.*, 1991). Toutefois, la méfiance généralisée du grand public face aux OGM et à leurs produits dérivés, la limite imposée par la ressource naturelle elle-même (baisse drastique des stocks sauvages de poissons marins, débarquements saisonniers) ainsi que le temps de conservation restreint des PAG une fois purifiées (6 mois; A/F Protein Canada Inc.) pourraient mener au développement d'un marché de niche distribuant un produit obtenu de source naturelle, disponible à l'année, c'est-à-dire provenant de poisson d'élevage (en l'occurrence, le Loup de mer).

1.1.5 Objectifs et hypothèses de l'étude

L'émergence d'une industrie maricole alliée à un essor des biotechnologies marines pourrait profiter aux économies chancelantes caractérisant les régions de l'Est québécois. Cette étude, appliquée à l'évaluation du potentiel de la production de PAG dans un contexte de diversification de la production maricole, a pour but principal la caractérisation des profils de synthèse de PAG saisonniers chez les loups atlantique et tacheté. La mesure de l'hystérèse thermique et des concentrations de PAG permettra d'atteindre cet objectif. Une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques globaux impliqués dans la variation du point de congélation plasmatique saisonnier chez ces deux espèces (et chez les représentants du sous-ordre des *Zoarcoidei*) consistera en

l'objectif secondaire, à travers l'estimation du point de congélation total du plasma. Ce dernier sera obtenu suite à l'addition des contributions colligatives (osmolytes) et non colligative (PAG). Les aspects fondamentaux et appliqués découlant de chacun de ces objectifs seront discutés.

Tous les paramètres mesurés feront l'objet d'un suivi d'une durée d'un an et seront interprétés en fonction de la saison, de la température d'exposition (facteurs abiotiques), de l'espèce, de l'âge, de l'indice de condition, de la masse du foie (juvéniles seulement) et de l'indice hépatosomatique (juvéniles seulement) des individus (facteur biotique). Une attention particulière sera portée aux comparaisons interindividuelles des concentrations de PAG, l'existence de variations substantielles pouvant mener à l'optimisation de leur extraction par le biais d'un programme de sélection génétique impliquant les meilleurs producteurs.

Objectif 1 : Caractérisation du profil de synthèse annuel de PAG

À l'instar du Loup atlantique, la Loquette d'Amérique, autre membre du sous-ordre des *Zoarcoidei*, produit également des PAG de type III (Shears *et coll.*, 1993). Son cycle de production étant vraisemblablement dirigé par la température (Fletcher *et coll.*, 1985), il est possible qu'une même tendance s'observe chez les deux espèces de Loup de mer.

Hypothèse 1 : La synthèse des PAG est dirigée par la température.

Le loup tacheté fréquente de plus grandes profondeurs que le Loup Atlantique (jusqu'à 600 m; Albikovskaya, 1982), mais est tout de même retrouvé dans des zones

relativement peu profondes (minimum: 54 m; Barsukov, 1959) et préfère des eaux de températures oscillant entre -1 et 7°C (Barsukov, 1959). Dans ces conditions où la probabilité de contact avec des cristaux de glace en suspension ne peut être complètement éliminée, il serait avantageux pour cette espèce d'avoir conservé la capacité de synthétiser des PAG. Toutefois, puisqu'il a été démontré que l'intensité de la synthèse est de façon générale inversement proportionnelle à la profondeur de l'habitat chez plusieurs espèces (Wöhrmann, 1996, 1997; Goddard et Fletcher, 2002), cette synthèse sera sans doute inférieure en intensité à celle du Loup atlantique.

Hypothèse 2 : Le Loup atlantique et le Loup tacheté produisent des PAG.

Hypothèse 3 : La synthèse de PAG est supérieure chez le Loup atlantique.

Des concentrations plus fortes de PAG ont été détectées chez les juvéniles de Morue franche comparativement aux adultes, ces concentrations étant négativement liées à la taille des poissons (Goddard *et coll.*, 1992). Il est possible que les loups de mer juvéniles bénéficient également d'une meilleure protection que les adultes, des masses d'œufs ayant été retrouvées à de très faibles profondeurs (5-15 m; Keats *et coll.*, 1985).

Hypothèse 4 : Les juvéniles produisent de plus grandes concentrations de PAG que les adultes.

La plus grande variabilité interindividuelle au niveau de la synthèse de PAG plasmatique a été observée chez l'Hémitriptère atlantique (*Hemitripterus*

americanus; Fletcher *et coll.*, 1984). Cette hétérogénéité serait due à un relâchement de la pression sélective pour ce trait, étant donné que cette espèce fréquente des eaux où la température hivernale est plus clémente. Chez le Loup atlantique, susceptible d'être retrouvé dans des eaux côtières glaciales, la sélection naturelle a dû contribuer à maintenir cette réponse relativement homogène. Chez le Loup tacheté par-contre, une plus grande disparité au niveau de l'expression des PAG serait possible.

Hypothèse 5 : La variation interindividuelle dans la synthèse des PAG n'est pas élevée dans un milieu à risque.

Objectif 2 : Caractérisation de la réponse plasmatique globale

La variation des concentrations plasmatiques d'osmolytes organiques et inorganiques est dirigée par la température, comme c'est le cas chez de nombreux téléostéens (O'Grady et DeVries, 1982; Burton, 1986; Raymond, 1992; Raymond et DeVries, 1998). La superposition des réponses plasmatiques non colligative (hystérèse thermique causée par les PAG) et colligative (augmentation des concentrations d'osmolytes, en particulier des électrolytes Na^+ et Cl^-) devrait offrir un niveau de protection adéquat contre le gel.

Hypothèse 1 : La réponse plasmatique colligative est contrôlée par la température

Hypothèse 2 : La réponse plasmatique globale assure une protection optimale dans un milieu à risque.

1.2 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

1.2.1 Montage expérimental

Les individus adultes des deux espèces (loups atlantique et tachetés) utilisés dans cette étude provenaient du Banc Beaugé, en Basse-Côte-Nord (Québec) (voir Chapitre 3, Fig. 1). Les jeunes loups atlantique (âge 1+ et 2+ en début d'expérience) sont issus de masses d'œufs fertilisées récoltées par des plongeurs à Conception Bay (Terre-Neuve) (voir Chapitre 3, Fig. 1), puis incubées au Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière (CAMGR).

Le montage expérimental, réalisé en 2001 au CAMGR (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec), consistait en deux ensembles de bassins soumis à deux régimes de température différents sur une période de un an. Chaque ensemble comprenait deux bassins circulaires, occupés chacun par huit adultes de l'une des deux espèces (tous marqués pour suivi individuel) ainsi que de quatre bassins suédois contenant 100 loups atlantiques juvéniles d'âge 1+ et 2+ (chaque classe d'âge en répliqués). Le premier groupe (*Température fixe* – TF) a été isolé dans un environnement thermique stable tout au long de l'année (température : 10.0-12.0°C pour le Loup atlantique et 7.0-8.0°C pour le Loup tacheté, en raison du caractère plutôt sténotherme-froid de cette dernière espèce). Le second groupe (*Température saisonnière* – TS) a été exposé aux conditions environnementales ambiantes, à des températures variant entre -0.2 et 11.0°C (maximum atteint de 8.0°C chez les loups tachetés). Dans tous les cas, la photopériode appliquée suivait les variations saisonnières (8L/16D-14L/10D ; ajustements hebdomadaires). L'oxygénation est

demeurée relativement stable durant l'expérimentation (oxygène dissout : 80-100 %) et la salinité s'est maintenue entre 27-30 ‰.

1.2.2 Mesures et prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été effectués mensuellement sur 10 individus 1+ et 2+ ainsi que sur 8 adultes. Les poissons n'étaient pas nourris la veille. Suite à l'anesthésie (benzocaïne, 50 mg/L), chaque poisson était identifié, mesuré et pesé. Chez les juvéniles, le foie a été disséqué et pesé.

Le sang a été prélevé sur l'ensemble des spécimens par la veine caudale à l'aide de seringues de 3 cc (aiguille : 20 G, 1½'') pour les adultes et de seringues de 1 cc (aiguille : 20 G, 1'') pour les juvéniles. Celles-ci avaient préalablement été traitées avec un anticoagulant (héparine). Le sang prélevé (environ 2.5 ml/individu) a ensuite été transvidé dans des micro-tubes de 2.5 ml également traités à l'héparine lithium, puis déposé sur la glace. Le maintien d'une chaîne de froid est d'une importance capitale, les PAG de type III amorçant leur dénaturation à une température se situant au-dessus de zéro (Li *et coll.*, 1991).

Immédiatement suite au prélèvement, le sang a été centrifugé à 4000 g durant 10 min, à 4°C (Kao *et coll.*, 1986). Le plasma a ensuite été transféré dans de nouveaux micro-tubes (0.5 ml), puis congelé à -80°C.

1.2.3 Mesure des paramètres plasmatiques

1.2.3.1 Activité antigél plasmatique

L'importance de l'écart obtenu entre les points de congélation et de fusion (appelé hystérèse thermique et exprimé en °C) est directement proportionnelle à la concentration de PAG en solution et réfère à leur activité antigél (Kao *et coll.*, 1986). L'hystérèse thermique représente donc la contribution des PAG à l'abaissement du point de congélation d'une solution. Sa détermination passe par l'utilisation d'un osmomètre nanolitre à point de congélation (Clifton Technical Physics, Hartford, NY), selon la méthode de Kao *et coll.* (1986).

Le dispositif utilisé est représenté à la Figure 1. Un bloc de congélation, relié à une unité de contrôle de la température, est placé sous un microscope. Une petite plaque d'aluminium d'environ 1 cm², percée de minuscules puits, permet l'observation d'infimes volumes d'échantillon (nanolitres). Tout d'abord, l'échantillon est congelé à -40°C, puis dégelé graduellement jusqu'à l'obtention d'un cristal unique, à partir duquel sera évaluée l'activité antigél par variation de la température de l'échantillon. Le point de fusion correspond à la température à laquelle le cristal commence à diminuer de volume et le point de congélation, à celle à laquelle il se met à croître de façon continue et rapide (point de déséquilibre). Les lectures ont été menées sans temps d'attente pour des raisons pratiques (pour une revue sur les facteurs influant la mesure de l'hystérèse thermique, voir Fletcher *et coll.*, 2001). L'appareil exprimant les mesures en données d'osmolalité (mOsm/kg), les écarts d'osmolalités peuvent être convertis en écarts de

température (°C) pour obtenir l'hystérèse thermique, l'osmolalité et la température étant positivement corrélées (Loi de la cryoscopie, voir Introduction générale).

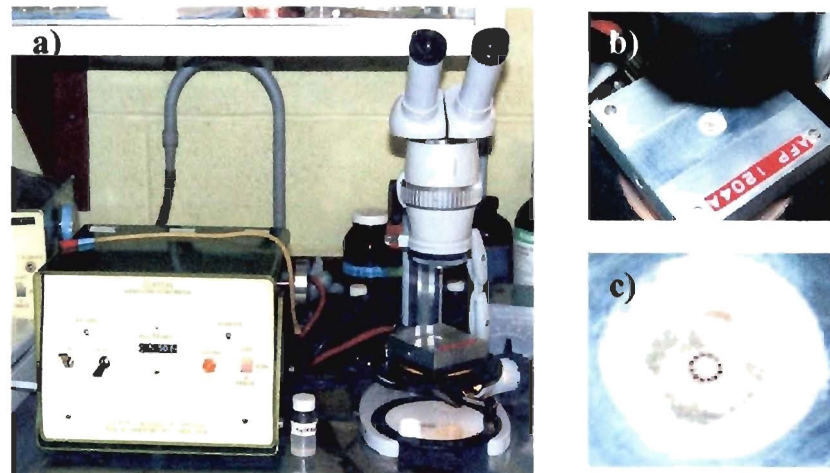


Figure 4. Osmomètre nanolitre : a) dispositif complet, b) unité de congélation, c) plaque d'aluminium percée de 12 nano-puits

En plus d'une hystérèse thermique mesurable pouvant conduire à la détermination de la concentration de PAG (évaluation quantitative), la présence de PAG elle-même peut être évaluée qualitativement (Ewart *et coll.*, 2000). Les cristaux croissant en présence de PAG prennent une configuration caractéristique (découlant du patron de fixation de ces biomolécules à la surface du cristal), dépendamment de la concentration de PAG en solution (voir Partie 2, Chapitre 1, Fig. 1). Une solution à très forte teneur en PAG sera caractérisée par la formation de cristaux s'allongeant en fins spicules hexagonaux, tandis que des solutions de plutôt faibles à très faibles (traces) concentrations montreront des configurations cristallines passant de bipyramides hexagonales à des prismes hexagonaux (Raymond et DeVries, 1977; Davis et Hew, 1990; Coger *et coll.*, 1994; Griffith et Ewart, 1995; Deng et Laursen, 1998; Wilson *et*

coll., 2002;). Les cristaux croissant en absence de PAG conserveront une allure de disque plat (Harrison *et coll.*, 1987). Cette évaluation visuelle est particulièrement utile dans les cas où le manque de précision de l'appareil ne permet pas une différenciation quantitative des échantillons de très faibles concentrations par rapport à ceux ne contenant pas de PAG (imprécision pour des concentrations $< 0.1^{\circ}\text{C}$; Griffith et Ewart, 1995). Les images des divers patrons cristallins rencontrés chez le Loup de mer ont été captées à l'aide d'une caméra digitale (4912-2010/0000, Alpha Innotech Corporation) fixée au microscope et reliée à un ordinateur.

1.2.3.2 Concentration des PAG plasmatiques

L'activité antigél de solutions à concentrations connues de PAG a également été déterminée à partir de l'osmomètre nanolitre en vue d'élaborer une courbe standard de l'activité antigél versus la concentration de PAG (voir Partie 2, chapitre 1, Fig. 2). Une solution tampon d'ammonium bicarbonate (0,1 M) additionnée de NaCl (180 mM; concentration physiologique chez le Loup de mer) a tenu lieu de solvant aux PAG lyophilisées (PAG de type III de Loquette d'Amérique, fournies par A/Fprotein Canada, T-N). Il a été récemment démontré qu'une teneur en sel du tampon semblable à celle rencontrée naturellement dans le plasma augmente l'efficacité des PAG et donc, leur activité (Evans, 2003). L'équation dérivée de la courbe standard obtenue a permis de déterminer les concentrations plasmatiques de PAG de chaque échantillon à partir de leurs activités antigél respectives (voir chapitre 2, section « methods »).

1.2.3.3 Points de fusion/congélation plasmatiques

Avec l'osmomètre nanolitre, les concentrations d'osmolytes plasmatiques correspondent au point de fusion du plasma et la contribution totale des phénomènes colligatifs (dus à la concentration des osmolytes) et non colligatifs (dus à l'activité spécifique des PAG), au point de congélation total. L'évaluation de l'implication colligative des osmolytes dans la baisse du point de congélation ainsi que le point de congélation total du plasma ont été obtenus en convertissant les données de concentration (mOsm) obtenues grâce à l'osmomètre nanolitre en unités de température (°C) grâce à la Loi de la cryoscopie (voir Introduction générale). La contribution des PAG consiste en la valeur d'hystérèse thermique (°C) préalablement déterminée.

1.2.3.4 Concentration des principaux osmolytes plasmatiques (Na⁺, Cl⁻)

La concentration (mM) plasmatique des ions sodium (Na⁺) et chlorure (Cl⁻) a été mesurée grâce à un analyseur d'ions (Ecolyte, Eschweiler, Allemagne). Le plasma était transféré à l'appareil à partir de capillaires de 100 mm.

1.2.4 Facteur de condition et indice hépatosomatique

Afin de connaître la condition des poissons expérimentaux, le facteur de condition (K) et l'indice hépatosomatique (IHS) ont été calculés selon les formules suivantes (Busacker *et coll.*, 1990):

$$\text{IHS} = (\text{poids foie} / \text{poids total poisson}) \times 100$$

$$\text{K} = (\text{poids total poisson} / \text{longueur}^3) \times 100$$

1.2.5 Analyses statistiques

Le faible effectif des échantillons et l'absence de normalité de leurs distributions excluait l'emploi de tests paramétriques. Chaque groupe expérimental avait été scindé en 2 réplicats. Un test de Mann-Whitney a été utilisé au préalable pour comparer les distributions des valeurs des différentes variables à l'étude, afin de s'assurer que ces réplicats, avant d'être « poolés » et considérés comme un groupe homogène, n'étaient pas significativement différents. Le seuil de signification était fixé à $p \leq 0.05$. L'analyse des composantes principales (ACP) a ensuite été utilisée afin de vérifier la présence et le type d'interaction entre les différentes variables à l'étude (hystérèse thermique, concentration de NaCl, température, saison, poids, âge, taille, IHS, masse du foie). L'intensité des relations entre les variables les plus fortement liées a ensuite été évaluée grâce à un test de corrélation de Pearson (les données mensuelles ont été poolées pour des comparaisons annuelles). Toutes les analyses statistiques ont été effectuées par le biais du logiciel Systat 10.2 (SPSS Inc., 2002).

CHAPITRE 2**SEASONAL MODULATION OF PLASMA ANTIFREEZE PROTEIN LEVELS
IN ATLANTIC (ANARHICHAS LUPUS) AND SPOTTED WOLFFISH (A.
MINOR)**

(Article soumis au « Journal of Experimental Zoology »)

Mariève Desjardins ^a, Nathalie R. Le François ^{b*}, Garth L. Fletcher ^c & Pierre U. Blier ^a

^a Laboratoire de biologie évolutive, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski (UQAR), 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

^b Centre Aquacole Marin, 6 rue du Parc, Grande-Rivière, Québec, Canada, G0C 1V0

^c Memorial University of Newfoundland (MUN), Ocean Sciences Centre, St-John's, Newfoundland, Canada, A1C 5S7

* Corresponding author : N.R. Le François, UQAR/MAPAQ, Centre Aquacole Marin, 6 rue du Parc, Grande-Rivière, Québec, G0C 1V0, Tel.: 418-385-2251 (222), Fax: 418-385-3343, Email: nathalie_le-francois@uqar.qc.ca

2.1 Abstract

Wolffishes (Anarhichadidae) are members of the suborder Zoarcoidei which representatives are known to produce plasmatic antifreeze proteins (AFP), in order to prevent freezing in ice-laden waters. In wolffishes, the amplitude of that protective biochemical response as well as its regulating factors, are unknown. Seasonal AFP production profiles were therefore assessed over an annual cycle in adult Atlantic wolffish and spotted wolffish (Anarhichas lupus and A. minor), two species found in the temperate waters of the northern Atlantic. Thermal hysteresis (TH) was measured in plasma from fish exposed to two thermal regimes (seasonal and fixed at 10°C), under natural photoperiod. The plasmatic freezing point was also estimated. All fish were found to produce AFP year-round. Spotted wolffish displayed low TH whereas Atlantic wolffish (exposed to the seasonal temperature regime) displayed maximal winter mean TH of $1.06 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$, with a maximal winter mean freezing point of $-1.80 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$ ($-0.86 \pm 0.06^{\circ}\text{C}$ in spotted wolffish). The colligative fraction of the response varied slightly around -0.70°C . Based on those results, Atlantic wolffish displayed the highest antifreeze protection levels in periodically icy waters. TH was closely related to water temperature ($R^2 = 0.99$), but photoperiod appeared to partially control the response.

Keywords: Atlantic wolffish; spotted wolffish; antifreeze protein; temperature;

Anarhichadidae; Zoarcoidei

2.2 Introduction

Sea-ice accumulation represents significant risk to fish species living in temperate regions, because most of them are hyposmotic to seawater. Physiological fluids of marine teleost freeze at a temperature around -0.7°C (Holmes and Donaldson, 1969), which is far above the freezing point of full-strength seawater (-1.9°C). Since survival in a supercooled state is conditional to ice nuclei avoidance (Scholander et al., 1957), fish species inhabiting ice-laden waters have thus evolved a strategy using the depression of their physiological freezing point, thanks to an elevation of their plasmatic solute concentrations (O'Grady and DeVries, 1982; Raymond, 1992; Raymond and DeVries, 1998) and the synthesis of antifreeze proteins (AFP) (DeVries and Wohlschlag, 1969). Through a non colligative adsorption-inhibition mechanism (Raymond and DeVries, 1977), AFP cause thermal hysteresis (TH), *i.e.* a difference between the rather unaffected melting point (corresponding to the colligative fraction of the response) and the lowered freezing point. Thermal hysteresis refers to the antifreeze activity of the protein and is proportional to its concentration in the plasma (Kao et al., 1986).

Since they remain active during winter in subzero temperatures and need constant and efficient antifreeze protection, representatives of the sub-order Zoarcoidei are interesting models to study the mechanism of AFP synthesis modulation. Apart from the winter flounder (in which an hyperactive AFP have been discovered recently; Marshall et al., 2004), the highest TH levels reported so far in species from temperate waters were found in the ocean pout (Macrozoarces americanus; Fletcher et al., 1985) and the common eelpout (Zoarces viviparous; Sorensen and Ramlov, 2001), both

members of the family Zoarcidae (sub-order Zoarcoidei) and shallow waters inhabitants (Scott and Scott, 1988) where the threat of freezing is omnipresent during winter. Their winter plasmatic AFP concentrations can bring their plasmatic freezing point 1.0 and 1.2°C lower, respectively (Fletcher et al., 1985; Sorensen and Ramlov, 2001). In comparison, other species with lower TH such as Winter flounder (Pleuronectes americanus) and Cunner (Tautoglabrus adspersus) cease feeding and resume metabolic activity to enter dormancy, buried in bottom sediment and hidden in rock crevices, respectively (Fletcher, 1975; Fletcher et al., 1978; Valerio et al., 1990) as other, like Atlantic cod (Gadus morhua) move away from the freezing surface waters to deeper zones (Petrie et al., 1988).

Antifreeze protein synthesis profiles have been documented for Zoarcidae representatives (ocean pout; Fletcher et al., 1985). This is not the case for other Zoarcoidei families, i.e. the Anarhichadidae (wolffishes). Until recently, the presence of type III plasmatic AFP genes characteristic to the sub-order have been reported in Atlantic wolffish (Anarhichas lupus) (Scott et al., 1988a), and we could expect the TH levels to be significant, since that species remain active at subzero temperatures (Albikovskaya, 1983) and displays approximately 85 AFP gene copies (Shears et al., 1993), in comparison with 150 in ocean pout (Hew et al., 1988). Moreover, Atlantic wolffish is sympatric to the latter in Atlantic Canada (Keats et al., 1985), and most likely exposed to similar environmental conditions.

In Anarhichadidae, the seasonal TH profile and the factors or mechanisms regulating their synthesis remain largely unknown. A first insight originates from recent work by Enevoldsen et al. (2003) where presence of low TH in Atlantic wolffish

during the summer season indicates the existence of a year-round AFP production cycle. The closely related spotted wolffish (Anarhichas minor), also evaluated by these researchers, displayed no TH at this moment. Until now, the presence of AFP genes have not been investigated in that latter species. Since they are closely related, both wolffish species should be capable of AFP production, even if spotted wolffish is found in deeper waters in the wild (Barsukov, 1959).

Environmental factors involved in antifreeze protein response have been more extensively covered in other species. The most complete assessment is found for winter flounder (Fletcher et al., 1989a; Miao et al., 2002). The key initiating factor for AFP synthesis in this small coastal flatfish appears to be photoperiod, while temperature could act on AFP accumulation levels through clearance/denaturation processes. In Atlantic cod (Fletcher et al., 1987) and ocean pout (Fletcher et al., 1985), water temperature seems to be the leading stimulus for the amplification of antifreeze protection. It seems thus likely that AFP synthesis in wolffish should responds to the same environmental stimulus. Other (biotic) factors, like AFP gene copy number (Scott et al., 1988), population/latitude (Fletcher and Smith, 1980; Fletcher et al., 1985; Goddard et al., 1999), depth of distribution (Wöhrmann, 1996; Goddard and Fletcher, 2002), activity level (Wöhrmann, 1997) and age can also significantly affects AFP expression and resulting plasmatic TH.

The present study is the first to evaluate plasmatic AFP seasonal TH profiles in two closely related Anarhichadidae, *i.e.* adult Atlantic wolffish and spotted wolffish, on a comparative basis. Both species appear to be closely related, but occupy two

different habitats. Atlantic wolffish is found in shallow waters exposed to freezing threat while spotted wolffish is restricted to deeper habitats (Barsukov, 1959).

Comparison of those species will allow us to determine if the antifreeze protection strategy is mainly dictated by phylogenetic determinants or if it can be modulated by habitat constraints and environmental cues.

2.3 Material and methods

2.3.1 Experimental set-up

Atlantic and spotted adult wolffishes were caught by local fishermen on the Beaugé Bank, in Lower North Shore of St-Lawrence River region (Québec, Canada) and kept in captivity for three years at the Centre Aquacole Marin facilities (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Grande-Rivière, Québec) prior to the experiment. The experimental set-up consisted of two sets of tanks, supplied with natural seawater (28-30‰) at two different annual temperature regimes. Each set comprised of two circular tanks each occupied by eight adult Atlantic or spotted wolffish, individually tagged with electronic microchips (12 mm Musicc Fecava, Avid Canada). One group of each species was maintained year-round in a stable, fixed temperature (FT), thermal environment (10.0-12.0°C for Atlantic wolffish and 7.0-8.0°C for the more cold-stenothermal spotted wolffish). A second group of each species was exposed to ambient seasonal temperatures (ST) that ranged from -0.2 to 11.0°C for the Atlantic wolffish and -0.2 to 8.0°C for the spotted wolffish. Fish were allowed to acclimatize to their respective thermal environment from October to

February, with the first sampling taking place in March. The mean weight of fish from each species at that period was of 3.94 ± 1.42 and 1.86 ± 0.55 kg for TC and TS Atlantic wolffish respectively and 5.88 ± 1.21 and 4.09 ± 0.92 kg for TC and TS spotted wolffish respectively. Ambient photoperiod (8L/16D to 14L/10D) was maintained and recordings of the physico-chemical parameters were performed daily. Photoperiod adjusted weekly. Fish were routinely fed optimal rations every two days.

2.3.2 Blood sampling and anatomical measurements

All fish were anaesthetised (benzocain, 50 mg/L) prior to being blood sampled and measured. That operation was done monthly on all the study animals and a minimal blood volume (1 ml) was sampled in order to not harm the fish. Blood was collected from a caudal blood vessel using a 20 gauge needle and a 3 cc heparinized syringe washed with concentrated lithium heparin solutions (1000 U/ml) and transferred to 1.5 ml test tubes (50 U lithium heparin/tube; Houston, 1990). The blood cells were separated from the plasma by centrifugation at 4000 g for 10 min at 4°C. The plasma was transferred to new 1.5 ml test tubes and stored at -80°C until analysis.

Growth rate (GR) was calculated and condition factor was obtained using the following formulae (Busacker et al., 1990):

$$K = (\text{total fish weigh} / \text{fish length}^3) \times 100$$

2.3.3 Plasmatic parameters evaluation

2.3.3.1 Thermal hysteresis, colligative contribution of osmolytes and freezing point

Thermal hysteresis (TH) determination is realized by using a freezing point nanoliter osmometer (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) mounted on a compound microscope (x 100), according to the method of Kao et al. (1986). This device enables the user to visually monitor the behaviour of a single microscopic ice crystal in nanoliters of solution (i.e. wolffish plasma). After being frozen at -40°C , the sample is thawed until one ice crystal remains. Afterward, by gradually raising/lowering the sample temperature, this tiny ice crystal can be observed to shrink (melting point), then to grow (non-equilibrium freezing point), the temperature difference obtained between these two events being the TH value. The plasmatic melting point (MP) represents the colligative contribution of osmolytes to the plasma freezing point (FP) depression. Since the osmometer gives concentration values (mOsm/kg), the data obtained were converted in temperature values ($^{\circ}\text{C}$), owing that 1000 mOsm/kg depress the freezing point of a solution of 1.86°C .

Presence of AFP in solution was also determined qualitatively. Ice crystals grown in presence of AFP take a characteristic hexagonal conformation, linked to the fixation preferendum of AFP at their surface. This pattern is affected by AFP concentrations, crystals taking prismatic to bipyramidal forms before undergoing spicular growth if temperature is lowered beyond the limit of efficiency of AFP (Raymond and DeVries, 1977; Davis and Hew, 1990; Griffith and Ewart, 1995; Wilson et al., 2002). Crystals in AFP-free solutions grow as flat discs (Harrison et al., 1987).

Pictures of ice crystals observed in wolffish were recorded from a digital camera (4912-2010/0000, Alpha Innotech Corporation).

2.3.3.2 Principal electrolyte concentrations

Plasmatic sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) ions concentrations (mM) were measured with an electrolyte analyser (Ecolyte, Eschweiler).

2.3.4 Statistical analysis

Low sample size ($n = 8$) and non-normality within group value distributions precluded the use of parametric tests. Non-parametric Mann-Whitney tests were thus chosen to compare plasmatic parameter distributions (TH, MP, Na⁺, Cl⁻), in order to ensure homogeneity between replicates. The significance threshold was fixed to $p \leq 0.05$. A Principal Components Analysis (PCA), performed on a correlation matrix, was used to check for the presence and the type of interactions between the studied variables, i.e. thermal hysteresis (TH), colligative contribution of osmolytes (MP), sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) concentrations, condition factor (K), growth rate (GR) and seawater temperature (SW). The strength of the relation among the most closely related variables against TH was then evaluated with Pearson correlation coefficient tests (following compilation of monthly data, annual data showed normal distribution and $n = 88$ for each groups). All statistical analyses were performed using Systat 10.2 software (SPSS Inc., 1998).

2.4 Results

2.4.1 Mean plasmatic response profiles

2.4.1.1 Thermal hysteresis

Qualitative evaluation

Presence of AFP was first assessed by visual observation of crystal conformations during ice growth (Fig. 1), which is useful since the quantitative method lacks precision in differentiating very low AFP solution concentrations from AFP-free solutions (Griffith and Ewart, 1995). All samples from both species and thermal experimental treatments were positive for AFP, even when TH was not quantitatively assessable during summer months ($\leq 0.1^{\circ}\text{C}$), indicating a year-round synthesis capacity. Usual crystal conformations and growth patterns were obtained in Atlantic wolffish (Fig. 1 a-c). However, crystal growth observed in spotted wolffish was different of previously reported patterns (Fig. 1 e). Numerous non-elongated and irregularly shaped units along the length of the hexagonal bipyramidal seed crystal were observed.

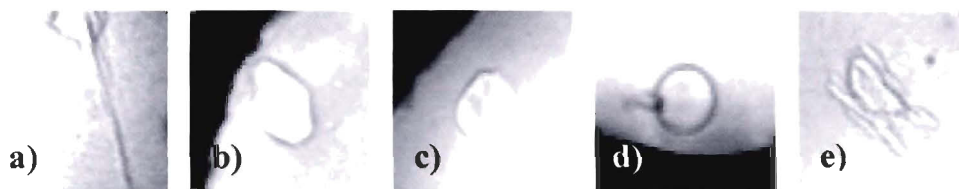


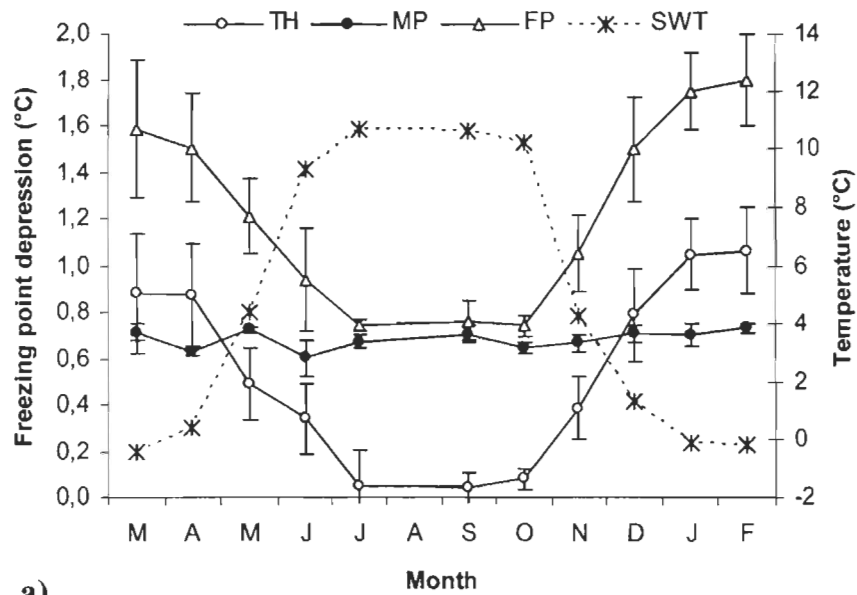
Figure 1. Ice crystals grown in presence of a) high, b) low and c) trace AFP concentrations in Atlantic wolffish plasma; d) crystal in absence of AFP; e) ice crystal grown in spotted wolffish plasma.

Quantitative evaluation

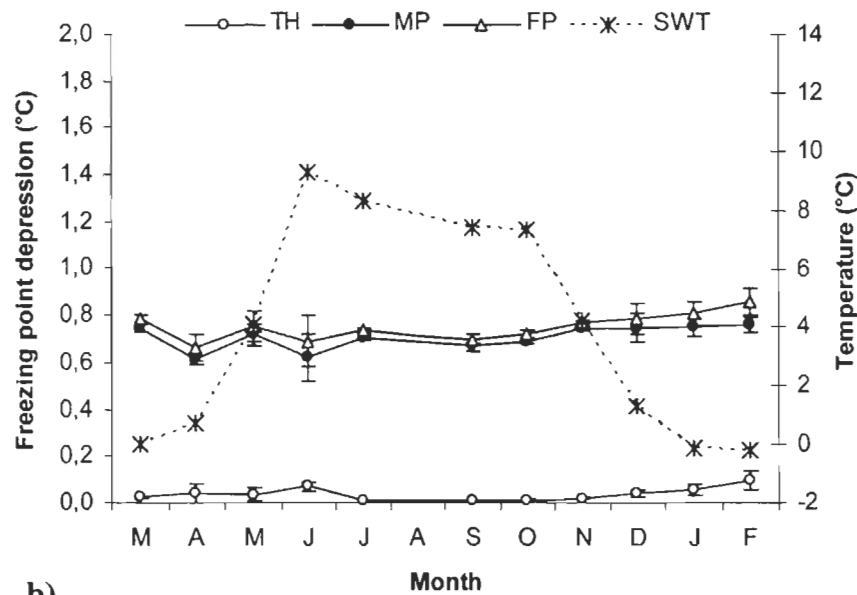
The Atlantic wolffish displayed higher plasmatic mean TH levels, compared to the spotted wolffish (Fig. 2). In fish exposed to the seasonal temperature (ST) regime (Fig. 2 a-b), maximum TH values were observed in February (Atlantic wolffish: $1.06 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$; spotted wolffish: $0.10 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$) and corresponded to the lowest temperatures attained during the experimental year (-0.2°C). TH was always higher in ST adapted Atlantic wolffish, compared with all other groups, especially in winter. In fish kept at a fixed temperature of 10°C (FT) (Fig. 2 c-d), the Atlantic wolffish still showed a maximal TH value superior to that of spotted wolffish ($0.19 \pm 0.16^{\circ}\text{C}$ and $0.02 \pm 0.00^{\circ}\text{C}$, respectively).

TH was inversely correlated with seawater temperature ($R^2 = -0.90$) in ST exposed Atlantic wolffish. In spotted wolffish, TH-seawater temperature correlation could not be established ($R^2 = -0.28$), but there was a slight tendency toward this pattern. Condition factor (K) and growth rate (GR) seemed to have no influence on this fraction of the plasmatic response (Principal Component Analysis, Fig. 3). Further examination of the relation between TH and experimental seawater temperature led to the establishment of a highly predictive ($R^2 = 0.99$) exponential function linking these two parameters in Atlantic wolffish (Fig. 4). In that species, winter mean maximal TH values ($1.06 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$) were superior to those obtained in July ($0.07 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$), with a difference of approximately 1.00°C (Fig. 2 a). Interestingly, a slight elevation of TH response still occurred during the winter months at 10°C FT regime (Fig. 2 c). In spotted wolffish, such a tendency was observable only within the ST group (Fig. 2 b),

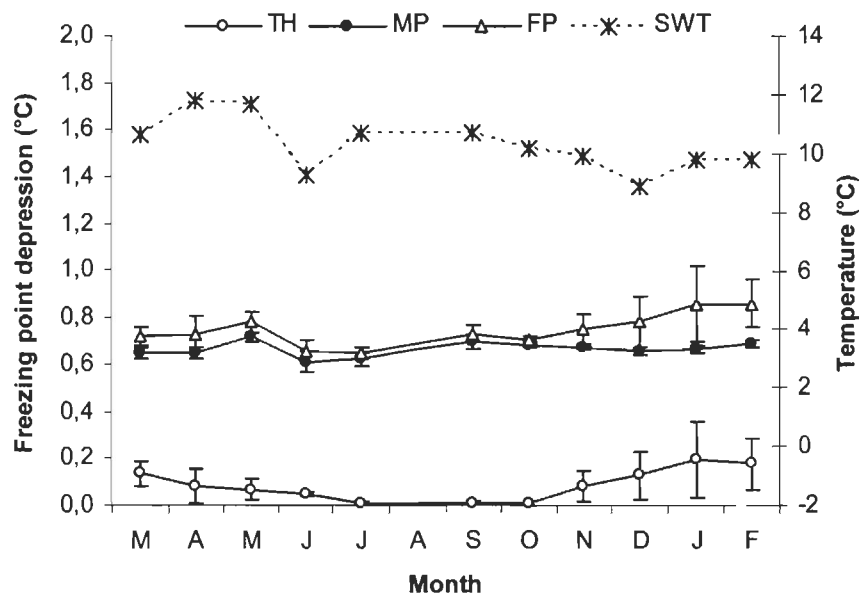
the TH of the 10°C FT fishes exhibiting stable trace levels (TH near 0°C; non quantitatively assessable) year-round (Fig. 2 d).



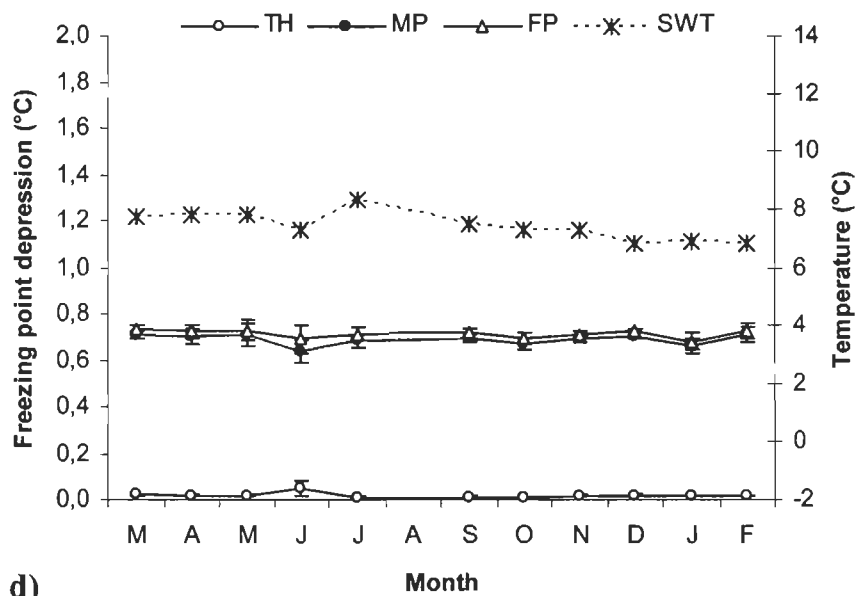
a)



b)



c)



d)

Figure 2. Mean seasonal profiles of plasmatic freezing point depression (FP) related to thermal hysteresis (TH) and the colligative contribution of osmolytes referred as melting point (MP) in Atlantic wolffish at ST a) and FT c); in spotted wolffish in ST b) and FT d) against experimental seawater (SWT) temperature (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature).

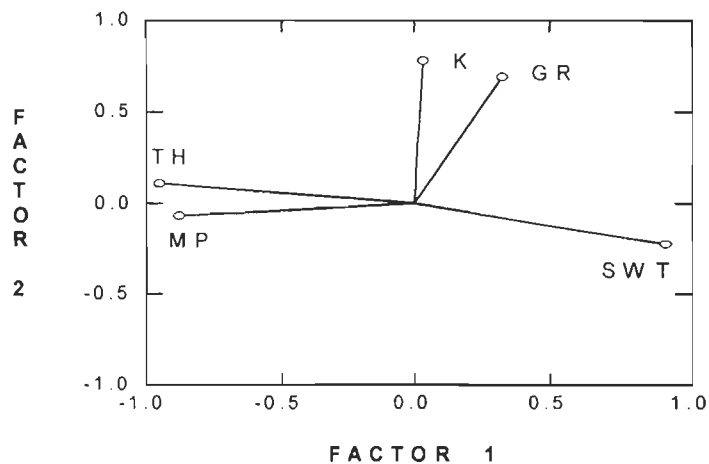


Figure 3. Principal Factor Analysis testing the correlation between plasmatic variables (thermal hysteresis [TH] and the colligative contribution of osmolytes [MP]) and seawater temperature (SWT), condition factor (K) and growth rate (GR) in Atlantic wolffish at ST (ST: seasonal temperature); factor 1 and 2 accounts for 46.5 and 25.1 % of the variance, respectively.

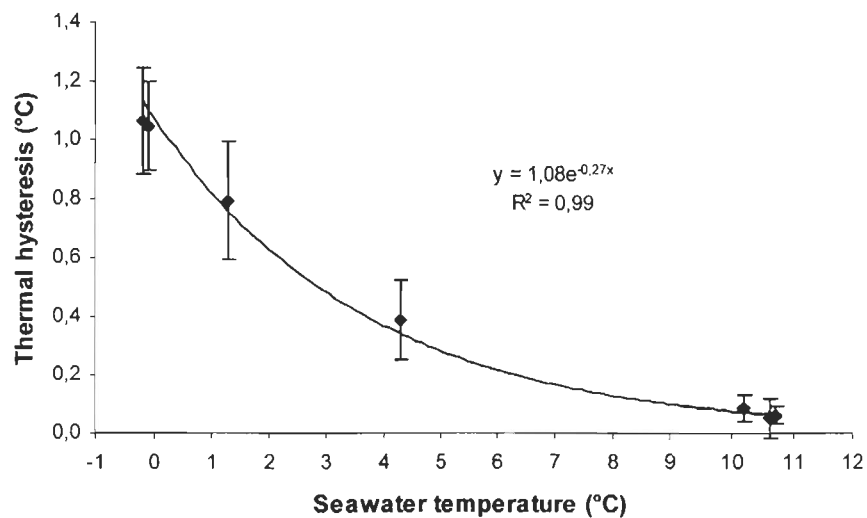


Figure 4. Relation between mean plasmatic thermal hysteresis and seawater temperature in Atlantic wolffish at ST (ST : seasonal T°) from July to February.

Standard deviations observed in the mean TH values of Atlantic wolffish (Fig. 2 a-c) highlight an important interindividual variability for this parameter. In ST adapted fishes, the highest and lowest winter TH values attained in February were of 1.24°C and 0.67°C, respectively; a two-fold difference. Interestingly, the best AFP producers (highest TH responses) by the end of the annual trial were not as effective at the beginning of the experiment, and conversely.

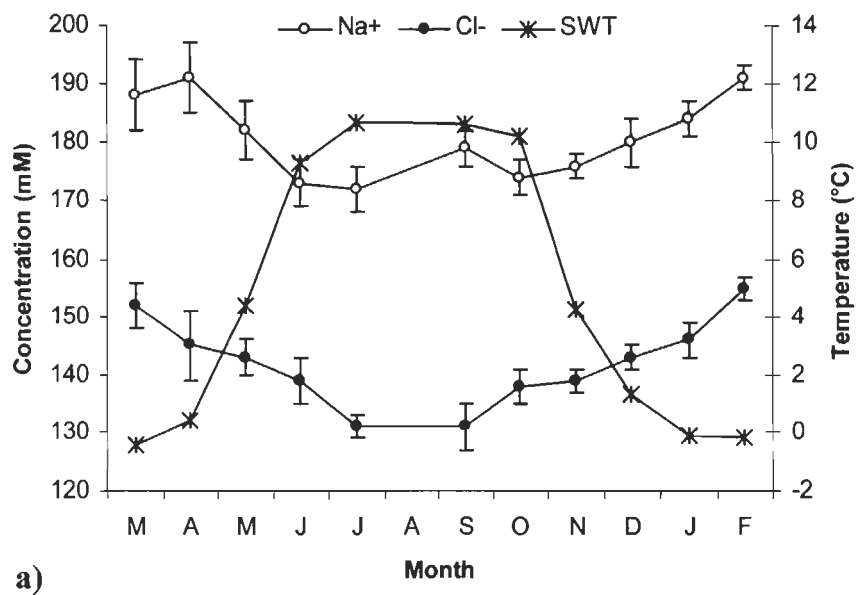
2.4.1.2 Colligative contribution of osmolytes and freezing point

Compared to TH, the colligative contribution of osmolytes, represented as the plasmatic melting point (MP), showed much smaller annual fluctuations. Their mean contribution to freezing point (FP) depression approximated 0.7°C all year long (Fig. 2). In Atlantic wolffish exposed to seasonal seawater temperature, FP depression induced by osmolytes was of $0.67 \pm 0.03^\circ\text{C}$ in the summer (July) and of $0.73 \pm 0.02^\circ\text{C}$ in the winter (February), whereas they were of $0.71 \pm 0.01^\circ\text{C}$ and of $0.76 \pm 0.03^\circ\text{C}$ respectively in spotted wolffish (Fig. 2 a-b). Thereafter, winter adjustment was negligible (a rise of 0.04 and 0.03°C protection in Atlantic and spotted wolffishes, respectively). The Principal Component Analysis (Fig. 3) displayed an inverse relationship between MP and the experimental seawater temperature (SWT) in Atlantic wolffish acclimatized to the ST regime ($R^2 = -0.53$). A similar pattern was observed in ST adapted spotted wolffish ($R^2 = -0.64$). In 10°C FT exposed fishes (Fig. 2 c-d), the colligative contribution of osmolytes to the lowering of plasma FP was stable to its lowest value (lowest MP).

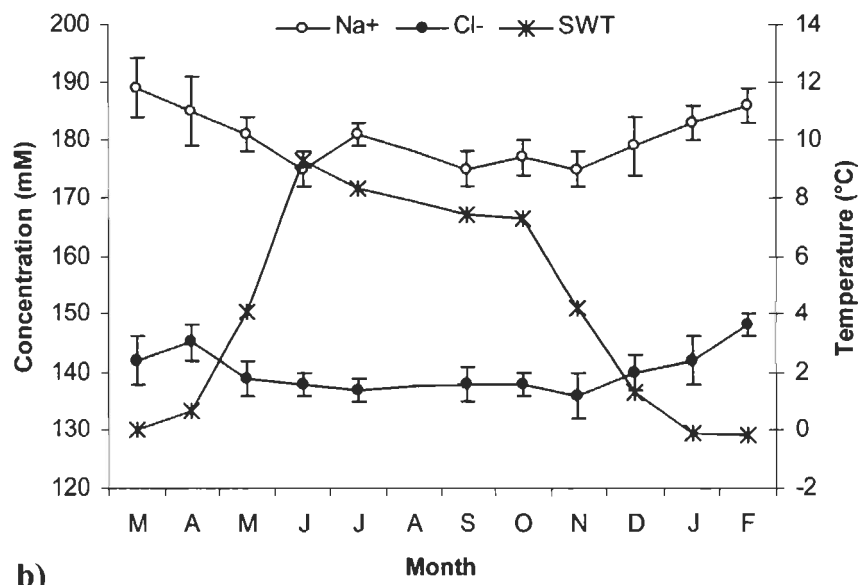
Due to the relative stable protection levels given by plasmatic osmolytes, fluctuations in FP depression were strongly dependent to fluctuations in TH levels. Maximum mean FP values (ST: $-1.80 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$; FT: $-0.86 \pm 0.10^{\circ}\text{C}$), were always higher in Atlantic wolffish than in spotted wolffish at the same period (ST: $-0.86 \pm 0.06^{\circ}\text{C}$; FT: $-0.73 \pm 0.06^{\circ}\text{C}$), independently of the thermal treatment (Fig. 2).

2.4.1.3 Principal electrolyte concentrations

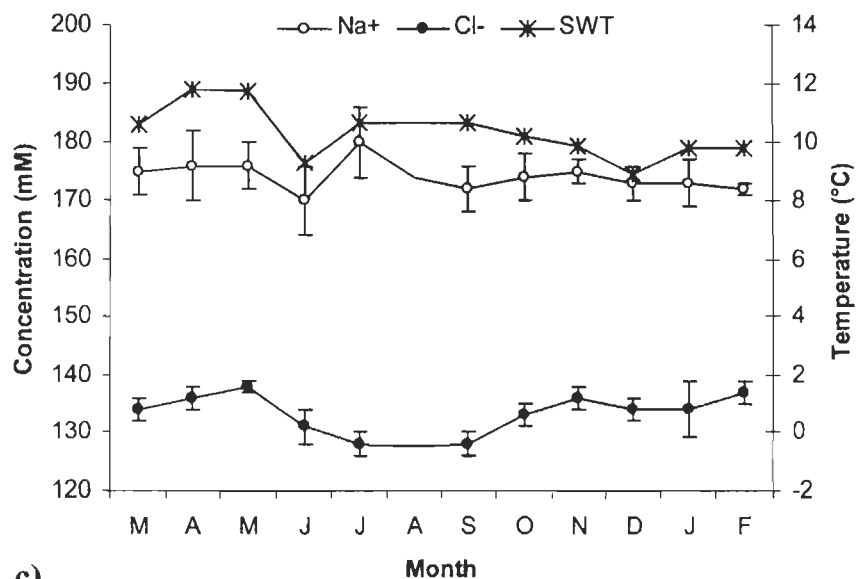
In fish from both species exposed to the ST treatment, differences between mean summer and winter values were found. In Atlantic wolffish, values were of 172 ± 4 mM (Na^+) and 131 ± 3 mM (Cl^-) in the summer (July) and of 191 ± 3 mM (Na^+) and 155 ± 2 mM (Cl^-) in the winter (February) (Fig. 5 a), whereas they were of 181 ± 2 mM (Na^+) and 137 ± 3 mM (Cl^-) in the summer (July) and of 186 ± 3 mM (Na^+) and 148 ± 2 mM (Cl^-) in the winter (February) for the spotted wolffish (Fig. 5 b). There was an inverse relationship between Na^+ and Cl^- concentrations and the experimental SWT in Atlantic wolffish acclimatized to the ST regime ($R^2_{\text{Na}^+} = -0.73$, $R^2_{\text{Cl}^-} = -0.82$). A similar but slightly weaker pattern was observed in ST adapted spotted wolffish ($R^2_{\text{Na}^+} = -0.60$, $R^2_{\text{Cl}^-} = -0.58$). In fish exposed to the 10°C FT treatment (Fig. 5 c-d), Na^+ and Cl^- contribution to the depression of the plasmatic FP was stable to its lowest values.



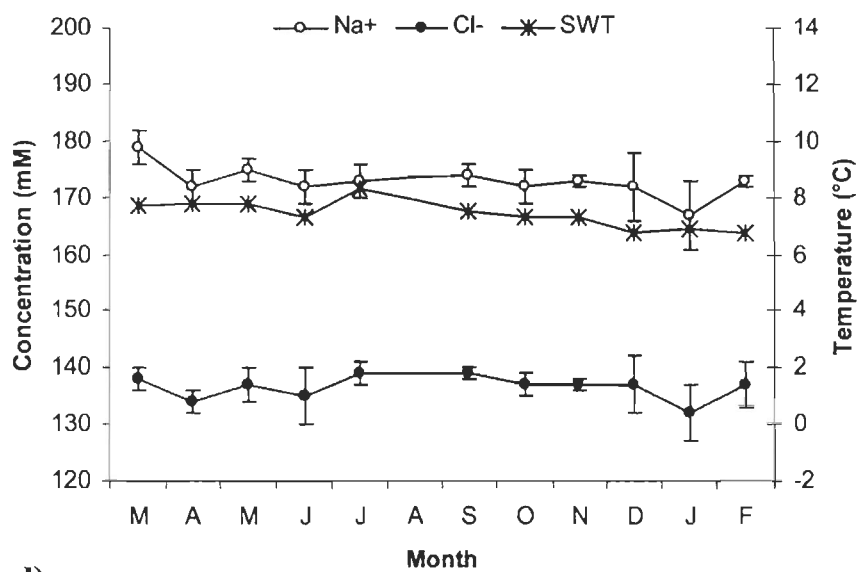
a)



b)



c)



d)

Figure 5. Mean seasonal profiles of plasmatic sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) concentrations in Atlantic wolffish at ST a) and FT c) and in spotted wolffish in ST b) and FT d) against experimental seawater temperature (SWT) (ST: seasonal temperature ; FT: 10°C fixed temperature).

2.4.2 Fish growth rate and condition

Growth rates (GR) measured were low and constant (< 0.2). Condition factor (K) was stable with high mean values (approximately 0.90-1.00) year-round in all fish (Table 1), indicating the experimental animals were in good physiological condition. In general, both species were observed to feed during the entire experimentation.

Table 1. Mean condition factor (K) values in Atlantic and spotted wolffish (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature); n = 8/group.

Month	Atlantic wolffish		Spotted wolffish	
	ST	FT	ST	FT
M	0.92 ± 0.08	0.90 ± 0.12	1.05 ± 0.18	1.01 ± 0.12
A	0.99 ± 0.29	1.00 ± 0.12	1.04 ± 0.18	0.98 ± 0.12
M	0.97 ± 0.07	1.02 ± 0.14	0.99 ± 0.19	0.96 ± 0.11
J	0.86 ± 0.08	0.99 ± 0.14	0.97 ± 0.16	0.95 ± 0.11
J	0.94 ± 0.27	0.98 ± 0.12	0.93 ± 0.17	0.90 ± 0.14
S	0.91 ± 0.08	0.97 ± 0.23	0.99 ± 0.16	1.05 ± 0.11
O	0.94 ± 0.11	1.05 ± 0.13	1.02 ± 0.16	1.00 ± 0.13
N	0.95 ± 0.10	1.09 ± 0.16	1.03 ± 0.19	1.04 ± 0.14
D	0.93 ± 0.09	1.03 ± 0.10	1.02 ± 0.18	0.92 ± 0.08
J	0.93 ± 0.09	1.02 ± 0.10	1.03 ± 0.15	0.91 ± 0.05
F	0.92 ± 0.09	1.02 ± 0.11	1.03 ± 0.16	0.95 ± 0.06

2.5 Discussion

2.5.1 Mean plasmatic response profiles

2.5.1.1 Thermal hysteresis

Prior to the consolidation of the ice coverage, some sea-ice can be brought deeper when strong winds disturb extensively the water column. After computer simulations, Svensson and Omstedt (1998) concluded that a small proportion of suspended ice crystals could be brought down to depths of approximately 25 m under a 10m/s (36 km/h) wind. In shallow waters, such crystals can form “anchor ice” when reaching the sea-floor, down to 30 m (Eastman, 1993). By living below the critical ice intrusion zone, deeper dwelling species likely avoid exposure to suspended ice crystals and can thus thrive in a supercooled state without any or efficient antifreeze protection (Scholander et al., 1957; Goddard and Fletcher, 1997).

It seems that members of the sub-order Zoarcoidei first appeared in Antarctic, from which they underwent radiation (Scott et al., 1986). Since representatives of the family Zoarcidae cover both hemispheres and that members of Anarhichadidae are not found south, wolffishes could descend from a migrant zoarcid. Type III AFP expression is widespread among the sub-order Zoarcoidei, including anarhichadids and zoarcids (Shears et al., 1993) from Antarctic to Arctic (Hew et al., 1984). Since Atlantic wolffish do possess and expresses AFP genes, the occurrence of those genes in spotted wolffish is likely. Comparison of both species is therefore a good

opportunity to assess the importance of both phylogenetic and environmental determinants in the expression and the modulation of antifreeze protection.

Results showed that both species are able of AFP expression. The maximal plasmatic TH value found in Atlantic wolffish acclimated to ST (1.06°C, Fig. 2 a) was similar to those reported for ocean pout (1.0°C; Fletcher et al., 1985) and common eelpout (1.2°C; Sorensen and Ramlov, 2001), which places the Atlantic wolffish among the most efficient AFP producers in temperate waters. The measured TH levels were higher in ST exposed Atlantic wolffish (Fig. 2 a) compared with spotted wolffish (Fig. 2 b), which agrees with their respective depth preferences in the wild. Minimal depths of occurrence reported for Atlantic and spotted wolffish are of 2 and 54 m, respectively (Barsukov, 1959). The low TH levels encountered in spotted wolffish may then reflect a recent relaxation of the selective pressure for AFP synthesis, owing to the selection of a deeper distribution range where ice intrusion is less likely. Such a negative correlation between habitat depth and plasmatic TH was previously observed, both among unrelated (Wöhrmann, 1996) and related (same genus) species (Goddard and Fletcher, 2002).

Why then does spotted wolffish still produces plasmatic AFP ? One could argue that the selection of a deeper habitat by that species is too recent in its evolutionary history for the antifreeze response to have completely disappeared. Low (still measurable) plasmatic TH also remains in deep-sea Antarctic fishes (notothenioids, liparidids and zoarcids found to 2000-2600 m), which apparently do not need such a protection (Wöhrmann, 1997). Because ice may have first formed periodically then permanently since 38 million years (Kennett, 1982), AFP synthesis capacities in deep-

sea Antarctic species should have been lost for a long time, in order to avoid the metabolically costly maintenance of high plasmatic AFP levels (Wöhrmann, 1997). Here, spotted wolffish and deep-sea Antarctic fishes share a common feature: the aptitude to live in cold (still non-freezing) environments. In 1990, Rubinsky et al. hypothesised a protective function of AFP on mammalian cellular membranes during hypothermic exposure. Since then, a growing number of studies reported such an effect of AFP in cold acclimatization (reviewed in Tomczak and Crowe, 2002). AFP are thought to interact directly with cellular membrane phospholipids and/or proteins, thus preventing cell leakage and death during phase transition experienced during cooling (Rubinsky et al., 1990; Hays et al., 1996). Only minimal amounts of the protein are needed for this cold-protection effect (Rubinsky et al., 1990), possibly allowing spotted wolffish to use its AFP for the preservation of cellular integrity and function across its cold temperature range (-1.3 to 5.0°C; Barsukov, 1959).

The unusual pattern of ice crystal growth observed in spotted wolffish (Fig. 1) also suggest AFP structure modification in that species, which could be related whether to a relaxation of the selective pressure or to a change of function. Even when displaying various and distinct structures and having different binding affinities for non-basal crystal planes (Brown and Sönnichsen, 2002), all AFP classes still yield roughly the same spicular growth from the tips of a seed crystal, as well as similar molar thermal hysteresis activities (Chao et al., 1995; Fletcher et al., 2001). Other studies have also reported the remarkable stability of the protein structure within Zoarcoidei representatives from both hemispheres (Schrag et al., 1987; Shears et al., 1993). Interesting avenues of investigation then arise: 1) the comparison of the efficiency of

spotted wolffish AFP with the classical type III AFP at similar concentrations in antifreeze and cold protection, 2) the characterisation of the structure and the respective expression levels of its AFP, compared with other type III AFP synthesized by ocean pout (Hew et al., 1984) and Atlantic wolffish (Shears et al., 1993) and 3) the comparative analysis of molecular evolution of type III AFP among Zoarcoidei. Results from such research could establish if spotted wolffish is evolving a complete loss of its AFP synthesis capacity and could also shed light on the phylogeny of Anarhichadidae.

In fish, water temperature is the major abiotic factor influencing physiology (Brett, 1979). Temperature alone seems to account for TH variations observed in both species studied, especially Atlantic wolffish (ST, Fig. 2 a). In that species, the mean seasonal TH profile was inversely related to the seasonal temperature pattern (Fig. 3) in a highly predictive way (Fig. 4), as previously reported in the related ocean pout (Fletcher et al., 1985). However, TH seasonal variations observed in Atlantic wolffish exposed to constant temperature at 10°C (Fig. 2 c), indicate partial regulation by photoperiod. It could then be hypothesised that photoperiod is a necessary signal to onset higher AFP synthesis levels (in suborder Zoarcoidei), while temperature determines the final plasmatic concentrations by acting, for instance, at the rate of AFP elimination (via denaturation of the protein and its corresponding ARNm and/or clearance), as previously proposed for winter flounder by Fletcher (1981).

2.5.1.2 Colligative contribution of osmolytes and freezing point

Temperature-dependent fluctuations of plasmatic osmolytes (mostly Na⁺ and Cl⁻) in temperate and polar fishes have been covered extensively (O'Grady and

DeVries, 1982; Burton, 1986; Raymond, 1992; Raymond and DeVries, 1998). A frequently observed response is an elevation of their concentrations following seasonal seawater temperature depression, as presented in Fig. 5 a-b. Fish partially compensate for osmotic disruption caused by temperature by increasing NaK-ATPase activity (Hochachka, 1988; Staurnes et al., 1994). In both wolffish species studied, plasmatic osmolytes levels did followed the general scheme (Fig. 2) with the highest freezing point depression contributions being observed at water temperature minima in ST exposed fish. However, the difference between the summer and winter protection levels in both species is subtle and better observable when looking at the concentration fluctuations of the principal plasmatic electrolytes (Na^+ and Cl^-) (Fig. 5 a-b).

In ST exposed Atlantic wolffish (Fig. 2 a), the maximum mean plasmatic freezing point (-1.80°C) exceeded the minimal freezing point encountered in the zone of provenance of the experimental fishes (-1.70°C). The mean level of protection reached by Atlantic wolffish thus tightly fits its environment requirements. By having a lower winter plasmatic freezing point, Atlantic wolffish clearly display an advantage over spotted wolffish and other suboptimally freeze-protected or cold-inactive species, as it can apparently exploit the coastal ecological niche year-round.

2.5.2 Individual plasmatic response profiles

This work is the first attempt to follow individual plasmatic TH patterns on a year basis in two closely related wolffish species occupying different water depths. Results showed substantial interindividual TH value variations, especially noticeable in Atlantic wolffish (Fig. 2 a). In most species studied to date, the level of antifreeze

protection seemed to be rather uniform within a given population. The only exception known to date was the Sea raven (Hemitripteris americanus) for which differences in TH as high as approximately 0.7°C were found among individuals. That species seems not to encounter sustained ice exposition and thus maybe not experience intensive selective pressure for that trait (Fletcher et al., 1984). In Atlantic wolffish, highest and lowest winter individual TH values were of 1.24°C and 0.67°C, respectively (difference of approximately 0.6°C). Local migration events linked to reproduction have been noticed in Atlantic wolffish by several authors (Jonsson, 1982; Keats et al., 1985), but no clear migration pattern could be established (O’Dea and Haedrich, 2002). We tentatively suggest that the existence of an intraspecific difference in TH levels in Atlantic wolffish could possibly be linked to an intraspecific divergence in behaviour, i.e. a fraction of the population (the most efficient AFP producers) would be non-migrant near-shore inhabitants. Those individuals could then exploit shallow bottoms on a year-round basis, their higher metabolic expenditure being compensated by lower competition in that ecological niche during winter.

In conclusion, our study demonstrated that Atlantic wolffish is well adapted to survival in icy shallow waters with its high TH levels and low freezing point. Lower TH in spotted wolffish could reflect an evolutive loss of its AFP synthesis capacity through occupation of deeper waters (> 50 m). AFP could however confer, even at low concentration, other evolutive advantage to spotted wolffish, such as protection of cellular membranes in cold non-freezing conditions.

Until now, temperature was thought to be the leading stimulus for AFP expression in Zoarcoidei. Photoperiod, rather than temperature, could be the cue for

AFP synthesis, as TH fluctuations were still recorded in fish exposed to 10°C year long. The role of temperature could be the modulation of plasmatic concentration through modification of denaturation/clearance rates of the protein and its mRNA.

Finally, by shedding light on the factors responsible for the modulation of the antifreeze protection, this study suggests a preponderance of the combined influence of habitat selection and environmental factors over phylogeny in Anarhcadidae.

CHAPITRE 3

ABSENCE OF AN AGE-RELATED EFFECT ON THE LEVEL OF ANTIFREEZE PROTEIN SYNTHESIS IN ATLANTIC WOLFFISH (ANARHICHAS LUPUS)

(Article soumis au Journal « Aquaculture »)

Mariève Desjardins ^a, Nathalie R. Le François ^{b*}, Garth L. Fletcher ^c & Pierre U. Blier ^a

^a Laboratoire de biologie évolutive, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski (UQAR), 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

^b Centre Aquacole Marin, 6 rue du Parc, Grande-Rivière, Québec, Canada, G0C 1V0

^c Memorial University of Newfoundland (MUN), Ocean Sciences Centre, St-John's, Newfoundland, Canada, A1C 5S7

* Corresponding author : N.R. Le François, UQAR/MAPAQ, Centre Aquacole Marin, 6 rue du Parc, Grande-Rivière, Québec, G0C 1V0, Tel.: 418-385-2251 (222), Fax: 418-385-3343, Email: nathalie_le-francois@uqar.qc.ca

3.1 Abstract

Atlantic wolffish (family: Anarhichadidae) produce plasmatic antifreeze proreins (AFP) to prevent freezing. Seasonal antifreeze protein (AFP) production profiles were assessed over an annual cycle in Atlantic wolffish (Anarhichas lupus), a species designated for cold-water mariculture. Results for juveniles (1+ and 2+) were compared to adult data from a previous study. Thermal hysteresis and AFP concentrations were measured in plasma from fish exposed to two thermal regimes (seasonal and fixed at 10°C), within a natural photoperiod treatment. Total plasmatic freezing point was also estimated. All fishes were found to produce AFP year-round. The 1+ and 2+ fish groups exposed to the seasonal temperature regime showed their respective maximal winter mean thermal hysteresis (1.00 ± 0.15 and $1.01 \pm 0.11^\circ\text{C}$) and AFP concentration (12.733 ± 3.708 and 12.839 ± 2.923 mg AFP/ml plasma) values in February, with a maximal winter mean plasmatic total freezing point of -1.71 ± 0.15 and $-1.76 \pm 0.21^\circ\text{C}$, respectively. Data for adult fish submitted to the same treatment (from a previous study) were of $1.06 \pm 0.18^\circ\text{C}$, 14.657 ± 4.539 mg AFP/ml plasma and $-1.80 \pm 0.20^\circ\text{C}$, respectively. Based on those results, it can be concluded that the level of AFP synthesis in Atlantic wolffish is high and not related to age. Moreover, the high plasmatic AFP concentrations found in Atlantic wolffish could allow that species to be grown in sea-cages early in development.

Keywords: aquaculture; Atlantic wolffish; antifreeze protein; temperature; age

3.2 Introduction

A major constraint to the development and diversification of the mariculture industry in Atlantic Canada is the extreme environmental conditions encountered in coastal areas (extensive ice coverage and cold temperature; El-Sabh and Silverberg, 1990). A recent study comparing 47 fish species indigenous to the East coast of Canada identified two wolffish species (suborder Zoarcoidei, family Anarhichadidae), the Atlantic and the spotted wolffish (Anarhichas lupus and A. minor), as presenting the best biological and technical potential for cold-water mariculture (Le François et al., 2002). These benthic sedentary species display impressive resistance to a wide variety of deleterious environmental conditions (Foss et al., 2001, 2002, 2003a, 2003b; Le François et al., 2004b) and exhibit good growth rates at low temperature (Moksness, 1994). To withstand the presence of ice in winter, they also express antifreeze protection (Scott et al., 1988a; Shears et al., 1993; Desjardins et al., in prep.).

In northern Atlantic, seawater temperatures are subjected to seasonal fluctuations, characterized by near-shore ice coverage during the winter months. Fish inhabiting coastal zones are therefore threatened of freezing without adequate protection, the colligative freezing point of their physiological fluids being significantly higher than that of the surrounding environment (minimal freezing point of -1.9°C in full strength seawater). Many species found in such habitats produce plasmatic antifreeze proteins (AFP) (reviewed by Cheng and DeVries, 2002) to ensure their survival when exposed to sea-ice. These specialized proteins are thought to limit frost propagation by adsorption of intruding seed ice crystals (Raymond and DeVries, 1977), further depressing the freezing point of physiological fluids to safe levels by non

colligative mechanisms. The seasonal variation of plasma melting point includes the colligative fraction of the biochemical cold acclimation response. The resulting difference observed between the melting and freezing points of a solution containing AFP is called “thermal hysteresis” (TH), which is directly proportional to AFP concentrations and refers to the antifreeze activity of the protein (Kao et al., 1986).

When considering sea cage farming operations in temperate coastal waters, species presenting natural cold adaptation strategies clearly represent advantages. Some commonly cultured species such as haddock (*Melanogrammus aeglefinus*; Ewart et al., 2000) and Atlantic cod (*Gadus morhua*; Fletcher et al., 1997) have been studied. Both species displayed incomplete levels of antifreeze protection. In natural conditions, most cod populations overwinter offshore in warmer and deeper waters (Goddard and Fletcher, 2002), while haddock is known to prefer waters deeper than 27 m and above 0°C (Scott and Scott, 1988). In a previous study (Desjardins et al., in prep.), spotted wolffish showed negligible antifreeze protection whereas Atlantic wolffish presented higher TH, enabling the latter to be raised in sea-cages year-round. In this study, both photoperiod and temperature, which are leading environmental factors modulating AFP synthesis (reviewed in Goddard and Fletcher, 2002), were found to influence TH levels in adult wolffish.

Antifreeze proteins are the object of extensive research aimed at applications in diverse fields of activity, from food sciences to medicine (Griffith and Ewart, 1995; Fletcher et al., 1999; Pham et al., 1999; Amir et al., 2004). Both low availability of AFP because of seasonal fisheries and short shelf-life (6 months), dictate a high market value for AFP of approximately 5000 US\$/g (AF Protein Canada Inc.). Extraction of

that biomolecule from residual biomass or repetitive blood samplings could confer substantial added incomes within an Atlantic wolffish production cycle (Brown, 1998; Le François et al., 2004a).

Following hatching, young farmed wolffish would be raised in land-based facilities at relatively warmer temperatures (7-8°C; Falk-Petersen et al., 1999) to promote growth before transfer to sea-cages for the further on-growing phase at seasonal temperatures, where they would be exposed to subzero temperatures. It is then important to assess the efficient expression of antifreeze protection during the earliest developmental stages and to determine if this ability is kept even though young wolffishes were never exposed to freezing conditions earlier in life. Previous study on Atlantic cod proved that life in warm conditions does not alter the antifreeze response in that species when facing cold temperatures for the first time (Purchase et al., 2001).

The main goal of the present study is the evaluation of the plasmatic TH and resulting AFP concentrations in Atlantic wolffish at different stages of development and exposed to different temperature regimes, in order to assess the potential of that species for farming in sea-cages and production diversification.

3.3 Material and methods

3.3.1 Specimen provenance and experimental set-up

Juvenile Atlantic wolffishes used in this study were obtained from egg masses collected by professional divers in shallow waters (5-15 m) of Conception Bay (Newfoundland, Canada) (Fig. 1), in 1999 and 2000. Fish rearing and experiments were conducted at the Centre Aquacole Marin facilities (Grande-Rivière, Québec, Canada). The experiment was initiated when the youngest fishes had grown large enough to enable sufficient blood sampling (1 ml). Mean juvenile weight at the beginning of the experiment were 70.71 ± 11.37 g for the 1+ and 306.81 ± 40.48 g for the 2+ fish.

To achieve a more complete picture of a possible age effect on AFP synthesis, our results were compared to data obtained from a previous study on adult Atlantic wolffish, submitted to the same experimental conditions (Desjardins et al., in prep.). Those latter fishes were caught on the Beaugé Bank (St. Lawrence Gulf, Québec), which is located near 50th parallel, like Conception Bay. Both locations are exposed to the cold Labrador Current influence (Fig. 1) and are covered with ice during most of the winter (El-Sabh and Silverberg, 1990; Drinkwater et al., 1999).

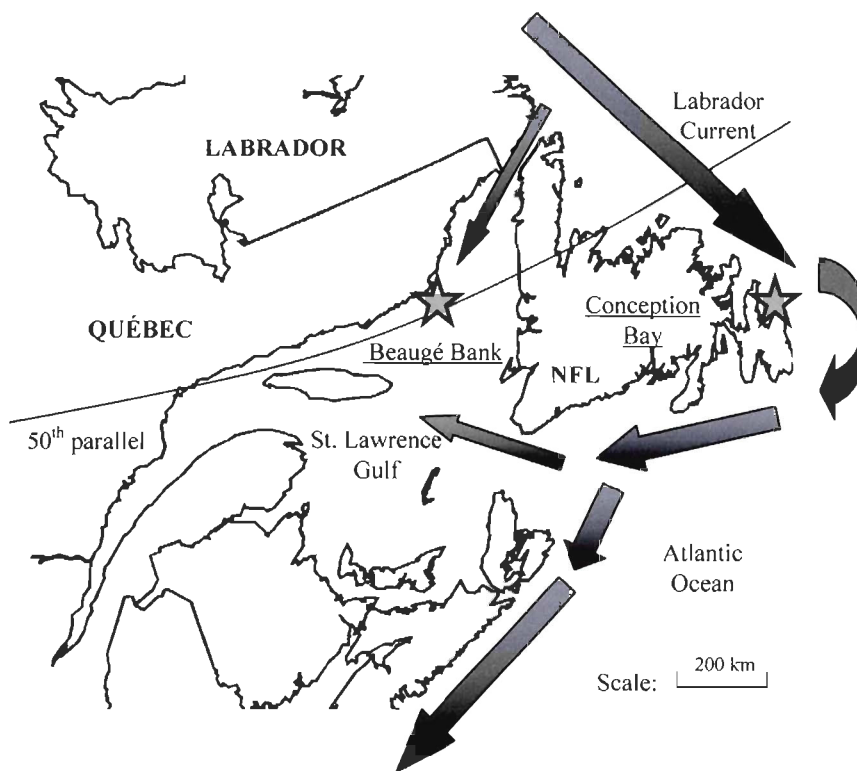


Figure 1. Specimen location; egg masses were harvested in shallow waters of Conception Bay (Newfoundland) and adult specimens used in our previous study (Desjardins et al., in prep.) were caught on the Beaugé Bank (North Shore of St. Lawrence Gulf, Québec).

The experimental set-up consisted of two groups of circulating tanks held at different temperature regimes, each supplied with natural seawater. Each group comprised four circular tanks occupied by 100 juvenile fishes of each age class (in replicates). One group of tanks was submitted to a year-round stable warm thermal environment (fixed temperature – FT, 9.0-12.0°C) and the other was exposed to seasonal temperature fluctuations (ST, -0.2 to 10.0°C). Fish were allowed to acclimatize to their respective thermal environment from October to February, with the first sampling taking place in March. Natural photoperiod (8L/16D to 14L/10D) was applied to all groups. Oxygenation level (80-100 %) and salinity (27-30‰) were

monitored daily and photoperiod adjusted weekly. Fish were fed optimal rations every two days with a commercial food.

3.3.2 Blood sampling and anatomical measurements

Following anaesthesia in benzocaine (50 mg/L), fishes were measured, weighed then blood (1 ml) was sampled from the caudal vein using 1 cc heparinized (lithium heparin) syringues (20 G 1" needles) on a monthly basis, in duplica of five individuals per tank, from March 2002 to February 2003 (except for August). Heparinized 1.5 ml microtubes were used to store the harvested blood. The blood cells were separated from the plasma by centrifugation at 4000 g for 10 min at 4°C. The plasma was transferred to new 1.5 ml test tubes and stored at -80°C until analysis. After blood sampling, fish were killed by a blow on the head and the liver dissected and weighed.

3.3.3 Plasmatic parameters evaluation

3.3.3.1 Thermal hysteresis, colligative contribution of osmolytes and freezing point

Thermal hysteresis (TH) of wolffish plasma samples was evaluated with a freezing point nanoliter osmometer (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) mounted on a compound microscope (x 100), according to the method of Kao et al. (1986). Samples were run in triplicates and deionised water was used as a blank to correct for the background error of the osmometer (Ewart et al., 2000). Presence of AFP was determined quantitatively (TH measurements) and qualitatively (crystal morphology), as previously described in Desjardins et al. (in prep.). The plasmatic melting point (MP) represents the colligative contribution of osmolytes to the plasma freezing point

depression. Because the osmometer gives concentration values (mOsm/kg), those data were converted in temperature values (°C), since 1000 mOsm/kg depresses the freezing point of a solution of 1.86°C. Thermal hysteresis was obtained from the difference between the freezing and melting points.

3.3.3.2 AFP concentrations

AFP concentrations in Atlantic wolffish were estimated from a standard curve obtained from the thermal hysteresis of samples of known AFP concentrations (Type III AFP from Ocean pout, A/F Protein Canada Inc.) (Fig. 2). Lyophilized AFP were resuspended in a buffer solution (ammonium bicarbonate 0.1 M) containing NaCl (180 mM). The curve yielded the following equation: $y = 0.298x^{0.479}$ (Fig. 2). Plasmatic AFP concentrations of individual wolffish plasma samples were then estimated from their respective TH using this equation.

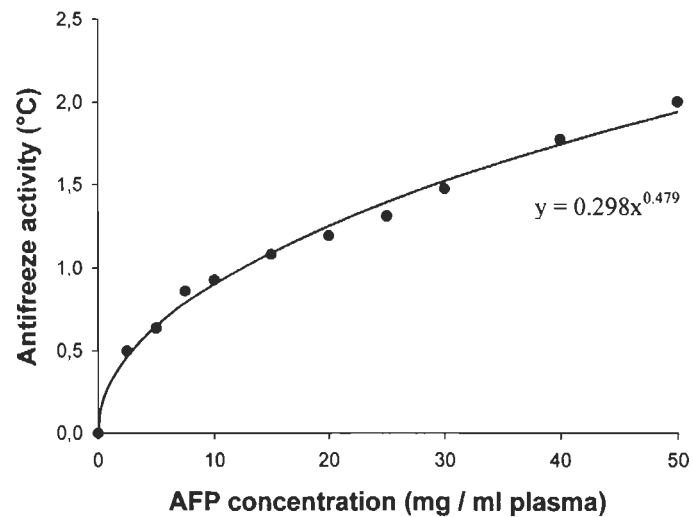


Figure 2. Thermal hysteresis (°C) from solutions of known AFP concentrations (mg/ml plasma).

3.3.4 Fish condition

To evaluate the physiological status of the fish, hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) were calculated using the following equations (Busacker et al., 1990):

$$\text{HSI} = (\text{liver weight} / \text{total fish weight}) \times 100$$

$$\text{K} = (\text{total fish weight} / \text{fish length}^3) \times 100$$

3.3.5 Statistical analysis

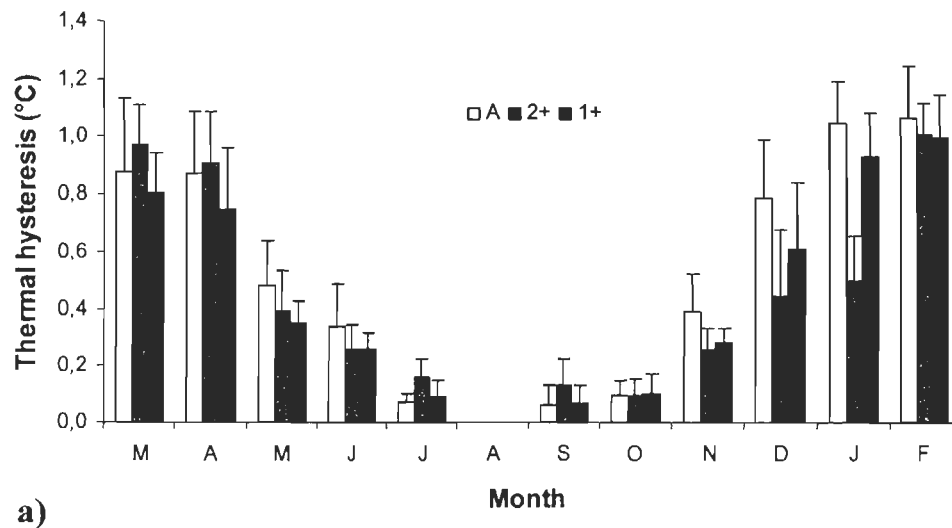
Low sample size ($n = 10$) and non-normality within group value distributions precluded the use of parametric tests between individual samples. Non-parametric Mann-Whitney tests were chosen to compare the variables, in order to ensure homogeneity between replicates before pooling. Level of significance was fixed at $p \leq 0.05$. Principal Components Analysis (PCA) was used to verify for the presence and type of interactions among the variables in each age class, *i.e.* seawater temperature (SWT), colligative contribution of osmolytes represented as the melting point (MP), thermal hysteresis (TH), liver weight (LW) and hepasomatic index (HSI). The strength of the relation among the most closely related variables against TH was then evaluated with Pearson correlation coefficient tests (following compilation of monthly data, annual data showed a normal distribution, $n = 110$). Correlation tests were also conducted monthly. A Spearman test was then chosen, since sample size was brought back to 10 individuals per experimental group. All statistical analyses were performed using Systat 10.2 software (SPSS Inc., 1998).

3.4 Results

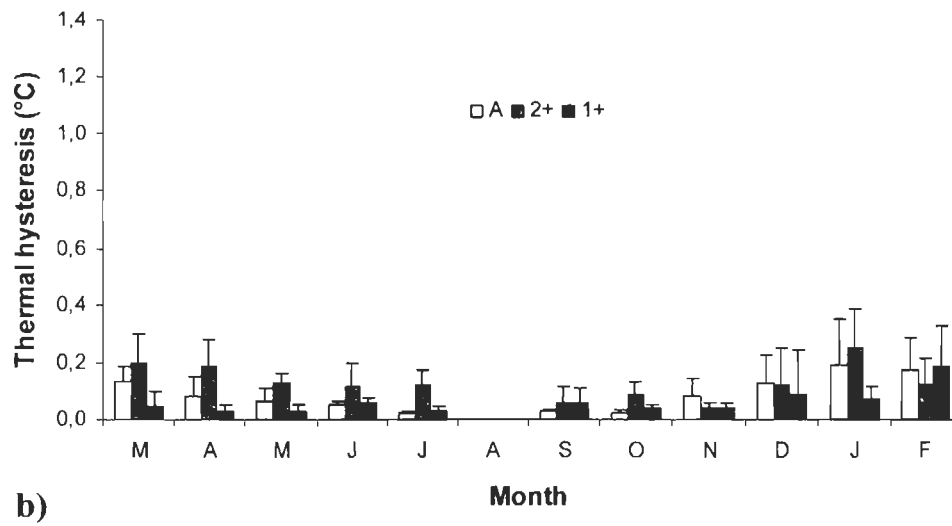
3.4.1 Mean plasmatic response profiles

3.4.1.1 Thermal hysteresis

The presence of AFP was visually detected in all individual fish from both thermal experimental treatments, even in cases when thermal hysteresis (TH) could not be quantified ($< 0.1^{\circ}\text{C}$). Maximum values (attained in February) for fishes exposed to the seasonal temperature (ST) were of 1.06 ± 0.18 , 1.01 ± 0.11 and $1.00 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ for adult, 2+ and 1+ fish, respectively (Fig. 3 a). These values were similar among age classes, even if the intensity of the antifreeze response first differed. The highest TH coincided with the lowest experimental temperature reached during the year (-0.2°C , in February). Mean TH was inversely correlated with seasonal seawater temperature (Fig. 4 a), with R^2 values of -0.78, -0.88 and -0.90 in ST exposed 2+, 1+ and adult Atlantic wolffish, respectively (Table 1). Summer TH values were very low, with a difference of approximately 1.00°C compared to winter TH values. High interindividual differences were observed within each age classe (Fig. 3 a).



a)



b)

Figure 3. Mean seasonal profiles of plasmatic thermal hysteresis (TH) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) at ST a) and FT b) against mean experimental seawater temperature (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature)

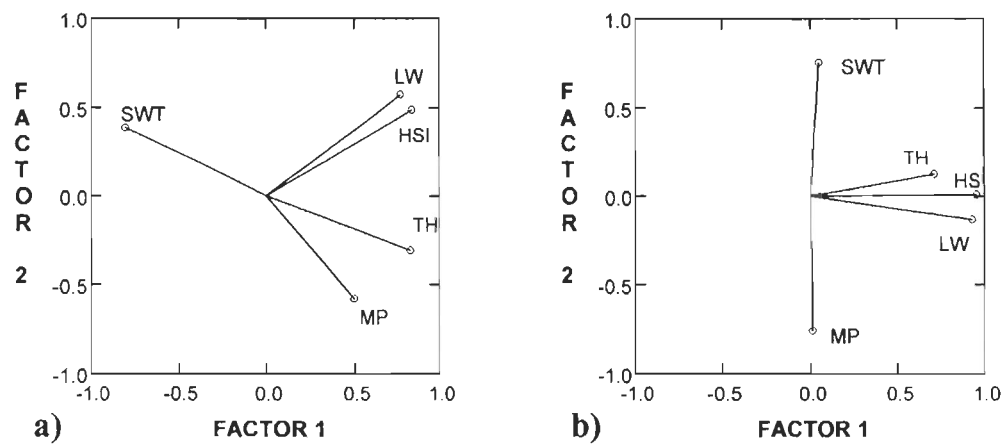


Figure 4. Principal Component Analysis testing the correlation among plasmatic variables (thermal hysteresis [TH] and colligative contribution of osmolytes, expressed as the melting point [MP]), seawater temperature (SWT), liver weight (LW) and hepatosomatic index (HSI) in 2+ Atlantic wolffish at a) ST (ST: seasonal temperature), and b) FT (FT: 10°C fixed temperature).

Table 1. Pearson correlation coefficient values obtained among seawater temperature (SWT), thermal hysteresis (TH), colligative contribution of osmolytes expressed as the melting point (MP) and hepatosomatic index (HSI) in Atlantic wolffish during a full seasonal cycle (age 1+, 2+ and adult [A]) (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data originate from Desjardins et al., in prep.).

Correlation	Age					
	A		2+		1+	
	ST	FT	ST	FT	ST	FT
SWT x TH	-0.90	-0.21	-0.78	0.03	-0.88	-0.28
SWT x MP	-0.53	0.24	-0.41	-0.14	-0.20	-0.13
SWT x HSI	----	----	-0.46	---	-0.53	----
HSI x TH	----	----	0.52	0.41	0.47	0.49

Interestingly, a slight elevation of TH occurred during the winter months compared with the summer period in fish kept at the fixed temperature (FT) of 10°C (Fig 3 b). However, these TH values were much lower compared with those obtained from the ST group. Maximum mean values were not different (<0.1°C difference) among age classes (reached in January for adults and 2+ juveniles and in February for juveniles 1+) and substantial interindividual differences was still observed (Fig. 3 b).

3.4.1.2 Colligative contribution of osmolytes and freezing point

The seasonal fluctuations of plasmatic osmolyte concentrations did not follow a clear temperature-related pattern and were weak compared to TH variations. The mean colligative contribution of osmolytes to the freezing point (FP) depression approximated 0.7°C year-round (Table 2-3). That contribution was given by the melting point (MP) of plasma. There was little difference between mean summer and winter values (approximately 0.1°C) in all age classes exposed to the ST treatment (Table 2). A weak inverse relationship between MP levels and seawater temperature was observed in that group, as showed by the PCA (Fig. 4, a) and Pearson correlation coefficients (R^2 values of -0.53, -0.41 and -0.20 in adult, 2+ and 1+ fish, respectively). For fish constantly exposed to 10°C, colligative contribution of osmolytes to the lowering of plasma freezing points was stable and remained low (Table 3).

The freezing point depression variations were strongly related to fluctuations in TH levels, due to the relative stable protection levels given by plasmatic osmolytes. Adult, 2+ and 1+ Atlantic wolffish exposed to ST displayed maximum mean freezing point depression (attained in February) of 1.80 ± 0.20 , 1.71 ± 0.15 and 1.76 ± 0.21 °C,

respectively (Table 2), which is approximately 1.0°C higher in comparison with summer values. In fish exposed to the 10°C FT treatment, winter values were in the range of 0.9°C, approximately 0.2°C higher than during the summer (Table 3).

Table 2. Mean seasonal seawater temperature (SW), colligative contribution of plasmatic osmolytes Expressed as the melting point (MP), total estimated plasmatic freezing point (FP) and condition factor (K) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) exposed to seasonal temperature treatment (ST) and photoperiod (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Age	Month	SWT (°C)	MP (°C)	FP (°C)	HSI	K
A	M	-0.20	0.77 ± 0.04	-1.65 ± 0.30	----	0.92 ± 0.08
	A	0.40	0.71 ± 0.02	-1.59 ± 0.23	----	0.99 ± 0.29
	M	4.40	0.72 ± 0.02	-1.21 ± 0.16	----	0.97 ± 0.07
	J	9.30	0.60 ± 0.08	-0.94 ± 0.22	----	0.86 ± 0.08
	J	10.70	0.67 ± 0.03	-0.74 ± 0.03	----	0.94 ± 0.27
	A	----	----	----	----	----
	S	10.60	0.70 ± 0.04	-0.76 ± 0.09	----	0.91 ± 0.08
	O	10.20	0.64 ± 0.02	-0.74 ± 0.04	----	0.94 ± 0.11
	N	4.30	0.67 ± 0.04	-1.05 ± 0.16	----	0.95 ± 0.10
	D	1.30	0.71 ± 0.03	-1.50 ± 0.22	----	0.93 ± 0.09
	J	-0.10	0.70 ± 0.05	-1.75 ± 0.17	----	0.93 ± 0.09
	F	-0.20	0.73 ± 0.02	-1.80 ± 0.20	----	0.92 ± 0.09
2+	M	-0.25	0.76 ± 0.01	-1.72 ± 0.14	3.06 ± 0.80	0.88 ± 0.08
	A	0.70	0.71 ± 0.03	-1.62 ± 0.20	2.60 ± 0.42	0.84 ± 0.04
	M	4.50	0.74 ± 0.02	-1.13 ± 0.16	2.69 ± 0.55	0.85 ± 0.07
	J	9.60	0.76 ± 0.04	-1.02 ± 0.08	1.85 ± 0.35	0.81 ± 0.06
	J	10.00	0.68 ± 0.02	-0.84 ± 0.08	1.89 ± 0.44	0.89 ± 0.10
	A	----	----	----	----	----
	S	10.00	0.60 ± 0.02	-0.74 ± 0.10	2.60 ± 0.62	0.88 ± 0.07
	O	9.20	0.68 ± 0.02	-0.78 ± 0.06	2.34 ± 0.46	0.85 ± 0.05
	N	3.70	0.73 ± 0.06	-0.99 ± 0.06	3.00 ± 0.71	0.84 ± 0.07
	D	1.30	0.72 ± 0.06	-1.17 ± 0.27	2.68 ± 0.88	0.85 ± 0.07
	J	-0.10	0.76 ± 0.03	-1.26 ± 0.16	2.69 ± 0.59	0.78 ± 0.04
	F	-0.20	0.75 ± 0.14	-1.76 ± 0.21	3.75 ± 1.21	0.83 ± 0.08
1+	M	-0.10	0.75 ± 0.03	-1.56 ± 0.13	2.84 ± 0.31	0.69 ± 0.03
	A	0.75	0.69 ± 0.03	-1.44 ± 0.23	2.34 ± 0.54	0.70 ± 0.07
	M	4.60	0.70 ± 0.04	-1.06 ± 0.10	2.05 ± 0.32	0.72 ± 0.09
	J	9.35	0.73 ± 0.12	-0.97 ± 0.17	1.49 ± 0.20	0.68 ± 0.04
	J	10.00	0.68 ± 0.05	-0.76 ± 0.08	1.39 ± 0.23	0.65 ± 0.05
	A	----	----	----	----	----
	S	10.00	0.70 ± 0.15	-0.77 ± 0.16	2.75 ± 0.42	0.76 ± 0.07
	O	9.20	0.68 ± 0.02	-0.78 ± 0.07	2.98 ± 1.05	0.78 ± 0.07
	N	3.70	0.70 ± 0.03	-0.98 ± 0.07	3.59 ± 0.77	0.82 ± 0.20
	D	1,30	0.76 ± 0.03	-1.50 ± 0.33	3.61 ± 0.61	0.83 ± 0.07
	J	-0.10	0.75 ± 0.03	-1.68 ± 0.16	3.84 ± 0.48	0.83 ± 0.07
	F	-0.20	0.71 ± 0.01	-1.71 ± 0.15	3.59 ± 0.57	0.78 ± 0.09

Table 3. Mean seawater temperature (SWT), colligative contribution of plasmatic osmolytes expressed as the melting point (MP), total estimated plasmatic freezing point (FP) and condition factor (K) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) exposed to 10°C fixed temperature treatment (FT) and seasonal photoperiod (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Age	Month	SWT (°C)	MP (°C)	FP (°C)	HSI	K
A	M	10.60	0.65 ± 0.03	-0.79 ± 0.04	----	0.90 ± 0.12
	A	11.80	0.65 ± 0.02	-0.73 ± 0.08	----	1.00 ± 0.12
	M	11.70	0.72 ± 0.02	-0.78 ± 0.04	----	1.02 ± 0.14
	J	9.30	0.61 ± 0.04	-0.66 ± 0.05	----	0.99 ± 0.14
	J	10.70	0.62 ± 0.03	-0.65 ± 0.02	----	0.98 ± 0.12
	A	----	----	----	----	----
	S	10.70	0.70 ± 0.03	-0.73 ± 0.04	----	0.97 ± 0.23
	O	10.20	0.68 ± 0.01	-0.71 ± 0.01	----	1.05 ± 0.13
	N	9.90	0.67 ± 0.01	-0.75 ± 0.07	----	1.09 ± 0.16
	D	8.90	0.66 ± 0.02	-0.78 ± 0.11	----	1.03 ± 0.10
	J	9.80	0.67 ± 0.02	-0.86 ± 0.16	----	1.02 ± 0.10
	F	9.80	0.69 ± 0.02	-0.86 ± 0.10	----	1.02 ± 0.11
	2+	M	9.45	0.66 ± 0.03	-0.87 ± 0.10	2.50 ± 0.85
A		11.15	0.64 ± 0.06	-0.83 ± 0.11	2.50 ± 0.64	0.80 ± 0.08
M		11.0	0.72 ± 0.02	-0.85 ± 0.03	2.52 ± 0.51	0.80 ± 0.07
J		9.05	0.75 ± 0.08	-0.86 ± 0.11	1.92 ± 0.60	0.82 ± 0.12
J		10.20	0.64 ± 0.03	-0.76 ± 0.07	1.69 ± 0.36	0.81 ± 0.08
A		----	----	----	----	----
S		10.30	0.70 ± 0.03	-0.76 ± 0.08	1.79 ± 0.44	0.80 ± 0.06
O		9.70	0.68 ± 0.03	-0.76 ± 0.07	1.89 ± 0.64	0.74 ± 0.07
N		9.90	0.66 ± 0.02	-0.70 ± 0.04	1.68 ± 0.51	0.72 ± 0.07
D		9.10	0.65 ± 0.01	-0.77 ± 0.14	1.87 ± 0.60	0.77 ± 0.05
J		9.80	0.67 ± 0.02	-0.92 ± 0.15	2.60 ± 0.60	0.81 ± 0.10
F		9.45	0.70 ± 0.03	-0.83 ± 0.10	2.50 ± 0.82	0.78 ± 0.07
1+		M	9.45	0.67 ± 0.06	-0.72 ± 0.07	1.88 ± 0.53
	A	11.15	0.66 ± 0.04	-0.69 ± 0.04	1.96 ± 0.41	0.75 ± 0.06
	M	11.00	0.71 ± 0.05	-0.74 ± 0.06	1.98 ± 0.29	0.69 ± 0.05
	J	9.10	0.73 ± 0.04	-0.79 ± 0.04	1.93 ± 0.41	0.73 ± 0.14
	J	10.15	0.63 ± 0.02	-0.67 ± 0.03	1.66 ± 0.55	0.65 ± 0.15
	A	----	----	----	----	----
	S	10.30	0.70 ± 0.03	-0.75 ± 0.07	2.08 ± 0.48	0.71 ± 0.06
	O	9.70	0.68 ± 0.02	-0.72 ± 0.03	2.05 ± 0.43	0.73 ± 0.10
	N	9.90	0.67 ± 0.03	-0.71 ± 0.05	2.51 ± 0.52	0.72 ± 0.08
	D	9.00	0.67 ± 0.04	-0.76 ± 0.17	2.90 ± 0.96	0.78 ± 0.09
	J	9.70	0.68 ± 0.03	-0.75 ± 0.06	3.06 ± 0.61	0.76 ± 0.06
	F	9.35	0.71 ± 0.02	-0.90 ± 0.15	3.58 ± 0.67	0.82 ± 0.06

3.4.1.3 Plasmatic AFP concentrations

In groups exposed to ST, mean maximum plasmatic AFP concentrations (14.66 ± 4.54 , 12.84 ± 2.93 and 12.73 ± 3.71 mg/ml) were attained in February for adult, 2+ and 1+ fish, respectively (Table 4). General summer concentrations were lower than 0.3 mg/ml. In age groups acclimatized to the 10°C FT, maximal winter plasmatic AFP levels were always under 1 mg/ml).

Table 4. Mean maximum (February) plasmatic AFP concentrations (mg/ml) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult) (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data were calculated from data from Desjardins et al., in prep).

Treatment	Age		
	A	2+	1+
ST	14.66 ± 4.54	12.84 ± 2.92	12.73 ± 3.71
FT	0.66 ± 0.92	0.88 ± 0.90	0.60 ± 0.67

3.4.2 Fish condition

Mean hepatosomatic index (HSI) values increased from summer to winter in all juvenile groups (no values available for adults) from both thermal treatments, whereas mean condition factor (K) displayed no visible seasonal cycle (Table 2-3). The overall annual K values were related to age in all groups, adult wolffish displaying the best condition and 1+ juveniles, the least. HSI attained maximum values between 2.5-3.5 % and minimum values, between 1.5-2.0 % and, and like liver weight (LW), was inversely correlated with seasonal seawater temperature. In addition, HIS was positively correlated with TH in juveniles of all groups with R² values of 0.52 and 0.47 in ST 2+

and 1+ fish, and of 0.41 and 0.49 in FT 2+ and 1+ fish, respectively (Table 1). It appears that HSI is the most closely linked variable to TH (together with LW) for fishes acclimatized to FT, according to the PCA in 2+ wolffish (Fig. 4 b). However, in a given age group at a given time (December, January and February), no differences in AFP synthesis level among individual fish could have been attributed to differences in K, HSI or length (L), whatever the thermal regime experienced (Table 5).

Table 5. Spearman correlation coefficient values obtained from condition factor (K), hepatosomatic index (HSI) and length (L) against thermal hysteresis (TH) in Atlantic wolffish (age 1+, 2+ and adult [A]) in December, January and February (ST: seasonal temperature; FT: 10°C fixed temperature) (adult fish data are from Desjardins et al., in prep.).

Correlation	Month	Age					
		A		2+		1+	
		ST	FT	ST	FT	ST	FT
K x TH	December	-0.67	0.46	0.71	0.82	0.68	0.57
	January	-0.79	0.70	0.70	0.26	0.27	0.07
	February	-0.79	-1.00	0.71	0.21	0.47	0.30
HSI x TH	December	----	----	0.67	0.41	0.29	0.49
	January	----	----	0.57	-0.01	0.27	0.64
	February	----	----	0.67	0.85	0.43	0.24
L x TH	December	0.19	0.72	0.46	-0.10	0.43	0.44
	January	-0.05	0.50	0.33	0.01	0.27	0.30
	February	-0.07	0.40	0.81	-0.26	-0.20	-0.18

3.5 Discussion

3.5.1 Plasmatic freezing point and thermal hysteresis

The Eastern part of St. Lawrence Gulf and East coast of Newfoundland are both influenced by the cold Labrador Current (Fig. 1) and ice-covered during winter (El-Sabh and Silverberg, 1990; Drinkwater et al., 1999), with the seawater freezing at a minimum of -1.7°C in these regions (maximal salinity: 32 ppt; DFO, 2005).

In north eastern Atlantic wolffish populations, expression of efficient antifreeze protection seems thus essential for survival in shallow waters, as confirmed by the high thermal hysteresis (TH) levels measured during winter in wolffish groups acclimatized to seasonal temperature (ST). Maximum TH values, reached in February, were similar among the three age classes investigated (Fig. 3 a). At the minimal experimental temperature reached (-0.2°C , Table 1), their highest estimated mean freezing point was exceeding that of seawater in their respective environment of origin (-1.7°C). Such results (high TH values and similar among age classes) are in accordance with the trend observed in *Zoarcoidei* (Fletcher et al., 1985; Fletcher, unpublished results; Sorensen and Ramlov, 2001, 2002) and demonstrate that the extreme conditions encountered in this environment result in the obligatory maintenance of optimal antifreeze protection levels in Atlantic wolffish. This suggests that this species could be grown in sea-cages year-round from the juvenile stage without any detrimental effects.

The fact that the antifreeze response is similar among age classes have additional interest since the 1+ and 2+ wolffishes, in contrast with the adults which were caught in

the wild, were raised from hatching in warm water and exposed to a prolonged photoperiod in captivity. In their study comparing cultured and wild Atlantic cod populations, Purchase et al. (2001) also found that AFP synthesis in cold seawater was similar among all populations studied, independently of the previous thermal history of the fish. Moreover, it appears that the mechanism bringing to antifreeze protection can be quickly upregulated since juveniles which were placed in experimental seasonal fluctuation conditions in October 2001 did not show any mortality or apparent condition deterioration throughout the experiment.

Depending on species, AFP can be produced in relatively high concentrations (maximum estimated of 20-30 mg/ml plasma; Duman et al., 1993) and have to be constantly renewed because of loss through urine excretion (Fletcher et al., 1989b). Since that biochemical response likely occupies a significant proportion of the energetic budget of the fish (Wöhrmann, 1997), tight adjustment of synthesis seems the most parsimonious strategy to adopt. Considering such energetic constraints, Atlantic wolffish unexpectedly displays low TH during summer. This modest AFP supply could however confer other advantages to the fish, such as protection of cellular membranes through conservation of their structural integrity (reviewed in Tomczak and Crowe, 2002) in the relatively cold summer waters. Other possible explanations for that residual summer TH could also be a lack in the ability to stop AFP synthesis (as suggested by Fletcher et al., 1985) or to fully catabolyze the protein when not required.

Adult and juvenile Atlantic wolffish maximum winter TH levels attained in our experimental conditions (approximately 1.0°C) were similar to those reported for the common eelpout (approximately 1.2°C; Sorensen and Ramlov, 2001) and the ocean

pout (approximately 1.0°C; Fletcher et al., 1985), which are among the best AFP producers reported among temperate fishes. Both species, including A. lupus, share sedentary behaviours and inhabit shallow waters during their whole life cycle (Whitehead et al., 1986; Scott and Scott, 1988). Such observations are in accordance with previous hypothesis stating that plasmatic TH was inversely correlated with depth of occurrence (Goddard and Fletcher, 2002) and that a sluggish mode of life allows highest AFP synthesis through reduced energy expenditures (Wöhrmann, 1997), compared to more active species.

Important interindividual variations in TH were observed among Atlantic wolffishes of all age classes. Interestingly, this variability was similar among juvenile individuals from the same shallow zone (Conception Bay). In most species studied to date (reviewed in Goddard and Fletcher, 2002), the level of antifreeze protection seemed to be rather uniform within a given population, at the exception of the sea raven (Hemitripteris americanus). Fletcher et al. (1984) reported important TH heterogeneity (as high as approximately 0.7°C) and hypothesised that those fishes seems not to need intense antifreeze protection, resulting in a relaxed selective pressure for that trait in a less extreme environment. However, young wolffishes from eastern Newfoundland (age 1+ and 2+) were collected as egg masses in very shallow waters (5-15 m), where the intrusion of sea-ice was quite likely following hatching, which occurs in December in that region (Keats et al., 1985). The fact that the larvae are pelagic during their first days of life (Brown et al., 1997) rises the risk to encounter suspended ice nucleators. Moreover, optimal levels of protection were apparently not attained in the present experimental context, since the minimal temperature reached was only -0.2°C. We

suggest two explanations for TH variations: 1) the range of recorded TH covers the requirement encountered in nature when facing the coldest conditions and 2) wolffish could adopt different migration strategies, linked to their respective level of AFP production (existence of migrants and non-migrants in the same population). Genetic studies of the population structure in eastern Canada could reveal if a relationship between AFP expression levels and migration strategies exist. If such genetic heterogeneity is proven to be an intrinsic property of wolffish populations, a selection program could be planned in order to increase AFP production in domestic populations, in order to improve the yield of AFP following extraction and purification activities.

Decreasing seawater temperature caused an elevation of TH. As observed in a previous study (Desjardins et al., in prep.), TH have still slightly increased in the 10°C fixed temperature (FT) groups, which suggest that photoperiod (more precisely, the decrease in day length) could be the signal required for the onset of plasmatic AFP production intensification in wolffish and possibly other Zoarcoidei (Desjardins et al., in prep.). In such a scenario, the stability (turnover rate) and elimination rate of the AFP and its mRNA would be temperature-dependant. In a further study, it would be relevant to measure the influence of photoperiod separately, as well as the effect of both lower temperature and photoperiod on plasmatic TH.

3.5.2 Plasmatic AFP concentrations

Considering its high antifreeze protection capacities (Table 1), Atlantic wolffish cultivation appears very promising for extraction-purification activities. A North American company, A/F Protein, is actually the only distributor of AFP extracted from

fish. Their lyophilized purified AFP is worth 5000 US\$/g and the company purchase a good quality plasma for 500 US\$/l. Profitable use of farmed fish productions for plasma extraction could be expected. In case of terrestrial farming operations, compromises should be observed between the temperatures needed for optimal growth and AFP synthesis (shorter exposition time to cold temperatures).

The maximal plasmatic winter AFP concentration found in Atlantic wolffish was of approximately 15 mg/ml, compared with 25 mg/ml in ocean pout (Fletcher et al., 1985). Despite such a difference, the TH values obtained from both species were similar (approximately 1.00°C), which could suggest an apparent higher specific activity for wolffish AFP. However, previous study highlighted high structure conservation of type III AFP among *Zoarcoidei* (Schrag et al., 1987; Shears et al., 1993), which implies high functional similitude, and recent work from Evans (2003) showed however that the presence of physiological salt concentrations in the resuspension buffer increased the activity of lyophilised AFP. In contrast with Fletcher et al. (1985), we added NaCl to the standard AFP solutions used to obtain the standard curve relating TH to AFP concentrations. The observed difference between ocean pout and Atlantic wolffish AFP concentrations could then be partly explained by this procedure, which could have lead to an underestimation of our concentration values compared with those from previous studies.

3.5.3 Hepatosomatic index and condition factor

Since juveniles from the same egg mass displayed high TH variability, comparison were made with condition factor (K), hepatosomatic index (HSI) and length

(L) to evaluate if this variation was related to the physiological status of fish at a given time (Table 5). No clear trend could be established. Other factors than temperature, HIS, K or photoperiod could then be implied in the observed TH individual variations. For example, gene copy number has been shown to be directly associated with the intensity of TH measured in marine fish plasma (Hew et al., 1988). Such phenotypic variability in the population could also be linked to variability in the regulation of gene expression.

During the experimental period and whatever the thermal regime experienced, fish were observed to be in excellent condition, displaying high K values (Table 1-2). They remained active year-round and were observed to feed at the coldest temperatures. Seasonal fluctuations were however observed in HSI. In fish, liver volume decreases principally during sexual product maturation and/or non-feeding events. For example, Atlantic cod displays highest HSI values when recovering from spawning (which takes place during early summer), after which HSI gradually decreases until the next summer (Lambert and Dutil, 1997). However, in wolffish, the HSI was still increasing during winter and peaked in February (inversely related to temperature), when no reproductive event is likely (Atlantic wolffish spawns during late fall/early winter; Keats et al., 1985). Moreover, most juveniles investigated were immature (below 0.5 kg; Moksness, 1994).

Apparently, liver hypertrophy is a common fish acclimation to cold temperatures (Hazel, 1993). However, the observation of high HSI values in wolffish exposed to the stable 10°C treatment argues for an impact of photoperiod rather than temperature on

liver size modulation. An interesting hypothesis is that HSI elevation could be linked to the onset of AFP production intensification through photoperiod action. Actually, these two factors were closely related in the PCA from the 10°C acclimatized 2+ fishes (Fig. 4). The liver has been reported to be the chief AFP producing organ for exportation in the blood stream (Fletcher et al., 1998). Its enlargement could provide higher AFP plasmatic concentrations to be attained in wolffish through an elevated number of larger productive units (*i.e.* hepatocytes). It would be interesting to verify if such photoperiod-induced liver hypertrophy would be sufficient to develop effective antifreeze protection, or if cellular metabolic adjustments are also needed to optimise the performance of individual hepatocytes at low temperatures.

In conclusion, our results confirmed Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) as a highly efficient plasmatic AFP producer and a good candidate species for cage mariculture in periodically icy waters and for potential AFP extraction activities. Most species surveyed for that trait before in mariculture (Fletcher et al., 1997; Ewart et al., 2000; Desjardins et al., in prep.) never reached such a high antifreeze protection level. The plasmatic AFP concentrations were remarkably similar among age classes and the integrity of antifreeze response was always conserved, whatever the thermal treatment experienced from hatching. That could allow Atlantic wolffish to be transferred in sea-cages from its first year without any detrimental effect, independently of the previous thermal history experienced by the fish. The observation of important interindividual variations in TH could suggest an efficient genetic selection program aimed at the optimisation of AFP production in that species.

Temperature and photoperiod had a marked effect on plasmatic TH and corresponding AFP concentrations. Photoperiod probably acts as a signal for the onset of higher AFP production while decrease in temperature seems necessary for the retention of high AFP concentrations in the plasma. The observation of liver hypertrophy following decrease of photoperiod could positively link the relative liver weight to the plasmatic AFP concentrations, through the number and/or size of producing hepatocytes. Since it is probable that maximum AFP concentrations have not been reached in Atlantic wolffish during the present study, it could be interesting to test the impact of lower temperatures on the antifreeze response and modulation.

CHAPITRE 4

4.1 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'émergence d'une industrie maricole alliée à un essor des biotechnologies marines pourrait profiter aux économies chancelantes caractérisant les régions de l'Est québécois, dont le potentiel maricole est encore largement sous-exploité. La désignation récente de ces secteurs d'activité comme axes de développement prioritaires dans ces régions (Côte-Nord, Bas-St-Laurent, Gaspésie, Îles-de-la-Madeleine) stimulent les efforts de recherche et développement (R&D) en ce sens. La présente étude s'inscrit dans ce contexte, par l'évaluation des capacités de synthèse d'une biomolécule d'intérêt biotechnologique, la protéine antigel (PAG), chez le Loup atlantique et le Loup tacheté, deux espèces ciblées pour la mariculture en eaux froides dans l'Atlantique canadien. Pour la première fois, le profil de synthèse des PAG a été étudié sur une base annuelle chez ces espèces. Afin de caractériser les patrons saisonniers de production ainsi que les facteurs biotiques et abiotiques les influençant, des individus adultes des deux espèces ainsi que des juvéniles de Loup atlantique ont été acclimatés à deux régimes thermiques différents, soit un traitement à température saisonnière et un second où la température était fixée à 10°C.

À la lumière des résultats obtenus, il est désormais possible d'affirmer que le Loup atlantique et le Loup tacheté possèdent tous deux la capacité de produire des PAG et ce, à l'année, dans toutes les conditions prévalant lors de cette étude. Néanmoins, le

Loup atlantique est nettement plus performant, tous âges confondus, les niveaux maximum d'hystérèse thermique et de concentrations plasmatiques (atteints en février) étant remarquablement similaires entre les classes d'âges étudiées (hystérèse thermique : 1.06 ± 0.18 [adultes], 1.00 ± 0.15 [1+] et $1.01 \pm 0.11^\circ\text{C}$ [2+], concentrations de PAG : 14.66 ± 4.54 [adultes], 12.73 ± 3.71 [1+] et 12.84 ± 2.92 mg PAG/ml plasma [2+]). Les valeurs maximales atteintes par le point de congélation plasmatique total (-1.80 ± 0.20 [adultes], -1.71 ± 0.15 [1+] et de $-1.76 \pm 0.21^\circ\text{C}$ [2+]) se rapprochaient du point de congélation de l'eau de mer de l'habitat de provenance (-1.7°C ; DFO, 1995), malgré le fait que les températures expérimentales n'aient jamais été abaissées en-dessous de -0.2°C . Ce niveau de protection efficace fait du Loup atlantique un candidat de choix pour l'élevage en cages marines dans des eaux froides sujettes à un couvert de glace hivernal et ouvre la porte à une diversification de production rentable, réalisée par l'extraction et la vente du plasma (nombreuses applications des PAG en biotechnologie). De plus, les résultats démontrent que cette espèce pourrait être transférée en cage marine dès sa première année sans risque de pertes, et ce, peu importe le conditionnement thermique subi précédemment par les poissons. Dans les cas où l'élevage en stations terrestres sera préféré à l'élevage en cages marines, des compromis devront être réalisés dans l'ajustement des températures entre celle où le taux de croissance est optimal et celle où la synthèse de PAG est maximale (par exemple : plus courte exposition à froide température dans le cycle annuel).

La plus grande capacité de protection antigél chez le Loup Atlantique comparativement au Loup tacheté pourrait s'expliquer par les différentes profondeurs

de distribution observables chez ces espèces. Alors que le Loup tacheté ne se rencontre qu'au-dessous de 50 m (où l'intrusion de cristaux de glace en suspension devient plus improbable), le Loup atlantique a fréquemment été signalé en zones côtières jusque sous la limite de balancement des marées (Barsukov, 1959). Plusieurs études ont démontré une relation inversement proportionnelle entre la profondeur de distribution des espèces et leur hystérèse thermique (Wöhrmann, 1997; Goddard et Fletcher, 2002). De plus, la synthèse de PAG est vraisemblablement une opération coûteuse au point de vue métabolique (Wöhrmann, 1997), ce qui pourrait expliquer le délaissement de cette stratégie chez le Loup tacheté. Le fait que des traces de ces protéines soient toujours détectables chez cette espèce permet de supposer que cet abandon partiel est un événement plutôt récent dans son histoire évolutive et/ou que de faibles concentrations revêtent une autre fonction adaptative en eaux froides. La configuration inhabituelle des cristaux formés dans le plasma de Loup tacheté laisse également entrevoir la possibilité d'une altération au niveau de la structure de la PAG elle-même, laquelle pourrait être une preuve supplémentaire du relâchement de la pression sélective pour ce trait. Le fait que la structure des PAG soit fortement conservée entre des espèces plus distantes au sein du sous-ordre (Shears *et coll.*, 1993; Schrag *et coll.*, 1987) vient appuyer cette dernière supposition. Néanmoins, des recherches supplémentaires devront être menées avant de savoir avec certitude si le Loup tacheté se dirige réellement vers une perte définitive de sa capacité de synthèse de PAG.

Il existe une importante hétérogénéité au niveau de l'intensité de synthèse des PAG chez le Loup atlantique, même chez les individus provenant de masses d'œufs récoltées dans le même environnement. L'existence de telles différences au sein d'une

même population n'a été rapportée que chez l'Hémitriptère atlantique (*Hemitripterus americanus*), ce qui avait amené Fletcher *et coll.* (1984) à invoquer une perte de la capacité de synthèse face à la réduction de la pression sélective dans un environnement plus clément. Toutefois, cette explication ne semble pas applicable au Loup atlantique, qui doit faire face à des conditions extrêmes durant la saison hivernale. Deux hypothèses pourraient expliquer une telle situation. Premièrement, les individus produisant moins de PAG ne seraient pas désavantagés dans les conditions naturelles, plus froides que celles obtenues en laboratoire et pouvant vraisemblablement causer le développement d'une plus grande protection antigél. Deuxièmement, des différences comportementales au sein d'une même population à l'approche de l'hiver (individus migrants et non migrants) pourraient être amenées par cette hétérogénéité. Quoi qu'il en soit, l'existence de telles variations interindividuelles au niveau de l'intensité de la protection antigél chez le Loup atlantique et ce, au sein de masses d'oeufs de même provenance (TH maximale et minimale atteintes en février à température saisonnière chez les juvéniles 1+ : 1.24 et 0.67°C, respectivement), pourrait mener à l'établissement d'un programme de sélection génétique visant l'optimisation de ce trait désirable en mariculture.

La température de l'eau est le facteur abiotique le plus déterminant de la physiologie chez les poissons (Brett, 1979), animaux ectothermes. Le profil de synthèse saisonnier de PAG du Loup de mer (particulièrement celui du Loup atlantique) ressemble étroitement à celui de la Loquette d'Amérique. Comme c'est le cas chez cette espèce apparentée, la production de PAG chez le Loup de mer est annuelle et inversement proportionnelle au profil de température saisonnier, ce qui avait amené

Fletcher *et coll.* (1985) à émettre l'hypothèse selon laquelle ce dernier facteur devait être le principal responsable de la modulation de cette réponse physiologique chez la Loquette. Toutefois, l'observation de variations saisonnières au niveau de l'hystérèse thermique chez les loups atlantiques exposés à un régime de température stabilisé à 10°C toute l'année laisse croire que la photopériode puisse également avoir un impact sur ce mécanisme. Selon le scénario le plus vraisemblable, ce facteur agirait comme signal de déclenchement de l'augmentation de l'intensité de synthèse, alors que la température dirigerait principalement le niveau d'accumulation des PAG en agissant sur le taux de dénaturation de la protéine et de son ARNm et/ou au niveau de son taux d'élimination par l'urine. Des travaux supplémentaires devront être consacrés à l'effet de la photopériode seule, afin de vérifier cette hypothèse.

Les données provenant des juvéniles font état d'une élévation de la masse du foie (et par conséquent, de l'indice hépatosomatique) autant chez les poissons suivant le régime de température saisonnier que ceux exposés au traitement fixe à 10°C. Dans tous les cas, cette augmentation du volume hépatique se produit en parallèle avec l'élévation de la synthèse de PAG. Il apparaît donc possible que la photopériode agisse sur l'élévation de la synthèse de PAG par le biais d'une hypertrophie du foie. Les plus faibles concentrations de PAG observées chez les individus maintenus à 10°C s'expliqueraient par un taux d'élimination/dénaturation plus élevé de la protéine, dû à la température relativement importante. Néanmoins, des études ultérieures seront nécessaires afin de vérifier si cette seule augmentation de volume (plus grand nombre d'hépatocytes de plus grande taille) suffit à l'atteinte des concentrations de PAG

optimales ou si cet état s'accompagne d'autres mécanismes physiologiques chez cette espèce, comme des ajustements au niveau du métabolisme hépatique.

4.2 BIBLIOGRAPHIE

A/F Protein Canada Inc. [En ligne]. Adresse URL : <http://www.afprotein.com>.

Albikovskaya, L.K. 1982. « Distribution and abundance of Atlantic wolffish, spotted wolffish and northern wolffish in the Newfoundland area ». **NAFO Scientific Council Studies**, 3, pp.29-32.

Alvial, A.; J. Manríquez. 1999. « Diversification of flatfish culture in Chile ». **Aquaculture**, 176, pp.65-73.

Amir, G.; L. Horowitz; B. Rubinsky; B.S. Yousif; J. Lavee; A.K. Smolinsky. 2004. « Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III ». **Cryobiology**, 48, pp.273-282.

Amir, G.; B. Rubinsky; Y. Kassif; L. Horowitz; A.K. Smolinsky; J. Lavee. 2003. « Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins : an electron microscopy study ». **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, 24, pp.292-297.

Ananthanarayanan, V.S. 1989. « Antifreeze proteins : structural diversity and mechanism of action ». **Life Chemistry Reports**, 7, pp.1-32.

Arav, A.; B. Rubinsky; G. Fletcher; E. Seren. 1993. « Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins ». **Molecular Reproduction and Development**, 36, pp.488-493.

Atıcı, Ö; B. Nalbantoğlu. 2003. « Antifreeze proteins in higher plants ». **Phytochemistry**, 64, pp.1187-1196.

Baardsnes, J.; M.J. Kuiper; P.L. Davies. 2003. « Antifreeze protein dimer : when two ice-binding faces are better than one ». **The Journal of Biological Chemistry**, 278, pp.38942-38947.

Barsukov, V.V. 1959. « The wolffish (*Anarhichadidae*) ». Trudy Zoology Institute of Academic Sciences USSR : **Fishes** 5(5), 173 p. (Traduit pour la Smithsonian Institute and National Science Foundation, Washington, DC, Indian National Scientific Documentation Centre, New Delhi, 1962).

Bindslev-Jensen, C.; E. Sten; L.K. Earl; R.W.R. Crevel; U. Bindslev-Jensen; T.K. Hansen; P. Stahl Skov; L.K. Poulsen. 2003. « Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods ». **Food and Chemical Toxicology**, 41, pp.81-87.

- Brêthes, J.-C. 1995. « Conservation when fisheries collapse : the Canadian Atlantic experience » Dans **Cold-water aquaculture in Atlantic Canada** (Éd.: Boghen, A.D.), 2^{ième} éd. Moncton (N.B., Canada): Institut Canadien de Recherche sur le développement régional. 672 p.
- Brett, J.R. 1979. « Environmental factors and growth ». Dans **Developping and sustaining world fisheries ressources : the state of science and management** (Éds.: Hancock, D.A.; D.C. Smith; A. Grant; J.P., Beumer). Collingwood (Australie): CSIRO. pp. 747-751.
- Brown, D.J.; F.D. Sønnichsen. 2002. « The structure of fish antifreeze proteins ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.109-138.
- Brown, J.A. 1998. « Wolffish aquaculture : where to now ? ». **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, 98, 1, pp.34-35.
- Brown, J.A.; M. Helm; J. Moir. 1995. « New-candidate species for aquaculture ». Dans **Cold-water aquaculture in Atlantic Canada** (Éd.: Boghen, A.D.), 2^{ième} éd. Moncton (N.B., Canada): Institut Canadien de Recherche sur le développement régional. 672 p.
- Brown, J.A.; D. Wiseman; P. Kean. 1997. « The use of behavioural observations in the larviculture of cold-water marine fish ». **Aquaculture**, 155, pp.297-306.
- Burton, R.F. 1986. « Ionic regulation in fish : the influence of acclimation temperature on plasma composition and apparent set points ». **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 85, pp. 219-228.
- Busacker, G.P.; I.R. Adelman; E.M. Goolish. 1990. « Growth ». Dans **Methods for fish biology** (Éd.: Schreck, C.B.; P.B. Moyle). Maryland (É-U): American Fisheries Society. 684 p.
- Chao, H.; C.I. DeLuca; P.L. Davies. 1995. « Mixing antifreeze protein types changes ice crystal morphology without affecting antifreeze activity ». **FEBS Letters**, 357, pp. 183-186.
- Cheng, C.C.-M.; A.L. DeVries. 2002. « Origins and evolution of fish antifreeze proteins ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.83-107.
- Choi, J.S.; K.T. Frank; W.C. Leggett; K. Drinkwater. 2004. « Transition to an alternate state in a continental shelf ecosystem ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 61, pp.505-510.

- Coger, R.; B. Rubinsky; G.L. Fletcher. 1994. « Microscopic pattern of ice crystal growth in the presence of antifreeze proteins ». **Journal of Offshore Mechanic Arctic Engineering ASME Transactions**, 116, pp.173-180.
- Crevel, R.W.R.; J.K. Fedyk; M.J. Spurgeon. 2002. « Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure ». **Food and Chemical Toxicology**, 40, pp.899-903.
- Davies, P.L.; C.L. Hew. 1990. « Biochemistry of fish antifreeze proteins ». **FASEB Journal**, 4, pp.2460-2468.
- Deng, G.; R.A. Laursen. 1998. « Isolation and characterization of an antifreeze protein from the Longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus* ». **Biochimica and Biophysica Acta**, 1388, pp.305-314.
- Departement des Pêches et Océans du Canada. [En ligne]. Adresse URL : <http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/bin/cgi/ocean>
- De Silva, S.S. 2000. « A global perspective of aquaculture in the new millennium ». **Dans Aquaculture in the Third Millenium**. Bangkok (Thaïlande) : NACA. pp.431-459.
- DeVries, A.L. 1971. « Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes ». **Science**, 172, pp.1152-1155.
- DeVries, A.L. 1983. « Antifreeze peptides and glycopeptides in cold water fishes ». **Annual Review of Physiology**, 45, pp.245-260.
- DeVries, A.L. 1988. « The role of antifreeze glycopeptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes ». **Comparative Biochemistry and Physiology**, 90B, pp. 611-621.
- DeVries, A.L.; D.E. Wohlschlag. 1969. « Freezing resistance in some Antarctic fishes ». **Science**, 163, pp.1074-1075.
- Drinkwater, K.F.; R.G. Petitpas; W.M. Petrie. 1999. « Overview of meteorological and sea ice conditions off Eastern Canada during 1998 ». Département des Pêches et Océans de la région des Maritimes, **Document de recherche 99/51**, 28 p.
- Duman, J.G.; V. Bennett; T. Sformo; R. Hochstrasser, B.M. Barnes. 2004. « Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders ». **Journal of insect Physiology**, 50, pp.259-266.
- Duman, J.G.; A.L. DeVries. 1975. « The role of macromolecular antifreeze in cold water fishes ». **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 52, pp.193-199.

- Duman, J.G.; D.W. Wu; T.M. Olsen; M. Urrutia; D. Tursman. 1993. « Thermal hysteresis proteins ». **Advances in Low-Temperature Biology**, 2, pp.131-182.
- Eastman, J.T. 1993. **Antarctic fish biology: Evolution in a unique environment**. New York (USA): Academic Press. 322 p.
- El-Sabh, M.I.; N. Silverberg. 1990. « Oceanography of a large-scale estuarine system : the St-Lawrence ». **Coastal and Estuarine Studies**, 39, pp.1-9.
- Enevoldsen, L.T.; I. Heiner; A.L. DeVries; J.F. Steffensen. 2003. « Does fish from the Disko Bay area of Greenland possess antifreeze proteins during the summer »? **Polar Biology**, 26, pp.365-370.
- Espelid, S. 2002. « Susceptibility of spotted wolffish to infectious diseases and use of immunoprophylaxis ». **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, 102, 2, pp.37-38.
- Evans, R.P. 2003. « **Characterization of skin and plasma type I antifreeze proteins from Atlantic (*Liparis atlanticus*) and Dusky (*Liparis gibbus*) snailfish** ». Thèse de doctorat. St-John's: Memorial University of Newfoundland.
- Evans, R.P.; G.L. Fletcher. 2004. « Isolation and purification of antifreeze proteins from skin tissues of snailfish, cunner and sea raven ». **Biochimica and Biophysica Acta**, 1700, pp.209-217.
- Ewart, K.V.; B. Blanchard; S.C. Johnson; W.L. Bailey; D.J. Martin-Robichaud; M.I. Buzeta. 2000. « Freeze susceptibility in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) ». **Aquaculture**, 188, pp. 91-101.
- Falk-Petersen, I.B.; T.K. Hansen; R. Fieler; L.M. Sunde. 1999. « Cultivation of the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): a new candidate for coldwater fish farming ». **Aquaculture Research**, 30, pp.711-718.
- Falk-Petersen, I.B.; T.K. Hansen. 2001. « Organ differentiation in newly hatched common wolffish ». **Journal of Fish Biology**, 59, pp.1465-1482.
- Feeney, R.F.; Y. Yeh. 1998. « Antifreeze proteins : current status and possible food uses ». **Trends in Food Sciences and Technology**, 9, pp.1-5.
- Fletcher, G.L. 1975. « The effect of capture "stress" and storage of whole blood on the red blood cells, total plasma proteins, glucose and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 53, pp. 197-206.

- Fletcher, G.L. 1977. « Circannual cycles of blood plasma freezing point and Na⁺ and Cl⁻ concentrations in Newfoundland winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) : correlation with water temperature and photoperiod ». **Canadian Journal of Zoology**, 55, pp.789-795.
- Fletcher, G.L. 1981. « Effects of temperature and photoperiod on the plasma freezing point depression, Cl⁻ and protein antifreeze in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 59, pp.193-201.
- Fletcher, G.L.; C.M. Campbell; C.L. Hew. 1978. « The effects of hypophysectomy on seasonal changes in plasma freezing point-depression, protein antifreeze Na⁺ and Cl⁻ concentrations in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 56, pp.109-113.
- Fletcher, G.L.; S.V. Goddard; P.L. Davies; Z. Gong; K.V. Ewart; C.L. Hew. 1998. « New insights into fish antifreeze proteins : physiological significance and molecular regulation ». Dans **Cold Ocean Physiology** (Éds. Portner, H.O.; R. Playle). Cambridge (R.-U.): Cambridge University Press. pp.239-265.
- Fletcher, G.L.; S.V. Goddard; Y. Wu. 1999. « Antifreeze proteins and their genes : from basic research to business opportunity ». **Chemtech**, 30(6), pp.17-28.
- Fletcher, G.L.; C.L. Hew; P.L. Davies. 2001. « Antifreeze proteins of teleost fishes ». **Annual Review of Physiology**, 63, pp.359-390.
- Fletcher, G.L.; C.L. Hew; S.B. Joshi; Y. Wu. 1997b. « Antifreeze polypeptide-expressing microorganisms useful in fermentation and freezing of foods ». **US patent**, 5 676 985.
- Fletcher, G.L.; C.L. Hew; X.M. Li; K. Haya; M.H. Kao. 1985. « Year-round presence of high levels of plasma antifreeze peptides in a temperate fish, ocean pout (*Macrozoarces americanus*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 63, pp.488-493.
- Fletcher, G.L.; D.R. Idler; A. Vaisius; C.L. Hew. 1989a. « Hormonal regulation of AFP gene expression in winter flounder ». **Fish Physiology and Biochemistry**, 7, pp.387-393.
- Fletcher, G.L.; M.H. Kao; J.B. Dempson. 1988. « Lethal freezing temperatures of Arctic char and other salmonids in the presence of ice ». **Aquaculture**, 71, pp.369-378.
- Fletcher, G.L.; M.H. Kao; R.M. Fourny. 1986. « Antifreeze peptides confer freezing resistance to fish ». **Canadian Journal of Zoology**, 64, pp.1897-1901.

- Fletcher, G.L.; M.H. Kao; K. Haya. 1984. « Seasonal and phenotypic variations in plasma protein antifreeze levels in a population of marine fish, sea raven (*Hemitripterus americanus*) ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 41, pp.819-824.
- Fletcher, G.L.; M.J. King; M.H. Kao. 1987. « Low temperature regulation of antifreeze glycopeptide levels in Atlantic cod (*Gadus morhua*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 65, pp.227-233.
- Fletcher, G.L.; M.J. King; M.H. Kao; M.A. Shears. 1989b. « Antifreeze proteins in the urine of marine fish ». **Fish Physiology and Biochemistry**, 6, pp. 121-127.
- Fletcher, G.L.; J.S. Wroblewski; M.M. Hickey; B. Blanchard; M.H. Kao; S.V. Goddard. 1997a. « Freezing resistance of caged Atlantic cod (*Gadus morhua*) during a Newfoundland winter ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 54 (Suppl. 1), pp.94-98.
- Fletcher, G.L.; J.C. Smith. 1980. « Evidence for permanent population differences in the annual cycle of plasma “antifreeze” levels of winter flounder ». **Canadian Journal of Zoology**, 58, pp. 507-512.
- Foss, A.; T.H. Evensen; A.K. Imsland; V. Øiestad. 2001. « Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish ». **Journal of Fish Biology**, 59, pp.416-426.
- Foss, A.; T.H. Evensen; V. Øiestad. 2002. « Effects of hypoxia and hyperoxia on growth and food conversion efficiency in the spotted wolffish *Anarhichas minor* Olafsen ». **Aquaculture Research**, 33, pp.437-444.
- Foss, A.; T.H. Evensen; T. Vollen; V. Øiestad. 2003a. « Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish ». **Aquaculture**, 228, pp.215-224.
- Foss, A.; B.A. Røsnes; V. Øiestad. 2003b. « Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) : effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis ». **Aquaculture**, 220, pp.607-617.
- Fourney, R.M.; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 1984. « The effects of long day length on liver antifreeze messenger RNA in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* ». **Canadian Journal of Zoology**, 62, pp.1456-1460.
- Francis, R.C.; R.D. Elder; J.L. Taylor. 1978. « Why do fisheries collapse » ? Dans Proceedings of the demersal fisheries conference. **Prospects and problems for New Zealand's demersal fisheries**. Wellington (Nouvelle-Zélande) : Ministry of Agriculture and Fisheries. **Occas. Publ. Fish. Res. Div. Minist. Agric. Fish.** (N.Z.), 19, pp.72-74.

- Fyhn, H.J.; R.N. Finn; M. Reith; B. Norberg. 1999. «Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptative evolution of teleost fishes to seawater ». **Sarsia**, 84, pp.451-456.
- Ganz, T.; R.I. Lehrer. 1999. «Antibiotic peptides from higher eukaryotes : biology and applications ». **Molecular Medicine Today**, 5, pp.292-297.
- Goddard, S.V.; G.L. Fletcher. 1994. «Antifreeze proteins: their role in cod survival and distribution from egg to adult ». **ICES Marine Sciences Symposium**, 198, pp.676-683.
- Goddard, S.V.; G.L. Fletcher. 2002. «Physiological ecology of antifreeze proteins : a northern perspective ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.17-60
- Goddard, S.V.; M.H. Kao; G.L. Fletcher. 1992. «Antifreeze production, freeze resistance, and overwintering of juvenile Northern Atlantic cod (*Gadus morhua*) reflect adaptations to overwintering environment ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 49, pp.516-522.
- Goddard, S.V.; M.H. Kao; G.L. Fletcher. 1999. «Population differences in antifreeze production cycles of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) reflect adaptations to overwintering environment ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 56, pp.1991-1999.
- Gong, Z.; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 1992. «Tissue distribution of fish antifreeze protein mRNA's ». **Canadian Journal of Zoology**, 70, pp.810-814.
- Gong, Z.; K.V. Ewart; Z. Hu; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 1996. «Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences ». **Journal of Biological Chemistry**, 271, pp.4106-4112.
- Gordon, M.S.; B.H. Amdur; P.F. Scholander. 1962. «Freezing resistance in some northern fishes ». **Biological Bulletin**, 122, pp.52-56.
- Grandum, S.; A. Yabe; K. Nakagomi; M. Tanaka; T. Fumio; Y. Kobayashi. 1999. «Analysis of ice crystal growth for a crystal surface containing adsorbed antifreeze proteins ». **Journal of Crystal Growth**, 205, pp.382-390.
- Griffith, M.; V.K. Ewart. 1995. «Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods ». **Biotechnology Advances**, 13, pp.375-402.
- Griffith, M.; P. Ala; D.S.C. Yang; W.-C. Hon; B.A. Moffat. 1992. «Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves ». **Plant Physiology**, 100, pp.593-596.

- Haard, N.F. 1992. « A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry ». **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 1, pp.17-35.
- Haard, N.F. 1998. « Specialty enzymes from marine organisms ». **Food Technology**, 52, pp.64-67.
- Halfyard, L.C.; D. Drover; C.C. Parrish; K. Jauncey. 1998. « Growth, survival, lipid and amino acid composition in stripped wolffish, *Anarhichas lupus*, fed commercial marine starter diets ». **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, 98, 2, pp.41-43.
- Hancock, R.E.W. 2000. « Cationic antimicrobial peptides : towards clinical applications ». **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 9, pp.1723-1729.
- Harrison, K.; J. Hallett; T.S. Burcham; R.E. Feeney; W.L. Kerr; Y. Yeh. 1987. « Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein ». **Nature**, 328(16), pp.241-243.
- Hayes, P.H.; P.L. Davies; G.L. Fletcher. 1991. « Population differences in antifreeze protein gene copy number and arrangement in winter flounder ». **Genome**, 34, pp.174-177.
- Hays, L.M.; R.E. Feeney; L.M. Crowe; J.H. Crowe; A.E. Olivier. 1996. « Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions ». **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 93, pp.6835-6840.
- Hazel, J.R. 1993. « Thermal biology ». Dans **The Physiology of Fishes** (Éd. Evans, D.H.), Floride (É.-U.) : CRC Press. pp.427-467.
- Hew, C.L.; Fletcher, G.L. 1997. « Transgenic fish for aquaculture ». **Chemistry and Industry**, 21 avril, 311-314.
- Hew, C.L.; M.H. Kao; Y.P. So. 1983. « Presence of cystine-containing antifreeze proteins in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* ». **Canadian Journal of Zoology**, 61, pp.2324-2328.
- Hew, C.L.; D. Slaughter; G.L. Fletcher; S.K. Joshi. 1981. « Antifreeze glycoproteins in plasma of Newfoundland Atlantic cod (*Gadus morhua*) ». **Canadian Journal of Zoology**, 59, pp. 2186-2192.
- Hew, C.L.; D. Slaughter; S.K. Joshi; G.L. Fletcher. 1984. « Antifreeze polypeptides from the Newfoundland ocean pout, *Macrozoarces americanus*: presence of multiple and compositionally diverse components ». **Journal of Comparative Physiology B**, 155, pp.81-88.

- Hew, C.L.; N.C. Wang; S. Joshi; G.L. Fletcher; G.K. Scott; P.H. Hayes; B. Buettner; P.L. Davies. 1988. « Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* ». **Journal of Biological Chemistry**, 263, pp.12049-12055.
- Hochachka, P.W. 1986. « Defense strategies against hypoxia and hypothermia ». **Science**, 231, pp.234-241.
- Hochachka, P.W. 1988. « Metabolic-, channel-, and pump-coupled functions : constraints and compromises of coadaptation ». **Canadian Journal of Zoology**, 66, pp.1015-1027.
- Holmes W.N.; E.M. Donaldson. 1969. « The body compartments and distribution of electrolytes ». Dans **Fish Physiology**, Vol. 1 (Éds. : Hoar, W.S.; D.J. Randall). New York (É.-U.): Academic Press. pp.1-89.
- Hoshino, T.; M. Kiriaki; S. Ohgiya; M. Fujiwara; H. Kondo; Y. Nishimiya; I Yumoto; S. Tsuda. 2003. « Antifreeze proteins from snow mold fungi ». **Canadian Journal of Botany**, 81, pp.1175-1181.
- Itskovitz-Eldor, J.; J. Levron; A. Arav; S. Bar-Ami; D.W. Stein; G.L. Fletcher; B. Rubinsky. 1993. « Hypothermic preservation of human oocytes with antifreeze proteins from sub-polar fish ». **Cryo Letters**, 14, pp.235-242.
- Jia, Z.; P.L. Davies. 2002. « Antifreeze proteins : an unusual ligand-receptor interaction ». **TRENDS in Biochemical Sciences**, 27, 101-106.
- Johnson, H.; L.C. Halfyard. 2002. « Marketing issues and opportunities for farmed wolffish in the United States and Europe ». **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, 202, 2, pp.11-12.
- Jonassen, T.M. 2002. « Effects of photoperiod, stocking density and diet on growth in young spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) ». **Aquaculture International**, 10, pp.411-420.
- Jonsson, G. 1982. « Contribution to the biology of catfish (*Anarhichas lupus*) at Iceland ». **Rit. Fiskideildar**, 6, pp. 2-26.
- Kao, M.H.; G.L. Fletcher; N.C. Wang; C.L. Hew. 1986. « The relationship between molecular weight and antifreeze polypeptide activity in marine fish ». **Canadian Journal of Zoology**, 64, pp.578-582.
- Kawahara, H. 2002. « The structure and functions of ice-crystal-controlling proteins from bacteria ». **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94, pp.492-496.

- Keats, D.W.; G.R. South; D.H. Steele. 1985. « Reproduction and egg guarding by Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*: Anarhichadidae) and Ocean pout (*Macrozoarces americanus*: Zoarcidae) in Newfoundland waters ». **Canadian Journal of Zoology**, 63, pp.2565-2568.
- Kennett, J.P. 1982. **Marine Geology**. Englewood Cliff (USA) : Prentice-Hall, pp. 813.
- Knight, C.A.; C.-H.C. Cheng; A.L. DeVries. 1991. « Adsorption of α -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes ». **Biophysical Journal**, 59, pp.409-418.
- Knight, C.A.; A.L. DeVries. 1994. « Effects of a polymeric, nonequilibrium « antifreeze » upon ice growth from water ». **Journal of Crystal Growth**, 143, pp.301-310.
- Knight, C.A.; A.L. DeVries; L.D. Oolman. 1984. « Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice ». **Nature**, 308, pp.295-296.
- Knight, C.A.; D. Wen; R.A. Laursen. 1995. « Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice ». **Cryobiology**, 32, pp.23-34.
- Knight, C.A.; DeVries. 1994. « Effects of a polymeric, nonequilibrium antifreeze upon ice growth from water ». **Journal of Crystal Growth**, 143, pp.301-310.
- Koushafar, H.; B. Rubinsky. 1997. « Effect of antifreeze proteins on frozen primary prostatic adenocarcinoma cells ». **Urology**, 49, pp.421-425.
- Kutty, M.N. 2001. « Diversification of aquaculture ». Dans **Sustainable Indian Fisheries**. New Delhi (Inde) : National Academy of Agricultural Sciences. pp.189-212.
- Lambert, Y.; J.-D. Dutil. 1997. « Condition and energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) during the collapse of the northern Gulf of St. Lawrence stock ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 54, pp. 2388-2400.
- Lee, C.Y.; B. Rubinsky; G.L. Fletcher. 1992. « Hypothermic preservation of whole mammalian organs with antifreeze proteins ». **Cryo Letters**, 13, pp.59-66.
- Lee, C.-S. 2003. « Biotechnological advances in finfish hatchery production : a review ». **Aquaculture**, 227, 439-458.
- Le François, N.R.; M. Desjardins; P.U. Blier. 2004a. « Enhancement of profitability perspectives of wolffish cultivation by the extraction of high value biomolecules. Dans **Seafood quality and safety : advances in the new millennium** (Éds. : Shahidi, F.; B.K. Simpson). St. John's (T.-N, Canada): Science Tech Publishing. pp.61-69.

- Le François, N.R.; S.G. Lamarre; P.U. Blier. 2004b. « Tolerance growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities ». **Aquaculture**, 236, pp.659-675.
- Le François, N.R.; H. Lemieux; P.U. Blier. 2002. « Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture ». **Aquaculture Research**, 33, pp.98-105.
- Li, X.M.; K.Y. Trinh; C.L. Hew. 1991. « Expression and characterisation of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from Ocean pout, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli*: improved expression by modification of the secondary structure of the mRNA ». **Protein Engineering**, 4, pp.996-1002.
- Li, X.M.; K.Y. Trinh; C.L. Hew; B. Buettner; J. Baenziger; P.L. Davies. 1985. « Structure of an antifreeze polypeptide and its precursors from the ocean pout (*Macrozoarces americanus*) ». **Journal of Biological Chemistry**, 260, pp.12904-12909.
- Li, Z.; F. Xiong; Q. Lin; M. d'Anjou; A.J. Daugulis; D.S.C. Yang; C.L. Hew. 2001. « Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris* ». **Protein Expression and Purification**, 21, pp.438-445.
- Low, W.-K.; Q. Lin; K.V. Ewart; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 2002. « The skin-type antifreeze polypeptides : a new class of type I AFPs ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.161-186.
- Low, W.K.; Q. Lin; C. Stathakis; M. Miao; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 2001. « Isolation and characterization of skin-type, type I antifreeze polypeptides from the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus* ». **Journal of Biological Chemistry**, 276, pp.11582-11589.
- Marshall, C.B.; G.L. Fletcher; P.L. Davies. 2004. « Hyperactive antifreeze protein in a fish ». **Nature**, 429, pp. 153.
- McCarthy, I.D.; E. Moksness; D.A. Pavlov; D.F. Houlihan. 1999. « Effects of water temperature on protein synthesis and protein growth in juvenile Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) ». **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 56, pp.231-241.
- Miao, M.; S.-L. Chan; G.L. Fletcher; C.L. Hew. 2002. « Control of antifreeze protein gene expression in winter flounder ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.139-160.

- Moksness, E. 1994. « Growth rates of the common wolffish, *Anarhichas lupus* L., and spotted wolffish, *A. minor* Olafsen, in captivity ». **Aquaculture and Fisheries Management**, 25, pp.363-371.
- Moksness, E.; D.A. Pavlov. 1996. « Management by life cycle of wolffish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold-water aquaculture : a technical paper ». **Aquaculture Research**, 27, pp.865-883.
- Mueller, G.M.; R.L. McKown; L.V. Corotto; C. Hague; G.J. Warren. 1991. « Inhibition of recrystallization in ice chimeric proteins containing antifreeze domains ». **The Journal of Biological Chemistry**, 266, pp.7339-7344.
- Muldrew, K.; J. Rewcastle; B.J. Donnelly; J.C. Saliken; S. Liang; S. Goldie; M. Olson; S. Baissalov; G. Sandison. 2001. « Flounder antifreeze peptides increase the efficacy of cryosurgery ». **Cryobiology**, 42, pp.182-189.
- New, M.B. 1997. « Aquaculture and the capture fisheries : balancing the scales ». **World Aquaculture**, 28, pp.11-30.
- O'Dea, N.R.; R.L. Haedrich. 2002. « A review of the status of the Atlantic wolffish, *Anarhichas lupus*, in Canada ». **Canadian Field Naturalist**, 116, pp.423-432.
- O'Grady, S.M.; A.L. DeVries. 1982. « Osmotic and ionic regulation in polar fishes ». **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 57, pp.219-228.
- Øiestad, V. 1999. « Shallow raceways as a compact, resource-maximizing farming procedure for marine fish species ». **Aquaculture research**, 30, pp.831-840.
- Pavlov, D.A.; E. Moksness. 1994. « Reproductive biology, early ontogeny, and effect of development in wolffish : comparison with salmon ». **Aquaculture International**, 2, pp.133-153.
- Pavlov, D.A.; G.G. Novikov. 1986. « On the development of biotechnology for rearing of White Sea wolffish, *Anarhichas lupus marisalbi*: I. experimentation obtaining mature sex products, incubation of eggs and rearing of the young fish». **Journal of Ichthyology**, 26, pp.95-106.
- Payne, S.R.; D. Sandford; A. Harris; O.A. Young. 1994. « The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat ». **Meat Science**, 37, pp.429-438.
- Petrie, B.; S. Akenhead; J. Lazier; J. Loder. 1988. « The cold-intermediate layer on the Labrador and northeast Newfoundland shelves, 1978-86 ». **NAFO Scientific Council Studies**, 12, pp. 57-69.
- Pham, L.; R. Dahiria; B. Rubinsky. 1999. « An *in vivo* study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery ». **Cryobiology**, 38, pp.169-175.

- Price, J.L.; B.B. Gourlie; Y. Lin; R.C.C Huang. 1986. « Induction of winter flounder antifreeze protein messenger RNA at 4°C *in vivo* and *in vitro* ». **Physiological Zoology**, 59, pp.679-695.
- Pudney, P.D.A.; S.L. Buckley; C.M. Sidebottom; S.N. Twigg; M.-P. Sevilla; C.B. Holt; D. Roper; J.H. Telford; A.J. McArthur; P.J. Lillford. 2003. « The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) ». **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 410, pp. 238-245.
- Purchase, C.F.; S.V. Goddard; J.A. Brown. 2001. « Production of antifreeze glycoproteins in cultured and wild juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in a common laboratory environment ». **Canadian Journal of Zoology**, 79, pp.610-615.
- Quéméner, L.; M. Suquet; D. Mero; J.-L. Gagnon. 2002. « Selection method of new candidates for finfish aquaculture : the case of the French Atlantic, the Channel and the North Sea coasts ». **Aquatic Living Resources**, 15, pp.293-302.
- Raymond, J.A. 1992. « Glycerol is a colligative antifreeze in some northern fishes ». **Journal of Experimental Zoology**, 262, pp.347-352.
- Raymond, J.A.; A.L. DeVries. 1977. « Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes ». **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 74, pp.2589-2593.
- Raymond, J.A.; A.L. DeVries. 1998. « Elevated concentrations and synthetic pathways of trimethylamine oxide and urea in some teleost fishes of McMurdo Sound, Antarctica ». **Fish Physiology and Biochemistry**, 18, pp.387-398.
- Raymond, J.A.; C.W. Sullivan; A.L. DeVries. 1994. « Release of an ice-active substance by Antarctic sea ice diatoms ». **Polar Biology**, 14, pp.71-75.
- Raymond, J.A.; P. Wilson; A.L. DeVries. 1989. « Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes ». **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 86, pp.881-885.
- Reddin, D.G.; W.M. Shearer. 1987. « Sea surface temperature and distribution of Atlantic salmon in the Northwest Atlantic Ocean ». **American Fisheries Society Symposium**, 1, pp.262-275.
- Reimnitz, E.; L. Marincovich; M. McCormick; W.M. Briggs. 1992. « Suspension freezing of bottom sediment and biota in the Northwest passage and implications for Arctic ocean sedimentation ». **Canadian Journal of Earth Sciences**, 29, pp.693-703.

- Richardson, R.; J.A. Johansen. 2002. « Cultured wolffish (*Anarhichas minor*): a potential species for exclusive restaurant »? **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, 202, 2, pp.13-16.
- Rubinsky, B.; A. Arav; M. Mattioli; A.L. DeVries. 1990. « The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures ». **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 173, pp.1369-1374.
- Rubinsky, B.; A. Arav; G.L. Fletcher. 1991. « Hypothermic protection: a fundamental property of antifreeze proteins ». **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 180, pp.566-571.
- Rubinsky, B.; M. Mattioli; A. Arav; B. Barboni; G.L. Fletcher. 1992. « Inhibition of Ca^{2+} and K^{+} currents by « antifreeze » proteins ». **American Journal of Physiology**, 262, pp.R542-R545.
- Scholander, P.F.; L. van Dam; J.W. Kanwisher; H.T. Hammel; M.S. Gordon. 1957. « Supercooling and osmoregulation in Arctic fish ». **Journal of Cellular Comparative Physiology**, 49, pp.5-24.
- Schrag, J.D.; C.H. Cheng, M. Panico, H.R. Morris; A.L. DeVries. 1987. « Primary and secondary structure of antifreeze peptides from Arctic and Antarctic zoarcid fishes ». **Biochimical and Biophysical Acta**, 915, pp.357-370.
- Schwarz, M.; S.R. Craig; R. Cool; D. Mowry; S.A. Smith; K.P. Hughes; E. McLean; M. Jahncke. 2002. « Status of flatfish research and production in the USA ». Dans International Conference on Recirculating Aquaculture. **Proceedings of the 4th International Conference on Recirculating Aquaculture**. Toanoke (É.-U.): U.S. Department of Agriculture.
- Scott, G.K.; P.L. Davies; M.H. Kao; G.L. Fletcher. 1988b. « Differential amplification of antifreeze protein genes in the pleuronectinae ». **Journal of Molecular Evolution**, 27, pp.29-35.
- Scott, G.K.; G.L. Fletcher; P.L. Davies. 1986. « Fish antifreeze proteins: recent gene evolution ». **Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences**, 43, pp. 1028-1034.
- Scott, G.K.; P.H. Hayes; G.L. Fletcher; P.L. Davies. 1988a. « Wolffish antifreeze protein genes are primarily organized as tandem repeats that each contain two genes in inverted orientation ». **Molecular and Cellular Biology**, 8, pp.3670-3675.
- Scott, W.B.; Scott, M.G. 1988. « Atlantic fishes of Canada ». **Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences** 219. Toronto (Canada): University of Toronto Press. pp.412-436.

- Shrag, J.D.; C.-H.C. Cheng; M. Panico; H.R. Morris; A.L. DeVries. 1987. « Primary and secondary structure of antifreeze peptides from Arctic and Antarctic zoarcid fishes ». **Biochemistry Biophysical Acta**, 915, pp.356-370.
- Shears, M.A.; M.H. Kao; G.K. Scott; P.L. Davies; G.L. Fletcher. 1993. « Distribution of type III antifreeze proteins in the Zoarcoidei ». **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 2, pp.104-111.
- Solomon, R.G.; R. Appels. 1999. « Stable, high-level expression of a type I antifreeze protein in *Escherichia coli* ». **Protein Expression and Purification**, 16, pp.53-62.
- Soltys, K.A.; A.K. Batta; B.K. Koneru. 2001. « Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein ». **Journal of Surgical Research**, 96, pp.30-34.
- Sorensen, T.F.; H. Ramlov. 2001. « Variations in antifreeze *Zoarces viviparus* : antifreeze activity in the embryonic state ». **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 130, pp.123-132.
- Sorensen, T.F.; H. Ramlov. 2002. « Maternal-fetal relations in antifreeze production in the eelpout *Zoarces viviparus* ». **Cryo Letters**, 23, pp.183-190.
- Staurnes, M.; J.R. Rainuzzo; T. Sigholt; L. Jorgensen. 1994. « Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na-K-ATPase activity ». **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 109, pp.413-421.
- Svensson, U.; A. Omstedt. 1998. « Numerical simulations of frazil ice dynamics in the upper layers of the ocean ». **Cold Region Science and Technology**, 28, pp.29-44.
- Symonds, G. 1986. « Seasonal ice extend on the northeast Newfoundland shelf ». **Journal of Geophysical Research**, 91, pp.10718-10724.
- Tablin, F.; A.E. Olivier; N.J. Walker; L.M. Crowe; J.H. Crowe. 1996. « Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation ». **Journal of Cellular Physiology**, 168, pp.305-313.
- Theede, H.; R. Schneppenheim; L. Béress. 1976. « Frostschutz-glykoproteine bei *Mytilus edulis* »? **Marine Biology**, 36, pp.183-189.
- Tilseth, S. 1990. « New marine fish species for cold-water farming ». **Aquaculture**, 85, pp.235-245.

- Tomczak, M.M.; J.H. Crowe. 2002. « Interaction of AFPs with model membranes and cells ». Dans **Fish Antifreeze Proteins** (Éds. Ewart, K.V.; C.L. Hew), Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, vol 1. New Jersey (É.-U.) : World Scientific. pp.187-212.
- Tomczak, M.M.; D.K. Hinch; J.H. Crowe; M.M.Harding; A.D.J. Haymet. 2003. « The effect of hydrophobic analogues of the type I winter flounder antifreeze protein on lipid bilayers ». **FEBS Letters**, 551, pp.13-19.
- Vaisius, A.; J. Martin-Kearley; G.L. Fletcher. 1989. « Antifreeze protein gene transcription in winter flounder is not responsive to temperature ». **Cellular and Molecular Biology**, 35, pp.547-554.
- Valerio, P.F.; M.H. Kao; G.L. Fletcher. 1990. « Thermal hysteresis activity in the skin of the Cunner, *Tautoglabrus adspersus* ». **Canadian Journal of Zoology**, 68, pp.1065-1067.
- Valerio, P.F.; M.H. Kao; G.L. Fletcher. 1992. « Fish skin : an effective barrier to ice crystal propagation ». **Journal of Experimental Biology**, 164, pp.135-151.
- Wang, X.; A.L. DeVries; C.H. Cheng. 1995. « Antifreeze peptide heterogeneity in an antarctic eel pout includes an unusually large major variant comprised of two 7 kDa type III AFPs linked in tandem ». **Biochemistry and Biophysica Acta**, 1247, pp.163-172.
- Warren, C.J.; G.M. Mueller; R.L. McKown. 1992. « Ice crystal growth suppression polypeptides and methods of preparation ». **U.S. Patent**, 5 118 792.
- Watson, R., D. Pauly. 2001. « Systematic distortions in world fisheries catch trends ». **Nature**, 414, 534-536.
- Wen, D.; R.A. Laursen. 1992. « Structure-function relationship in an antifreeze polypeptide: the role of neutral, polar amino acids ». **Journal of Biological Chemistry**, 267, pp.14102-14108.
- Whitehead, P.J.P.; M.-L. Bauchot; J.-C. Hureau; J. Tortonese. 1986. Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris (France) : UNESCO.
- Wilkins, S.P.; A.J. Blum; D.E. Burkepille; T.J. Rutland; A. Wierzbicki; M. Kelly; M.T. Hamaan. 2002. « Isolation of an antifreeze peptide from the Antarctic sponge *Homaxinella balfourensis* ». **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59, pp.2210-2215.
- Wilson, P.W. 1993. « Explaining thermal hysteresis by the Kelvin effect ». **Cryo Letters**, 14, pp.31-36.

- Wilson, P.W.; M. Gould; A.L. DeVries. 2002. « Hexagonal shaped ice spicules in frozen antifreeze protein solutions ». **Cryobiology**, 44, pp.240-250.
- Wöhrmann, A.H.A. 1996. « Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fish species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea ». **Marine Ecology Progress Series**, 130, pp. 47-59.
- Wöhrmann, A.H.A. 1997. « Freezing resistance in Antarctic and Arctic fishes : its relation to mode of life, ecology and evolution ». **Cybium**, 21, pp.423-442.
- Wu, D.W.; J.G. Duman; C.-H.C. Cheng; F.J. Castellino. 1991. « Purification and characterization of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* ». **Journal of Comparative Physiology B**, 161, pp.271-278.
- Zachariassen, K.E. 1991. « Hypothermia and cellular physiology ». **Arctic Medical Research**, 50 (suppl. 6), pp.13-17.