

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Adaptations physiologiques du loup tacheté *Anarhichas minor* et de l'hybride *A. minor* x *A. lupus* exposés à différentes teneurs en oxygène dissous

Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

Par

François Larouche

Janvier 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

Composition du jury :

Richard Cloutier, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Nathalie LeFrançois, directrice de recherche, Biodôme de Montréal

Denis Chabot, codirecteur de recherche, Pêches et Océans Canada

Mery Martinez, examinateur externe, Laurentian University

Dépôt initial le 27 avril 2011

Dépôt final le 12 janvier 2012

REMERCIEMENTS

Alors nous y voilà...

C'est sur cette dernière note, un peu à bout, mais toujours debout, que je fermerai la dernière page de ce travail ... de cette œuvre magistrale dis-je, qui m'a longtemps paru interminable. En fait, elle représente pour moi la fin définitive d'un retour à l'école ayant débuté voilà bien longtemps. Je suis profondément ému...

Tout ce beau jus de cerveau pressé sur papier n'aurait pu être sans la participation, l'aide ou encore le support moral de plusieurs personnes ô combien merveilleuses! Mais avant de les remercier, je voudrais débiter en me félicitant moi. Merci à moi. Merci moi pour ta patience, ta persévérance et merci surtout d'avoir atteint l'objectif bien précis que tu t'étais lancé il y a maintenant huit ans. Ce que je suis fier de toi !!!

Bien entendu, je tiens à remercier du fond du cœur mes deux directeurs, Denis et Nathalie, qui m'ont accompagné durant le projet. Par vos différences, vous vous êtes merveilleusement bien complétés et m'avez, en quelque sorte, fait office de Yin et de Yang, version superviseurs.

Chère Nathalie par qui tout a débuté. Merci d'avoir eu confiance en moi. Merci pour tes idées de grandeurs, ton expérience partagée, Grande-Rivière et ton amour des poissons. Comme à ton habitude, tu as choisi tes étudiants par « feeling » et c'est la raison pour laquelle la « wolffish team » n'est composée que de gens superbes. En toi, j'ai connu une superbe amie. À bientôt !

À toi aussi Denis, j'en ai beaucoup à donner des remerciements. Probablement qu'une page entière ne serait même pas suffisante. Et puis de toute façon, tu dois être habitué d'en

recevoir! Néanmoins, je te dis merci pour ta générosité à partager ton temps. Merci pour ton esprit pédagogue, d'avoir éclairé ma tête d'étudiant souvent bien pâle devant tous ces grands concepts ! Étudier en ta compagnie a eu et aura encore une grande influence sur mes méthodes de travail. En toi aussi j'ai connu plus qu'un superviseur !

Il m'est aussi impossible de continuer sans passer par l'UQAR. Merci à toi Pierre, tu as été présent sur plusieurs grands aspects de ce projet. Merci pour ta disponibilité et tes conseils en or. On m'a déjà dit : 10 minutes dans le bureau de Pierre peuvent te faire sauver une semaine de travail. Je confirme que c'est vrai. Merci pour ta passion vibrante que tu réussis (trop facilement) à transmettre, et merci pour les bons soupers !

Je tiens aussi à souligner l'apport massif de plusieurs membres de la « wolffish team », et tout particulièrement ma coloc depuis je ne sais plus combien de temps. Merci Ari, toi aussi tu en as passé du temps sur ce projet! Merci aussi à toi Cathy, ton support moral et professionnel m'a souvent grandement aidé. Même si tu travailles avec des méchants mangeurs de poissons ! Dîner sur la plage, procrastiner dans l'IML, aller flatter les loups ou encore manger des muffins... que de bons moments! Pour les autres, mes copains de bureaux, vous avez surtout été présents pour le support moral, ô combien vital pour l'accomplissement d'un tel projet : Berni, Poupou, Martin, MC Soleil, Saratatine, je vous aime ! Merci aussi à toi Nico pour tous tes conseils et protocoles, tant en labo qu'au Baro. Et aussi à toi Jérôme, pour m'avoir aidé à bien prendre soin de mes petits loups. Même s'il fallait tout le temps que je te surveille pour ne pas que tu fasses de bêtises.

Une pensée toute particulière à mes parents, à qui bien entendu je dédie ce mémoire. Vous avez grandement contribué à faire la personne que je suis et à me transmettre l'amour des poissons et de la nature.

Finalement, merci à tous les *Anarhichas minor* et les *Anarhichas minor x lupus* qui ont involontairement donné leurs corps à la science. Je suis désolé, je ne voulais pas avoir à

vous disséquer. Mon amour des poissons finit tout le temps mal pour vous. Mais sachez que c'était pour votre bien. C'était (en partie) dans un but de conservation. Je vous souhaite un prompt rétablissement de vos populations et surtout, surtout, du succès dans vos amours !

RÉSUMÉ

L'oxygène est une molécule essentielle à la vie en agissant à titre d'accepteur final dans le système de transport des électrons. En milieu terrestre, l'oxygène se retrouve en quantité abondante et n'est donc que rarement limitant. Cependant, les teneurs en oxygène dissous (OD) en milieu aquatique sont très variables et les poissons et invertébrés aquatiques sont régulièrement exposés à de faibles concentrations. Pour y faire face, les organismes aquatiques ont donc eu à développer une grande variété de mécanismes adaptatifs, tant comportementaux que physiologiques. Dépendamment de son seuil de tolérance, un organisme pourra surmonter des périodes où l'oxygène se fait rare, mais des coûts physiologiques qui affecteront sa condition y seront généralement associés. Ces coûts pourront par exemple affecter négativement sa croissance, sa reproduction ou son état de santé. Lors de cette étude, 198 loups de mer (63 loups tachetés *Anarhichas minor* et 135 hybrides *A. minor* x *A. lupus*), de tailles différentes (0.4-2 kg), ont été répartis en 16 bassins expérimentaux et exposés durant 14 semaines consécutives, à quatre niveaux d'OD : 40, 50, 60 et ~ 100% de saturation par rapport à l'air (sat.). Les impacts de ces niveaux modérés d'hypoxie ont été étudiés sur la croissance, l'alimentation, l'hématocrite, l'activité d'enzymes du métabolisme aérobie et anaérobie ainsi que du métabolisme relié au stress oxydatif. Plus spécifiquement, nous avons retenu comme indicateurs physiologiques le poids total (P_T) et la longueur à la fourche (L_F), la croissance spécifique (SGR), l'indice de condition de Fulton (K), l'indice hépatosomatique (IHS), la lactate déshydrogénase (LDH), la pyruvate kinase (PK), la citrate synthase (CS), la glutathione réductase (GR), les contenus en malondialdéhyde (MDA), l'aconitase (ACO) et finalement la catalase (CAT). Toutes les mesures de croissances sont affectées par l'hypoxie et comme observé dans d'autres études, semblent être le résultat d'une diminution de la prise alimentaire. Le métabolisme oxydatif et la capacité antioxydante ne diffèrent pas entre les traitements et les deux groupes étudiés. Il apparaît donc que les impacts d'une exposition chronique à des niveaux en oxygène dissous intermédiaires n'auraient pas d'effets majeurs sur la physiologie et la survie chez le loup tacheté et l'hybride *A. minor* x *A. lupus*. Cependant, des différences métaboliques ont été observées entre l'hybride et la souche parentale. L'activité des enzymes glycolytiques (LDH et PK) est plus faible chez le loup tacheté dans les traitements 40% et 50% sat. alors que l'activité de l'enzyme ACO et les contenus en MDA sont, pour tous les traitements, plus élevés chez le loup tacheté.

Mots clés : croissance, hybride, hypoxie, loup tacheté, métabolisme énergétique, oxygène, registre aérobie, stress oxydatif

ABSTRACT

Oxygen play a key role as the final receptor in the mitochondrial electron system. Except at very high altitude, oxygen availability is stable and high in air. But dissolved oxygen (DO) is at much lower concentration in water and very variable. Hypoxia (low dissolved oxygen) is a common phenomenon in aquatic environments. Aquatic organisms have consequently developed a large range of physical and physiological adaptations to survive unfavorable DO levels. However, these adaptations can be costly for the organism in term of growth, reproduction and health. In this study, 198 wolffish (63 spotted wolffish *Anarhichas minor* and 135 hybrids *A. minor* x *A. lupus*) have been dispatched among 16 tanks and exposed to four dissolved oxygen levels : 40, 50, 60 and ~ 100 % of air saturation (sat.) during 14 weeks. We studied the impact of hypoxia on growth, fish condition and ingestion rate, the hematocrit, the activity of key enzymes for aerobic and anaerobic metabolic pathways, antioxidant activity and oxidative stress damage. More specifically, we considered total mass (M_T) and fork length (L_F), specific growth rate (SGR), Fulton's condition index (K), the hepatosomatic index (HSI), haematocrit level as well as the activity of citrate synthase (CS), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), aconitase (ACO), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and malondialdehyde content (MDA). All growth parameters were positively correlated with oxygen level in both fish group although hybrids performed better. Hypoxia levels were also linked to a reduction in feeding level, which appears to explain the observed growth loss. Glycolytic activity (PK and LDH) tend to be lower on spotted wolffish only, at 40 and 50 % sat. and no effects were observed on the oxidative stress metabolism. These results suggest that adaptatives mechanisms of wolffish are sufficient to maintain the metabolic activity in moderate hypoxia. Nevertheless, growth loss seems to be more linked to a reduction in feeding, which was probably the result of a reduction of the metabolic scope due to the chronic moderate hypoxia exposure.

Keywords : aerobic scope, energetic metabolism, growth, hybrid, hypoxia, oxidative stress, oxygen, spotted wolffish,

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	VII
RÉSUMÉ	XI
ABSTRACT.....	XIII
TABLE DES MATIERES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES ABREVIATIONS	XXI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 LES LOUPS DE MER	1
1.1.1 STATUT	3
1.1.2 POTENTIEL AQUACOLE	4
1.1.3 HYBRIDATION	6
1.2 HYPOXIE.....	8
1.2.1 DEFINITION DE L'HYPOXIE	8
1.2.2 HYPOXIE ET ENVIRONNEMENT	9
1.2.3 HYPOXIE ET AQUACULTURE	12
1.3 OXYGENE ET RENDEMENT ENERGETIQUE	13
1.4 MECANISMES ADAPTATIFS A L'HYPOXIE CHEZ LES POISSONS.....	16
1.4.1 ADAPTATIONS AU METABOLISME EN ANAEROBIE.....	19
1.5 OXYGENE ET STRESS OXYDATIF	23
1.5.1 HYPOXIE ET STRESS OXYDATIF.....	27
1.6 OBJECTIFS	28

CHAPITRE 2 EFFECT OF CHRONIC SUBLETHAL HYPOXIA ON GROWTH AND PHYSIOLOGY IN THE WOLFFISH (<i>ANARHICHAS MINOR</i>) AND THE HYBRID (<i>A. LUPUX</i> X <i>A. MINOR</i>).....		31
2.1	ABSTRACTS	32
2.2	INTRODUCTION	33
2.3	MATERIALS AND METHODS	38
	2.3.1 ACCLIMATATION AND CONTROL GROUP.....	38
	2.3.2 EXPERIMENTAL SETUP.....	39
	2.3.3 BLOOD AND TISSUE SAMPLING.....	43
	2.3.4 BIOCHEMICALS ASSAYS.....	43
	2.3.5 STATISTICAL PROCEDURE	45
2.4	RESULTS.....	47
	2.4.1 GROWTH AND CONDITION.....	47
	2.4.2 BIOCHEMICAL PARAMETERS	50
	2.4.3 REMOVED FISH.....	58
2.5	DISCUSSION.....	58
2.6	ACKNOWLEDGEMENTS.....	63
CHAPITRE 3 CONCLUSION GENERALE		65
ANNEXE		71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		73

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Table 2.1 : Experimental parameters (oxygen, temperature and salinity) during the experiment.....41

Table 2.2: Mass (M), fork length (L_F) and Fulton's condition (K) of spotted wolffish at the beginning of the experiment in each tanks.42

Table 2.3: Condition factor, SGR, HIS and feed consumption of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days.....47

Table 2.4 : Activity of CS, PK, LDH and ACO at four different DO levels in muscle of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days51

Table 2.5: Activity of CS, PK, LDH and ACO at four different DO levels in liver of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days.....51

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1: Les trois espèces du genre <i>Anarhichas</i> (famille <i>Anarhichadidae</i>) retrouvées dans le nord de l’océan Atlantique.....	2
Figure 1.2: Nombres de sites marins côtiers en hypoxie observés à travers les années et répartis sur le globe (tirée de Vaquer-Sunyer, 2008).	11
Figure 1.3: Les trois étapes de la respiration cellulaire : la glycolyse, le cycle de l’acide citrique et le système de transport des électrons (tirée et modifiée de Zhou, 2005).....	15
Figure 1.4: Registre aérobie, SMR et AMR de la truite mouchetée <i>Salvelinus fontinalis</i> M par rapport aux différentes teneurs en oxygène dissous (tirée et modifiée de Fry, 1971).....	20
Figure 1.5: Représentation des 5 complexes du système de transport des électrons..	25
Figure 1.6: Résumé de différentes voies de générations de ERO et de certaines enzymes clés impliquées dans leur détoxification, tirée de (Storey, 1996).....	27

Chapitre 2

Figure 2.1: Relationship between Δ length (A), Δ mass (B) and specific growth rate (C) relative to dissolved oxygen on spotted wolffish and the hybrid *A. minor* x *A. lupus*.....48

Figure 2.2: Relationship between Δ condition factor (K) and hepatosomatic index (HSI) relative to dissolved oxygen levels on spotted wolffish and the hybrid *A. minor* x *A. lupus*.....50

Figure 2.3: Relationship between CS, PK, and ACO activity on muscle and liver of spotted and hybrid wolffish at different DO levels ($U\ g^{-1}$ tissue).....53

Figure 2.4: Liver MDA and ACO and muscle ACO and GR activity in spotted and hybrid wolffish at different DO levels ($U\ g^{-1}$ tissue).....54

Figure 2.5: Blood haematocrit levels (%) on spotted and hybrid wolffish exposed to different DO levels.....55

Figure 2.6: Mass gain (Δ mass) in relationship to food mean ingestion (3 feeding/weeks, spotted and hybrid wolffish pooled) and dissolved oxygen levels.....56

Figure 2.7: Relation between PK and LDH activities on length at the end of the experiment.57

Annexe

Figure 3.1: Relation entre la croissance spécifique (% day⁻¹) de 196 loups toute tailles confondues et ceux de plus de 1 kg par rapport aux différentes teneurs en oxygène dissous.....71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

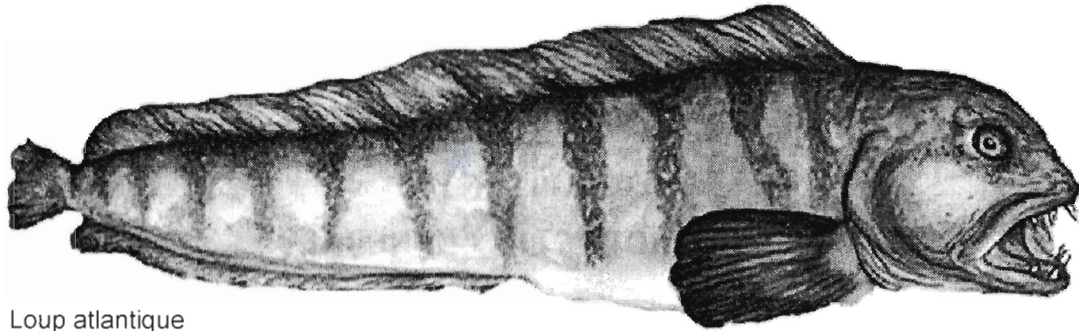
ACO	Aconitase
ADP	Adénosine diphosphate
AMR	Active metabolic rate (taux métabolique actif)
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CS	Citrate synthase
ERO	Espèce réactive à l'oxygène
FADH₂	Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide (FAD)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
LDH	Lactate deshydrogénase
LME	Modèle linéaire à effets mixtes
NAD-NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)
NECs	Cellule neuroépithéliale
P_i	Phosphore inorganique
PK	Pyruvate kinase
PO₂	Pression en oxygène
SOD	Superoxide dismutase
SMR	Taux métabolique standard
TBARs	Substance d'acide thiobarbiturique

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 LES LOUPS DE MER

Le loup atlantique (*Anarhichas lupus* L.) et le loup tacheté (*Anarhichas minor* O.) sont des poissons démersaux habitant les eaux profondes du nord de l'océan Atlantique. Ils sont des représentants de la famille des Anarhichadidae, qui inclut trois autres espèces : le loup à tête large (*Anarhichas denticulatus* K.) et du côté de l'océan Pacifique, le loup de Béring (*Anarhichas orientalis* P.) ainsi que le poisson loup à ocelles (*Anarrhichthys ocellatus* A.). De forme allongée et caractérisés par une tête large à fortes mâchoires, les loups de mer peuvent atteindre une taille de plus de 140 cm et peser plus de 20 kg (Scott & Scott, 1988 ; Le François et al., 2010b). Ce sont des poissons sédentaires au tempérament calme qui se nourrissent principalement d'organismes à faible mobilité comme les crustacés, les échinodermes, autres invertébrés et à l'occasion d'autres poissons (Scott & Scott, 1988).



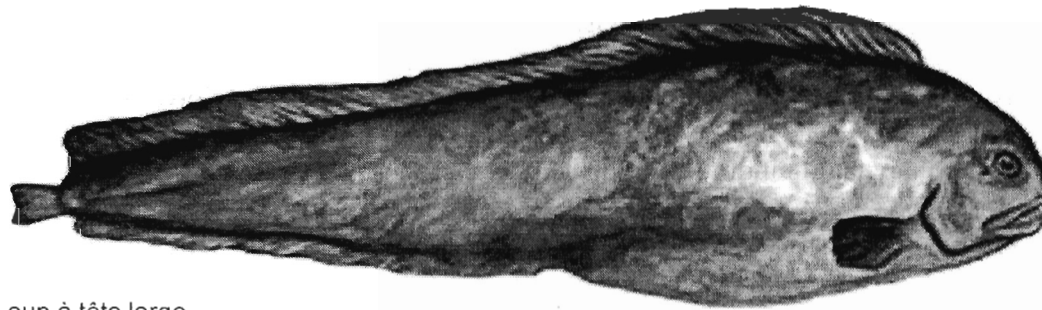
Loup atlantique

Anarhichas lupus Linnaeus



Loup tacheté

Anarhichas minor Olafsen



Loup à tête large

Anarhichas denticulatus Krøyer

Figure 1.1 Les trois espèces du genre *Anarhichas* (famille Anarhichadidae) retrouvées dans le nord de l'océan Atlantique (Source: Memorial University of Newfoundland, (http://www.mun.ca/biology/scarr/Wolffish_spp.jpg)).

1.1.1 Statut

Depuis environ 2001, le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC) considère le statut de quatre des cinq représentants des Anarhichadidae comme problématique. La loi fédérale sur les espèces en périls (LEP) définit le statut du loup atlantique et du loup de Béring comme « préoccupant », et celui du loup tacheté et du loup à tête large comme « menacé ». Cette considération provient de l'observation de l'effondrement des populations sauvages depuis les années 70, de l'ordre de plus de 90%. Bien que les loups de mer ne soient pas particulièrement ciblés par l'industrie de la pêche, le loup tacheté et le loup atlantique ont néanmoins une importance commerciale et ont été prélevés des deux côtés de l'Atlantique comme prise accessoire et accidentelle (Le François et al., 2010b). Il est possible que par leur mode de vie solitaire et une maturité sexuelle tardive (5-10 ans) (Falk-Petersen et al., 1999 ; Tveiten et al., 2001), les populations de loups de mer s'avèrent beaucoup plus vulnérables à l'exploitation commerciale, en comparaison aux espèces à reproduction importante et au comportement grégaire. En plus d'une pression de pêche, un autre facteur possiblement impliqué serait une détérioration de leurs habitats respectifs causée par le chalutage et le dragage pour la capture d'espèces benthiques, qui induit par exemple la modification d'amas rocaillieux utilisés comme abris et sites de fraies (O'Dea & Haedrich, 2002). À ce jour, le statut du loup tacheté et à tête large confère aux individus sauvages une protection interdisant tout prélèvement dans les eaux canadiennes.

1.1.2 Potentiel aquacole

Le loup tacheté, et dans une moindre mesure le loup atlantique, sont aussi des espèces possédant plusieurs caractéristiques de domestication qui en font des candidats de choix pour l'émergence d'une production aquacole commerciale en pays nordiques. Des installations piscicoles expérimentales sont d'ailleurs en fonction au Canada (Québec), en Norvège et en Islande. Ces trois pays, et particulièrement la Norvège, sont très actifs au niveau de la recherche sur les loups de mer et se partagent avec la Russie plus d'une centaine de publications scientifiques sur ce sujet. Une des raisons de cet attrait est que l'aquaculture en pays nordique est exposée à certaines contraintes qui réduisent considérablement le nombre d'espèces adaptées en comparaison aux pays de climat tempéré. La formation du couvert de glace est l'une des principales causes limitant l'utilisation de cages de grossissement et de bassins d'élevage extérieurs (FQSA, 2003). Dans le cas du Québec, le secteur de l'aquaculture reste relativement peu diversifié. L'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis* M.) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* W.) représentent plus de 95% des espèces dulcicoles produites, tandis que la moule bleue (*Mytilus edulis* L.) et, à plus petite échelle, le pétoncle (*Placopecten magellanicus* G.) et la mye (*Mya arenaria* L.) représentent la totalité des espèces marines cultivées (MAPAQ, 2008). La prospection pour l'identification de nouvelles espèces de poissons marins possiblement mieux adaptées est donc un moyen permettant d'améliorer et même d'accélérer le développement de la mariculture en eau froide en misant sur sa diversification et sa compétitivité.

Plus de 20 années d'études portant majoritairement sur le loup tacheté ont permis de mieux documenter certains aspects de la biologie de l'espèce, de la zootechnie de son élevage et en moindre mesure les perspectives économiques liées à son élevage. Le cycle de vie est bien maîtrisé en milieu contrôlé et il est aujourd'hui possible de compléter le cycle vital en captivité, à partir des œufs fécondés artificiellement jusqu'à l'atteinte d'une taille commerciale (Johannessen et al., 1993 ; Falk-Petersen et al., 1999). Plusieurs études ont permis de connaître les aptitudes de l'espèce face à différents paramètres physico-chimiques comme la tolérance à différentes salinités (Foss et al., 2001 ; Le François et al., 2004), à l'oxygène dissous (Foss et al., 2002), à l'ammoniaque (Foss et al., 2003) ou encore les températures pour atteindre des croissances optimales (Hansen & Falk-Petersen, 2001 ; Falk-Petersen & Hansen, 2003). Les systèmes d'élevage optimaux ont aussi été étudiés et s'avèrent être avantageux en comparaison aux espèces occupant la colonne d'eau comme les salmonidés. En bassin comme en mer, ce poisson reste peu actif et passerait la majeure partie de son temps inactif sur les fonds. Les bassins d'élevage préconisés exploitent donc la surface de fond du bassin plutôt que la hauteur et n'utilisent ainsi que de faibles volumes d'eau (hauteur du niveau d'eau : 1-25 cm selon la taille produite) (Imsland et al., 2007). Ce type de bassin est particulièrement bien adapté pour les installations aquacoles terrestres. Il permet une meilleure uniformité dans la distribution de nourriture et facilite la maintenance par un débit d'eau élevé. De plus, il assure une économie de la consommation d'eau et, surtout, de l'espace utilisé (Imsland et al., 2007). Le loup de mer a l'avantage de supporter de hautes densités d'élevage (170-310 kg/m³) (Imsland et al., 2009 ; Tremblay-Bourgeois et al., 2010), en comparaison à d'autres espèces comme la truite arc-en-ciel (30-90 kg/m³)

(Ellis et al., 2002), la morue atlantique (*Gadus morhua* L.) (± 40 kg/m³) (Lambert & Dutil, 2001) ou encore le saumon atlantique (*Salmo salar* L.) (100-125 kg/m³) (Kjartansson et al., 1988). Certains auteurs se sont penchés sur la vulnérabilité du loup tacheté aux différents agents pathogènes susceptibles de l'affecter et en ont fait une revue détaillée (Foss et al., 2004). Bien que certains virus, bactéries et ectoparasites ont jusqu'à maintenant été identifiés, le loup tacheté semble *a priori* être assez tolérant aux pathogènes.

En s'appuyant sur différents critères propres à l'espèce, Le François et al. (2002 ; 2010a) ont établi un modèle permettant d'évaluer le potentiel de rentabilité à produire une espèce piscicole. En notant plus d'une trentaine de caractéristiques (biologiques, techniques et commerciales) appliquées sur une cinquantaine d'espèces de poissons, le modèle utilisé a hissé les loups tacheté et atlantique aux premiers rangs, devant l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) et le saumon atlantique, démontrant ainsi le potentiel aquacole du loup de mer.

1.1.3 Hybridation

L'hybridation, soit la production d'une descendance viable à partir de croisement entre différents genres, espèces ou sous-espèces est une procédure régulièrement utilisée en aquaculture (Bartley et al., 2000 ; Wang & Xia, 2002). Généralement, l'aquaculteur cherche à obtenir des traits désirables provenant de différents géniteurs et de les combiner en une seule espèce ou encore à obtenir ce que l'on appelle « l'effet hétérosis » (Bartley et al., 2000 ; Goyard et al., 2008), c'est-à-dire l'acquisition d'une sous-espèce possédant des qualités supérieures à celles des espèces parentales. Ces traits désirables sont

principalement un rendement en croissance supérieur (Legendre et al., 1992 ; Galbreath & Thorgaard, 1995), une résistance générale accrue (Bartley et al., 2000 ; Hena et al., 2005) ou encore l'obtention de souches stériles (Shen et al., 2006).

L'hybridation, particulièrement chez les poissons, se produit fréquemment en milieu naturel (Verspoor & Hammar, 1991). Chez les loups de mer, l'hybridation est possible et certaines pistes suggèrent qu'elle se produirait aussi en milieu naturel. Les premiers indices reportés proviennent de descriptions morphologiques de spécimens sauvages révélant des traits intermédiaires provenant de *A. minor* x *A. lupus* ou encore de *A. minor* x *A. denticulatus* (Lohmann, 1954 ; Templeman, 1986). Une analyse phylogénétique détaillée de l'ADN mitochondrial des loups tacheté, atlantique et à tête large a de son côté révélé une proximité génétique entre les trois espèces, particulièrement entre les loups atlantique et tacheté (Johnstone et al., 2007). Ces espèces ayant une aire de distribution et une période de frai se chevauchant (Falk-Petersen et al., 1999), l'hybridation naturelle peut donc être envisagée. Par contre, une analyse génétique portant sur 298 loups tachetés de différentes provenances (Mer de Barents et Atlantique) (Imsland et al., 2008) n'a pour sa part identifié aucun hybride, mais plutôt des sous-populations géographiques au sein de la même espèce. Il n'y a donc jusqu'à maintenant aucune preuve certifiée permettant d'affirmer la présence d'hybrides en milieu naturel. L'hybridation artificielle entre les loups tacheté et atlantique demeure néanmoins possible et a été réussie dans les installations du Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière (CAMGR), Grande-Rivière, Qc. Une première étude portant sur les alevins décrit un hybride viable et en santé se comparant sur plusieurs points au loup tacheté (Gaudreau et al., 2009). La taille des alevins hybrides était cependant

plus petite, révélant l'influence du loup atlantique, dont l'alevin est généralement plus petit que celui du loup tacheté au moment de l'éclosion. Une seconde étude s'est penchée sur les incompatibilités génomiques pouvant survenir lors d'une hybridation et qui peuvent réduire l'efficacité de l'activité mitochondriale (Gaudreau et al., In prep.). L'étude conclue que l'hybridation entre les loups tacheté et atlantique n'induit pas de dysfonctionnements mitochondriaux notables en conditions optimales.

1.2 HYPOXIE

1.2.1 Définition de l'hypoxie

De façon générale, l'hypoxie fait référence à des teneurs en oxygène inférieures aux valeurs dites normales (normoxie). Le terme normoxie est lui-même vague mais peut néanmoins être associé à des teneurs en oxygène supérieures à 80% de saturation. L'intensité de la diminution des concentrations en oxygène pourra par exemple être décrite comme hypoxie légère ou encore sévère. Certains auteurs utilisent plutôt une valeur fixe en-dessous de laquelle ils considèrent que l'eau est en hypoxie. La littérature actuelle situe en effet l'hypoxie en milieux marins dans des valeurs variant de 0.2 à 4.0 mg O₂/l et plus généralement de 2 mg O₂/l et de 5-6 mg O₂/l en milieux d'eau douce (Wu, 2002 ; Diaz & Breitburg, 2009). Comme il y a de grandes différences de tolérance entre les taxons, l'utilisation d'une valeur de concentration fixe pour définir l'hypoxie sert surtout à identifier une situation où des effets sont très marqués. Bien qu'utile comme outil de diagnostic d'impact environnemental sérieux, un « seuil » d'hypoxie indique que les espèces les plus sensibles sont exclues, mortes ou déplacées. Cependant, plusieurs effets

négatifs peuvent survenir quand un organisme est exposé à des teneurs non-létales d'oxygène dissous et de tels effets sont escamotés quand une valeur fixe est utilisée pour définir l'hypoxie. Ainsi, en s'appuyant sur la littérature scientifique, Vaquer-Sunyer et Duarte (2008) démontrent des effets non létaux (i.e. impact sur la croissance, la reproduction, la résistance générale, etc.) chez 34 espèces de poissons avec des teneurs en OD variant de 2 à 10 mg O₂/L, et chez 30 espèces de crustacés avec des valeurs de 0 à 5 mg O₂/L. L'hypoxie doit donc être définie avec prudence. Dans le cadre de ce projet, quatre différentes valeurs en oxygène ont été utilisées. La valeur de normoxie représente un traitement en oxygène au-delà de 80% de saturation tandis que les trois autres valeurs (40, 50 et 60 % sat.), sont considérées comme des teneurs d'oxygène en hypoxie intermédiaire.

1.2.2 Hypoxie et environnement

L'hypoxie est un phénomène naturel retrouvé rarement en milieu terrestre, mais fréquemment en milieu aquatique. Dépendamment de la température et de la salinité, l'eau contient de 20 à 40 fois moins d'oxygène par volume que l'air en plus d'un taux de diffusion inférieur de l'ordre de 1 :10 000 (Nikinmaa, 2001 ; Diaz & Breitburg, 2009). À cette propriété physico-chimique s'ajoutent divers facteurs environnementaux contribuant à exposer davantage les milieux aquatiques à l'hypoxie. Plusieurs régions du globe sont par exemple caractérisées par des périodes de longue sécheresse. Dû à la diminution des volumes d'eau et par conséquent des débits des cours d'eau, la réduction des échanges gazeux rend ces cours d'eau sujets à l'hypoxie (Chapman & McKenzie, 2009). La formation de glace est aussi un phénomène pouvant conduire à l'hypoxie en faisant office

de barrière aux échanges gazeux (Vornanen et al., 2009). L'hypoxie survient de plus naturellement dans les systèmes marins quand certaines conditions s'y prêtent. Lorsque par exemple le temps de résidence de la masse d'eau est très long, les échanges d'eaux et la ventilation sont faibles, lorsqu'il y a présence de stratification où quand la production de carbone est élevée et tend à se déposer dans les fonds marins. La décomposition de cette matière organique qui s'en suit consomme beaucoup d'oxygène (Rabalais et al., 2001). Plusieurs périodes d'hypoxie ont existé à travers les temps géologiques, et surviennent encore de façon régulière dans des lieux propices comme dans les zones océaniques très profondes ou encore les fjords (Chapman & McKenzie, 2009). Les activités humaines peuvent aussi contribuer à l'apparition de zones d'hypoxie en amplifiant les phénomènes d'eutrophisation. L'eutrophisation implique un apport massif d'un nutriment qui normalement limite la croissance organique d'un milieu et tout particulièrement celle des végétaux. La décomposition végétale provenant de la sénescence naturelle fait alors diminuer les niveaux d'oxygène en décuplant l'activité bactérienne à travers la décomposition organique. Un enrichissement nutritif peut ainsi mener l'activité bactérienne à un point tel que tout l'oxygène du milieu devient consommé. Dès lors, seules les bactéries anaérobiques prospèrent et peuvent même dégrader davantage le milieu par leur contribution en déchets métaboliques toxiques comme l'ammoniac ou le sulfure d'hydrogène (Diaz & Breitburg, 2009).

Il est aujourd'hui reconnu que les deux principaux facteurs limitants en milieux aquatiques, tant dulcicoles que marins, sont le phosphore et l'azote (Carpenter et al., 1998). Ces deux nutriments, abondamment rejetés dans l'environnement, principalement par

l'entremise des activités industrielles et agricoles, sont les grands responsables de l'eutrophisation d'origine anthropique (Diaz, 2001 ; Wu, 2002). Bien que les efforts d'observation aient grandement augmenté durant les dernières années, Vaquer-Sunyer et Duarte (2008) ont néanmoins observé une croissance de 5.54%/années du nombre de systèmes marins en hypoxie (figure 1.2).

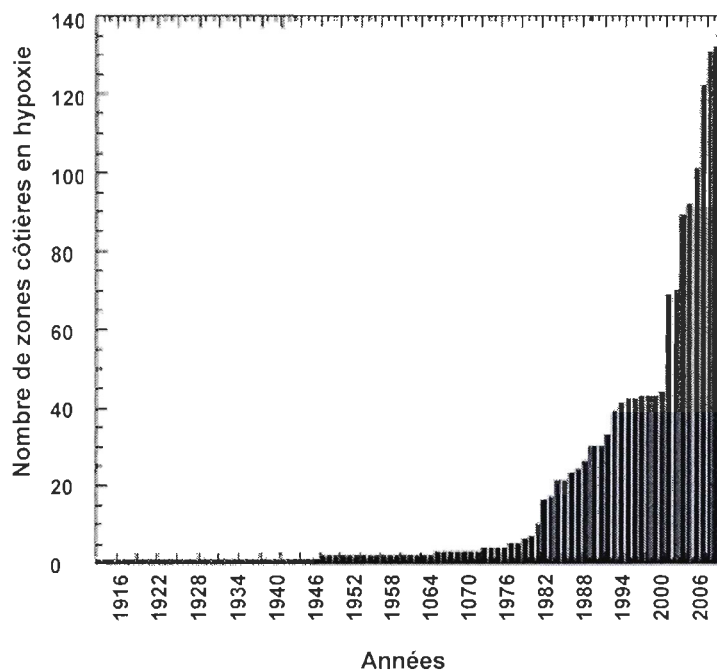


Figure 1.2. Nombres de sites marins côtiers en hypoxie observés à travers les années et répartis sur le globe (tirée de Vaquer-Sunyer et Duarte (2008)).

En plus du nombre de sites, ces auteurs ont aussi noté une augmentation de la durée et de la sévérité de l'hypoxie. Certains systèmes marins, où les échanges d'eau sont faibles et les apports en nutriments anthropiques élevés sont même caractérisés par des conditions d'hypoxie, voir anoxie (i.e. absence complète d'oxygène) permanente. C'est le cas des

fonds marins du golfe de la Finlande, certaines zones de la mer Baltique ou encore de la mer Caspienne (Wu, 2002). La vitesse à laquelle les comportements des sociétés actuelles tant à changer en plus des hausses de températures à prévoir dans les années à venir laissent prévoir que l'hypoxie gagnera en ampleur à l'échelle mondiale (Nixon, 1990).

1.2.3 Hypoxie et aquaculture

Bien que les producteurs aquacoles opérant en systèmes fermés aient recours à l'ajout d'oxygène pur ou de bulleur à air, l'hypoxie ou encore les fluctuations des niveaux d'oxygène dissous sont des situations souvent inévitables en aquaculture. Ces événements parfois fréquents ont des effets négatifs sur le rendement de la production en affectant par exemple la croissance ou encore en induisant des réponses de stress (Welker et al., 2007). Afin d'optimiser sa production, le producteur doit donc connaître les tolérances et les limites de l'espèce produite afin de lui fournir des paramètres optimaux.

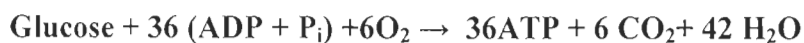
Les systèmes d'élevage préconisés pour la production de loup de mer comportent de nombreux avantages techniques. Cependant, leurs faibles volumes d'eau par rapport aux densités utilisées ($170 - 310 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) (voir section 1.1.3) rendent la qualité de l'eau variable, particulièrement pour ce qui a trait aux teneurs en oxygène dissous. Des bris techniques conduisant à l'arrêt du fonctionnement du système peuvent par exemple rapidement conduire à des niveaux d'oxygène dangereusement faibles. Plus généralement, des fluctuations des teneurs en oxygènes sont observées suite aux périodes d'alimentation. De plus, la digestion postprandiale implique des coûts physiologiques requérant une augmentation de la consommation en oxygène. Soofiani et Hawkins (1982) ont par

exemple observé chez des morues gavées (*Gadus morua* L.) que la consommation d'oxygène pouvait doubler en comparaison à des individus à jeun. L'accumulation de déchets organiques et résidus alimentaires peut aussi contribuer à des baisses OD en induisant une augmentation de la respiration microbienne. En connaissant les limites que peuvent supporter l'espèce produite, le producteur se dote ainsi d'une marge de travail et pourra par conséquent agir afin d'éviter à tout prix les épisodes lui étant contre-productifs.

1.3 OXYGENE ET RENDEMENT ENERGETIQUE

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule essentielle à tout organisme vivant, car elle permet de stocker l'énergie chimique nécessaire à l'activité cellulaire. C'est lors de son hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP) qu'une partie de l'énergie qu'elle contient est libérée pour être utilisée par la cellule. Étant donné que les demandes en énergie sont très variables selon les besoins de la cellule ou encore de l'organe, l'apport en ATP doit pouvoir s'ajuster selon les intensités de la demande et la durée de l'activité. La régulation de ces demandes et de la régénération de l'ADP en ATP se fait à travers différentes voies cellulaires qui ont évolué au cours du temps depuis les plus simples organismes au plus complexes. C'est à travers les réactions chimiques de ces voies cellulaires que des molécules organiques riches en énergie comme le glucose, le glycogène ou encore les acides gras sont dégradées afin de libérer une partie de l'énergie qu'elles contiennent et de la stocker en énergie utilisable sous forme d'ATP. Le rendement énergétique qui en résulte dépend majoritairement de l'efficacité de la dégradation de la molécule en question, laquelle dépend de la présence ou non d'oxygène moléculaire. La respiration cellulaire en

aérobie est la voie cellulaire la plus rentable pour produire de l'ATP. Cette voie se distingue par sa complexité et son efficacité à extraire l'énergie des diverses molécules énergétiques. Elle est subdivisée en trois étapes majeures, chacune composée de plusieurs réactions enzymatiques : la production d'acétyl-CoA (glycolyse), l'oxydation de l'acétyl-CoA (cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative (chaîne de transport des électrons) (figure 1.3). En condition d'aérobie, le catabolisme d'une molécule de glucose s'effectuera à travers les trois voies métaboliques. Durant la glycolyse, deux molécules d'ATP, de NADH et d'acétyl-CoA sont générées. La dégradation se poursuit ensuite à travers le cycle de l'acide citrique. Cette deuxième étape aboutit à la production de dix NADH et deux FADH₂. Ce sont ces molécules réduites qui libéreront la majeure partie de l'énergie lors de la dernière étape, la phosphorylation oxydative. Celle-ci se déroule dans la membrane mitochondriale de la cellule à travers cinq complexes protéiques (complexes I à V). Les électrons transportés par les NADH et FADH₂ sont alors transférés d'un complexe à l'autre jusqu'à l'accepteur final de la chaîne, l'oxygène moléculaire. Le mécanisme de transfert d'électrons entre les complexes I à IV engendre la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. C'est ce gradient de protons transmembranaire qui donnera l'énergie nécessaire à la condensation d'une molécule de phosphate inorganique à l'ADP par l'ATP synthétase (complexe V) (Lehninger & Nelson, 2005). La réaction nette de l'oxydation du glucose en condition d'aérobie peut se décrire de la façon suivante (Hochachka & Somero, 2002):



Lorsque l'oxygène est absent, le flux du cycle de l'acide citrique et de la phosphorylation oxydative est inhibé. La dégradation du glucose se déroule alors majoritairement par la voie de la glycolyse et la production d'ATP se fait sans oxygène. Cette voie cellulaire très ancienne au niveau évolutif a été sujette au cours de l'évolution à

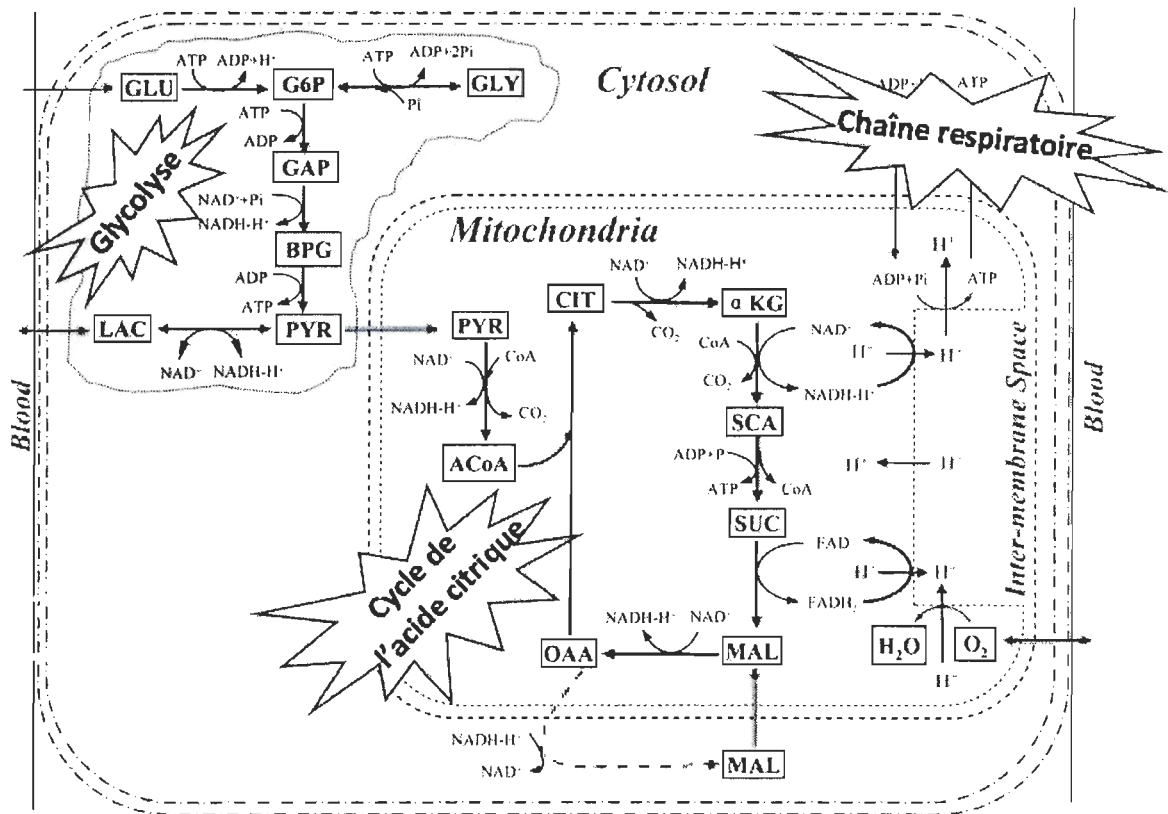
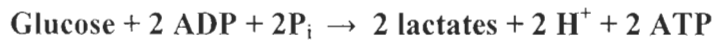


Figure 1.3. Les trois étapes de la respiration cellulaire : la glycolyse, le cycle de l'acide citrique et le système de transport des électrons (tirée et modifiée de Zhou et al (2005)).

quelques changements adaptatifs au niveau de la dernière réaction généralement catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH), et le produit final qui est chez la plupart des vertébrés le lactate peut différer (Hochachka & Somero, 2002). Lors de la glycolyse en anaérobie, le catabolisme de la molécule de glucose est moindre et n'aboutit qu'à seulement deux

molécules d'ATP contre plus de 30 en aérobie. La réaction nette de la glycolyse anaérobie peut se décrire de la façon suivante (Hochachka & Somero, 2002) :



Une baisse continue des concentrations en oxygène du milieu se traduit donc pour l'organisme par une diminution graduelle de la respiration cellulaire en aérobie, conduisant ainsi à une réduction de la production d'énergie. Dans ces conditions, l'organisme aura avantage à prioriser son économie par différents mécanismes adaptatifs (Hochachka & Lutz, 2001) (voir section 1.4). Si, malgré ces tentatives d'économie, l'apport en oxygène demeure insuffisant pour combler les besoins de la respiration cellulaire en aérobie, la production d'ATP devrait alors provenir majoritairement de la glycolyse en anaérobie.

1.4 MECANISMES ADAPTATIFS A L'HYPOXIE CHEZ LES POISSONS

Les animaux aquatiques et tout particulièrement les poissons sont le groupe de vertébrés dont le nombre d'espèces tolérantes à l'hypoxie est le plus élevé (Richards, 2009). Les mécanismes adaptatifs qu'ils ont développés sont les reflets des différents habitats dans lesquels ils évoluent depuis des millions d'années et de l'ampleur et la fréquence des épisodes d'hypoxie avec lesquels ils ont eu à composer. On retrouve chez les poissons une grande diversité d'adaptations comportementales, morphologiques, physiologiques ou encore biochimiques à l'hypoxie (Dalla Via et al., 1994 ; Chapman & McKenzie, 2009). C'est par un enchaînement de ces réponses adaptatives que les poissons peuvent, dépendamment de l'espèce et du degré d'exposition, maintenir l'extraction

d'oxygène nécessaire à leurs fonctions vitales. En règle générale, les poissons s'ajustent à l'hypoxie de façon similaire. Ils tentent d'abord d'éviter les eaux hypoxiques ou si ce n'est pas possible, de réduire leur activité locomotrice. Si ces mesures ne suffisent pas, ils tentent de maintenir l'apport en oxygène en augmentant leur capacité à prélever l'oxygène de leur environnement. À mesure que la sévérité de l'hypoxie augmente, ils diminuent leurs dépenses énergétiques (activité locomotrice, digestion) puis finalement ont recours à la production d'énergie par la glycolyse en anaérobie (Jobling, 1994 ; Cooper et al., 2002 ; Wu, 2002). L'enclenchement de réponses adaptatives débute par la perception de la baisse des concentrations en oxygène. Les mécanismes impliqués sont étudiés depuis des dizaines d'années et bien que certains points soulèvent toujours des questions (Perry et al., 2009), les mécanismes généraux semblent aujourd'hui bien compris (Sundin et al., 2007). Chez les oiseaux et les mammifères, les chémorécepteurs permettant de détecter les concentrations sanguines en oxygène sont localisés dans un seul site : le glomus carotidien de l'artère carotide primitive (Milsom & Burlison, 2007). Chez les poissons, les cellules sensibles à l'oxygène sont localisées sur plusieurs sites, et peuvent être retrouvées tout le long du système respiratoire. La distribution exacte des sites impliqués varie de plus fortement selon l'espèce (Milsom & Burlison, 2007). Les NECs (cellules neuroépithéliales) localisées dans les branchies ont un rôle important comme chimiorécepteur (Perry & Gilmour, 2002 ; Sundin et al., 2007). Ces cellules similaires à celles du glomus carotidien des oiseaux et des mammifères permettent aux poissons de détecter les teneurs en oxygène à double sens, c'est-à-dire au niveau sanguin et dans leur environnement (Reid & Perry, 2003 ; Sundin et al., 2007).

Les réponses comportementales constituent une protection importante contre l'hypoxie. Les poissons peuvent par exemple tenter d'éviter la zone en hypoxie, réduire leurs activités comme l'alimentation et la reproduction ou encore compenser en exploitant l'air de surface riche en oxygène. Plusieurs poissons tropicaux habitants les étangs ou les petits cours d'eau pauvres en oxygène vont pratiquer ce que l'on appelle la respiration de surface aquatique. C'est-à-dire qu'ils agitent l'eau de surface par leur bouche et produisent ainsi une oxygénation de l'eau avec l'air (Kramer & McClure, 1982). D'autres espèces utilisent plutôt un mode de respiration dit bilatéral. En plus de pouvoir capter l'oxygène aquatique, ils prélèvent l'oxygène de l'air en l'avalant puis en la stockant dans ce que l'on appelle des « organes respiratoires ». Ces organes comparables à un poumon primitif sont en fait des modifications de structures déjà présentes ou encore néomorphiques qui permettent au poisson de stocker l'air dans des chambres richement vascularisées afin que le sang y soit réoxygéné (Johansen, 1970). La ventilation des branchies (hyperventilation) est par contre le moyen le plus utilisé pour oxygéner le sang des poissons. L'hyperventilation est sans aucun doute le mécanisme de défense le plus important en réponse à l'hypoxie chez la quasi-totalité des poissons osseux (Souza et al., 2001 ; Perry et al., 2009). Elle est rapidement activée et permet d'améliorer le prélèvement d'oxygène dissous en augmentant les taux d'échanges gazeux entre le sang et l'eau. C'est aussi par la ventilation branchiale que les poissons régulent leurs besoins en oxygène quotidien. Elle est donc influencée par plusieurs facteurs comme le stress, la température, la reproduction, la digestion ou encore l'exercice. En condition d'hypoxie, l'augmentation de la ventilation est souvent corrélée à une augmentation de la proportion de filaments respiratoires irrigués ou

lamelles branchiales (Jobling, 1994 ; Dalla Via et al., 1998 ; Wu, 2002), ce qui permet d'augmenter la surface d'échange gazeux entre l'eau et le sang. Des ajustements surviennent aussi au niveau de la capacité sanguine à fixer et redistribuer l'oxygène au sein de l'organisme par l'augmentation du nombre d'érythrocytes ainsi que des modifications fonctionnelles au niveau de l'hémoglobine (Brett & Blackburn, 1981 ; Nikinmaa, 2001 ; Wu, 2002 ; Wells, 2009). La bradycardie est aussi régulièrement observée et confère plusieurs avantages, dont celui d'augmenter le temps de résidence du sang oxygéné ainsi que l'économie d'énergie (Souza et al., 2001 ; Farrell, 2007 ; Wells, 2009). Toutes ces adaptations vont généralement permettre au poisson de maintenir un niveau d'oxygène adéquat à ses besoins. Si les niveaux d'oxygène sont trop faibles, alors il devra avoir recours à la production d'énergie par la glycolyse en anaérobie et nécessairement posséder les aptitudes à l'utilisation de cette voie moins efficace.

1.4.1 Adaptations au métabolisme anaérobie

Le registre aérobie est un concept physiologique qui reflète l'écart entre le minimum et le maximum d'oxygène qu'un organisme puisse consommer. Le registre aérobie se définit par deux autres termes : le taux métabolique standard (SMR) et le taux métabolique maximal (MMR). Ces deux termes font généralement référence à une valeur numérique déterminée à l'aide de mesures de consommation en oxygène d'un organisme (Fry, 1971 ; Schmidt-Nielsen, 1990). Le SMR représente le coût énergétique pour le maintien des fonctions essentiellement vitales (osmorégulation, synthèse des protéines, croissance, maintien de l'homéostasie, etc.). Il est en quelque sorte une estimation du coût minimum

requis en énergie pour qu'un organisme puisse se maintenir en vie (Enders et al., 2006). Le SMR reflète donc un aperçu des besoins minimaux en oxygène pour une espèce donnée (figure 1.4).

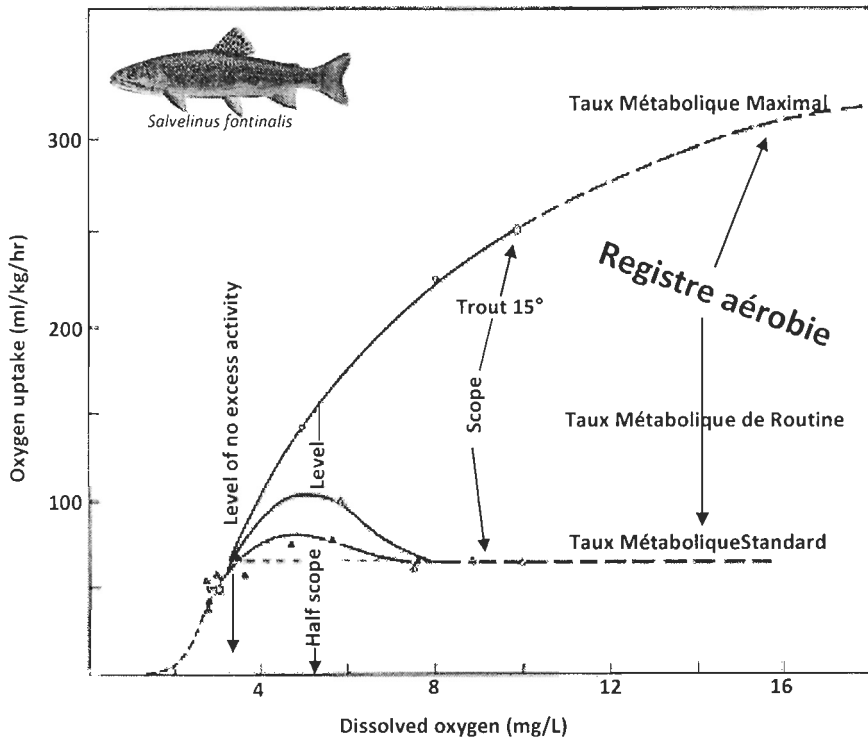


Figure 1.4. Registre aérobique, SMR et MMR de la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis* M.) par rapport aux différents teneurs en oxygène dissous (tirée et modifiée de Fry (1971)).

Le SMR est influencé par d'autres variables, tant au niveau individuel qu'environnemental (e.g. taille, température, salinité, saison) et n'est donc pas une valeur absolue. Le MMR représente pour sa part l'activité physiologique maximale que peut supporter un organisme et fait généralement suite à une activité physique intense. Le registre aérobique d'un organisme reflète donc sa marge de manœuvre pour des dépenses en

sus de l'activité minimale qu'implique le SMR, comme l'activité physique pour effectuer des migrations, capturer des proies, échapper à des prédateurs, digérer ses repas ou encore produire des gamètes. Étant donné que la plupart des organismes sont régulièrement actifs (déplacement, recherche de nourriture, digestion, etc.), leur consommation d'oxygène courante ou moyenne, appelée taux métabolique de routine, se situe au-dessus du SMR mais en dessous de MMR.

Lorsqu'un environnement ne contient pas suffisamment d'oxygène pour le maintien de son SMR, l'organisme devrait dès lors avoir recours à la voie de la glycolyse anaérobie afin de produire une partie de son énergie (Muusze et al., 1998). Cette dernière, en hypoxie encore plus sévère, voir en anoxie, devient chez les vertébrés, l'unique apport en ATP (Hochachka et al., 1996 ; Hochachka & Lutz, 2001). Dans le règne animal, certaines espèces ont développé des mécanismes leur permettant de survivre à ces conditions extrêmes pour de très longues périodes. Les stratégies utilisées sont basées sur des adaptations leur permettant de : 1) réduire leur besoin en ATP pour diminuer leur taux métabolique à des niveaux en dessous du SMR ou 2) d'augmenter et maintenir l'activité de la glycolyse anaérobie sur une longue période tout en optimisant la gestion de ses métabolites (Storey & Storey, 1990 ; Lutz & Nilsson, 1997 ; Hochachka & Lutz, 2001 ; Richards, 2009). Dans la plupart des cas, les organismes résistant à l'hypoxie n'utiliseront que rarement la deuxième stratégie car elle est plus exigeante au niveau adaptatif en plus d'exposer l'organisme à un déficit énergétique (Hochachka & Lutz, 2001). La grande majorité des vertébrés ne possède pas les aptitudes nécessaires à l'utilisation de l'une ou l'autre de ces stratégies et ne peut compter sur la glycolyse en anaérobie que pour de très

courtes durées, au risque de périr (Boutilier, 2001). Ces espèces ne sont donc pas adaptées à la survie sous leurs besoins minimaux en oxygène (SMR).

L'utilisation de la glycolyse en anaérobie comme unique apport en ATP impose des contraintes que seules les espèces spécialisées peuvent contourner (Hochachka et al., 1996). En règle générale, 95% de l'oxygène consommé par un poisson en normoxie est consacré à la production d'ATP mitochondriale (Richards, 2009). Lorsque l'oxygène est limitant, la production d'ATP par cette voie cellulaire est réduite et l'organisme se retrouve en déficit énergétique. Il tombe alors en dépression métabolique, ce qui nécessite plusieurs modifications cellulaires, physiologiques et comportementales. L'arrêt de l'alimentation qui s'en suit implique par exemple la possibilité à emmagasiner de grandes réserves énergétiques afin de subvenir pour de longues périodes à la demande élevée en glucose exigée par la glycolyse. Le carassin commun (*Carassius carassius* L.), bien connu pour sa tolérance à l'anoxie, stocke de grandes quantités de glycogène dans plusieurs tissus dont le foie en vue des longues périodes d'anoxie hivernale (Vornanen et al., 2009). Une autre contrainte importante est la production d'acide lactique. En effet, la régénération des NADH en NAD⁺ qui a normalement lieu lors de la phosphorylation oxydative est, en condition d'anaérobie, catalysée par la LDH qui convertit le pyruvate en acide lactique durant la dernière étape de la glycolyse. En hypoxie sévère, ce n'est pas seulement les cellules musculaires comme dans le cas d'une activité intense, mais toutes les cellules de l'organisme qui généreront de l'acide lactique. Cet acide doit donc être métabolisé ou évacué, car son accumulation provoque une diminution du pH sanguin (acidose lactique).

L'organisme doit ainsi posséder un système d'équilibre acide-base efficace en plus d'une tolérance physiologique aux variations du pH sanguin (Hochachka & Lutz, 2001).

La glycolyse en anaérobie est une voie cellulaire très ancienne du point de vue évolutif, permettant de produire de l'ATP en absence d'oxygène et qui est toujours utilisée par la plupart des organismes vivants. Elle est la principale voie énergétique chez les cellules ne possédant pas de mitochondries comme les bactéries ou encore les érythrocytes (Bratosin et al., 2001). Chez une majorité de vertébrés, son utilité principale se retrouve surtout au niveau musculaire pour soutenir les activités physiques intenses sur de courtes périodes. Pour les animaux à respiration aérobie facultative, l'utilisation de la glycolyse anaérobie est possible comme unique apport en ATP seulement que sur des bases périodiques et à trop long terme, conduit inévitablement à une mort par déficit énergétique.

1.5 OXYGENE ET STRESS OXYDATIF

Les dérivés réactifs de l'oxygène ou encore espèce réactive à l'oxygène (ERO) sont des radicaux provenant de réductions incomplètes de l'oxygène moléculaire. Ces molécules à charges instables peuvent être responsables de dommages cellulaires en interagissant avec diverses composantes cellulaires comme les protéines, les lipides ou encore les acides nucléiques. Bien que la production de ERO par la cellule soit un phénomène se produisant en permanence et de façon naturelle, certains facteurs peuvent contribuer à augmenter leur production (molécules chimiques, agents pathogènes, vieillissement, etc.). Lorsqu'il y a débalancement entre leur production et les mécanismes de défense cellulaires (systèmes

antioxydants), les dommages engendrés sont alors définis comme étant du stress oxydatif (Turrens, 2003). C'est principalement durant la respiration cellulaire et plus spécifiquement dans la chaîne de transport des électrons que la majeure partie des ERO sont quotidiennement produits. La mitochondrie étant le siège de la respiration aérobie, 90% des ERO y seraient générés (Liu et al., 2002 ; Balaban et al., 2005).

Lors de l'oxydation des équivalents réduits (NADH et FADH₂), les électrons sont normalement transférés aux complexes I à IV jusqu'à une molécule d'oxygène moléculaire. La réduction complète de cette molécule nécessite un apport de quatre électrons et aboutit à la formation de deux molécules d'eau (Beckman & Ames, 1998). Toutefois, ce système de transfert d'électrons comporte des sites comme les complexes I et III (Balaban et al., 2005), sensibles aux fuites d'électrons solitaires (figure 1.5).

Cytoplasm

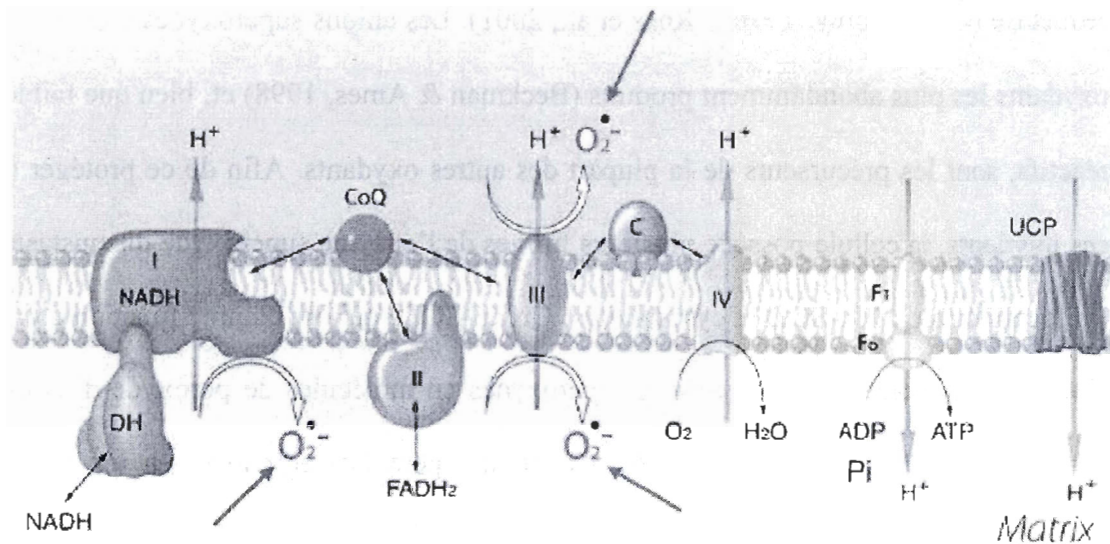


Figure 1.5. Schéma représentant les quatre complexes du système de transport des électrons. Certains sites laissent fuir des anions superoxydes O_2^- , réduction d'une molécule d'oxygène à un seul électron et précurseur d'autres radicaux libres (tirée et modifiée de Balaban et al. (2005)).

Ces électrons réagissent alors avec les molécules d'oxygène environnantes, ce qui conduit à la production de ERO. Étant donné que ces molécules sont dommageables, les cellules maintiennent en permanence des mécanismes de défense antioxydants pouvant être regroupés en trois classes : 1) ceux prévenant la formation de ERO, 2) ceux neutralisant les ERO et 3) ceux réparant les dommages cellulaires (Storey, 1996). Chez les molécules pouvant neutraliser les ERO, on retrouve celles de faibles poids moléculaires en provenance de l'alimentation comme les vitamines C et E. Les cellules possèdent aussi une vaste gamme de molécules comprenant notamment des enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) ou encore celles impliquées dans la

régulation du glutathione (GSH) comme la glutathione peroxydase (GPx) ou la glutathione reductase (GR) (Storey, 1996 ; Ross et al., 2001). Les anions superoxydes ($\cdot\text{O}_2^-$), sont les oxydants les plus abondamment produits (Beckman & Ames, 1998) et, bien que faiblement réactifs, sont les précurseurs de la plupart des autres oxydants. Afin de se protéger contre ces oxydants, la cellule possède plusieurs formes de l'enzyme superoxyde dismutase SOD (mitochondriale : Mn-SOD et cytosolique : Cu,Zn-SOD) qui ont comme fonction commune d'accélérer la conversion des anions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Guzy & Schumacker, 2006). Ce dernier peut interagir avec un ion métallique comme le cuivre et devenir l'oxydant naturel le plus dommageable : le radical d'hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) (Turrens, 2003). Il est donc important pour la cellule de maintenir les niveaux de H_2O_2 au plus bas. En condition normale, la majeure partie du H_2O_2 produit dans la mitochondrie y est rapidement neutralisé par la GPx ou le GSH (Turrens, 2003). Lorsque sa production est en excès, H_2O_2 diffusera dans le cytosol où il pourra être neutralisé par l'enzyme GPx cytosolique (Radi et al., 1991). Cette enzyme constitue ainsi la première ligne de défense contre les H_2O_2 . Cependant, contrairement à la SOD et la CAT, la détoxification de H_2O_2 par la GPx nécessite la présence de GSH pour aboutir à la production de glutathione disulfide (GSSG). Les stocks de GSH sont assurés par la réduction de GSSG, catalysé par la GR (figure 1.6) (Droge, 2002).

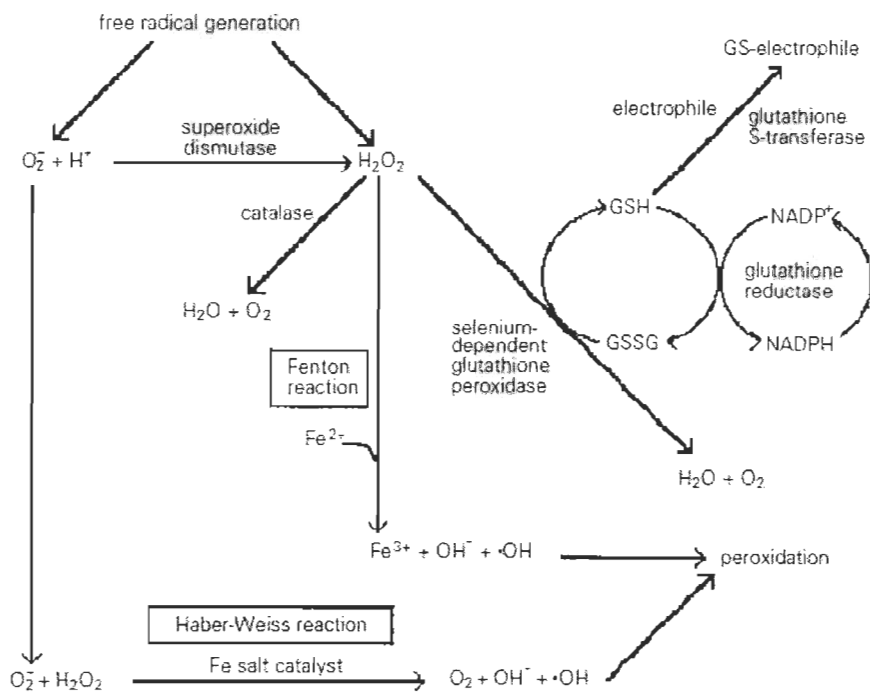


Figure 1.6. Résumé de différentes voies de générations de ERO et de certaines enzymes clés impliquées dans leur détoxification (tirée de Storey (1996)).

1.5.1 Adaptations au métabolisme anaérobie

Étant donné que la production ERO est proportionnelle à la quantité d'oxygène consommée (Gonzalezflecha & Demple, 1995 ; Storey, 1996), l'hypoxie devrait à première vue réduire la production de ERO. C'est cependant le contraire qui se produit, l'explication probable venant de l'hypothèse de la préparation au stress oxydatif, proposée par Hermes-Lima et al. (1998). Cette hypothèse prend son appui sur le fait que ce n'est pas l'hypoxie, mais plutôt la réoxygénation des tissus lors du retour en normoxie qui induit une hausse de la production de ERO. Cette hausse de production de ERO est d'ailleurs régulièrement observée chez les mammifères lors de la reperfusion de tissus en ischémie

(Bolli et al., 1989 ; Ferrari et al., 1990 ; Oliver et al., 1990), et peut être atténuée par l'ajout de molécules antioxydantes (Bolli et al., 1989 ; Przyklenk & Kloner, 1989 ; Lee et al., 2010). Ainsi, un organisme qui est naturellement confronté à des baisses de PO₂ artérielles et pouvant donc survivre en dépression métabolique devrait en théorie être adapté en prévision du choc oxydatif qu'il aura à subir lors du retour en normoxie. D'ailleurs, certaines espèces tolérantes à l'hypoxie semblent confirmer l'hypothèse de la préparation au stress oxydatif en exprimant une activité antioxydante supérieure en hypoxie qu'en normoxie, sans pour autant qu'une hausse du dommage oxydatif ne soit observée (Storey, 1996 ; Hermes-Lima et al., 1998 ; Lushchak et al., 2001 ; Cooper et al., 2002 ; Ferreira et al., 2003 ; Martinez-Alvarez et al., 2005).

1.6 OBJECTIFS

Cette étude a pour principal objectif de déterminer différents effets physiologiques de l'hypoxie chronique sur des spécimens adultes de loup tacheté et de l'hybride *A. minor* x *A. lupus*. Plus précisément, le projet vise à mesurer différents indicateurs du métabolisme énergétique, du stress oxydatif ainsi que la capacité antioxydante du loup de mer ainsi que de comparer les mesures de croissance et de condition après une exposition à quatre différentes teneurs en oxygène dissous (40, 50, 60 et ~100% sat.) pendant 14 semaines. Les indicateurs retenus sont la citrate synthase (CS), la lactate déhydrogénase (LDH) et la pyruvate kinase (PK) pour le métabolisme énergétique, l'aconitase (ACO), la glutathione

réductase (GR) et le contenu en malondialdéhyde (MDA) pour la capacité antioxydante et le stress oxydatif. Au niveau de la croissance, les principaux indicateurs retenus sont la croissance spécifique, l'indice de condition de Fulton's ainsi que l'indice hépatosomatique. Nous prévoyons que la croissance et les indices de conditions seront négativement affectés, autant chez le loup tacheté que chez l'hybride, selon la sévérité des niveaux d'hypoxie. L'hypoxie devrait aussi induire un ralentissement dans la consommation d'oxygène et donc d'une réduction de l'activité des enzymes du métabolisme énergétique. Les niveaux d'hypoxie utilisés dans le cadre de cette expérience ne seront par contre pas suffisants à activer le métabolisme anaérobie ce qui porte à croire qu'aucune hausse de la LDH ou de la PK ne devrait être observées, quelque soit le traitement en oxygène dissous. L'activité antioxydante devrait être supérieure dans les groupes en hypoxie, en préparation du retour en normoxie qui devrait induire une hausse du stress oxydatif, mais les dommages oxydatifs (TBARs et ACO) ne devraient être différents entre les traitements. Finalement, en s'appuyant sur la fonctionnalité mitochondriale de l'hybride *A. minor* x *A. lupus* démontré par Gaudreau et al. (In prep), rien ne laisse supposer à un dysfonctionnement majeur de l'hybride. De par sa proximité génétique et donc de sa similitude fonctionnelle à l'espèce mère, aucune différence notable ne devrait *a priori* être mesurée entre le loup tacheté et l'hybride.

CHAPITRE 2
EFFECTS OF LONG-TERM SUBLETHAL HYPOXIA EXPOSURE ON
GROWTH AND PHYSIOLOGY OF ADULT SPOTTED WOLFFISH
(*ANARHICHAS MINOR* O.) AND THE HYBRID (*A. LUPUS* x *A. MINOR*).

F Larouche*¹⁻², D Chabot², PU Blier¹ and NR Le François¹⁻³

1. *Département de biologie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, QC, G5L 3A1, Contact : larouche.francois@hotmail.com*
2. *Institut Maurice Lamontagne, Pêches et Océans Canada, Mont-Joli, QC, G5H 3Z4*
3. *Biodôme de Montréal, Montréal, QC, H1V 1B3*

2.1 ABSTRACT

The aim of this study was to examine growth, condition and some physiological responses of adult spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) and the hybrid *A. minor* x *A. lupus* to chronic sublethal hypoxia exposure. A total of 196 fish (65 spotted and 134 hybrids) were distributed among 16 tanks and exposed to four dissolved oxygen levels (40, 50, 60 and ~ 100 % air sat.) during 14 weeks. Each fish was tagged and the following measurements and calculations were made on each fish: mass and fork length, specific growth rate, Fulton's condition index, the hepatosomatic index and food intake in order to evaluate the fish physiological condition and growth rate. Other measurements were taken on a subset of 96 fishes to measure aerobic or anaerobic enzyme activity (citrate synthase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase), oxidative stress and antioxidant activity (aconitase, thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) and glutathione reductase) in white muscle and liver. In comparison to normoxia, all growth rates and condition parameters were negatively affected by hypoxia levels in both groups. Hypoxia levels were linked to a reduced food consumption, which explained the growth loss observed. Glycolytic enzymes displayed lower levels of activity only for the spotted wolffish, at 40 and 50 % sat. but no effects were observed on oxidative stress metabolism. These results suggest that wolffish's adaptive mechanisms are adequate to maintain sufficient oxygen extraction to support SMR but insufficient to maintain a large enough aerobic scope to allow normal food consumption and growth.

standard metabolism activity in moderate hypoxia, although growth loss was observed due to a reduction in food consumption which probably resulted from a reduction of the aerobic scope.

2.2 INTRODUCTION

Hypoxia (reduced levels of dissolved oxygen) is an increasingly common phenomenon in a wide range of aquatic systems (Wu, 2002 ; Diaz & Rosenberg, 2008 ; Diaz & Breitburg, 2009). The physico-chemical properties of water renders aquatic systems particularly susceptible to low levels and fluctuation of O₂ since it's diffusion is more than 1/10 000 slower and it's concentration 20-40 times less in water than in air (Nikinmaa, 2001). Hypoxia can be caused by many natural conditions that have in common the prevention of contact between water and air, such as ice coverage (Boutilier et al., 1997), low water mixing habitat (e.g. swamp, flooded forest) (Chapman & McKenzie, 2009) or vertical stratification of the water column (Rosenberg et al., 1991). However, it can also be attributed to anthropogenic activities (Rabalais et al., 2001 ; Wu, 2002). Excessive inputs of organic nutrients by human activities into water appear to be a relatively recent problem, dating from the middle of the 20th century, but one that is likely to worsen because of the continued growth of the human population. Therefore, hypoxia will likely get worse in the future (Wu, 2002).

Low levels of dissolved oxygen (DO) have been a powerful evolutionary force making fish particularly well adapted to survive hypoxia. Among all vertebrates, fishes probably show the largest number of hypoxia tolerant species (Richards, 2009). The high

diversity of their adaptations reflects the broad range of environments they inhabit. Interaction of behavioral, physiological, biochemical and morphological responses gives fish the flexibility that enables them to cope with fluctuations and shortages of O₂. Even if tolerance varies widely between species (Hochachka & Lutz, 2001 ; Lushchak & Bagnyukova, 2006), fish generally display an usual pattern of adaptive mechanisms in response to hypoxia (Dalla Via et al., 1998 ; Zhou et al., 2000 ; Wu, 2002 ; Dutil et al., 2007). To support their oxygen requirement or standard metabolic rate (SMR), fish should maintain an adequate blood O₂ delivery to tissues. Mechanism such as increasing gill ventilation and number of perfused gill lamellae (Dalla Via et al., 1994 ; Nilsson, 2007) or erythrocytes cells (Nikinmaa, 2001) can be initiated to improve O₂ extraction from water. When the O₂ level is insufficient to support normal activities, maximum metabolic rate (MMR) will fall as aerobic scope (Van den thillart et al., 1994 ; Muusze et al., 1998 ; Claireaux et al., 2000). Reduced aerobic scope involves a limited energy budget and fish usually compensate using behavioral responses such as reduced locomotion or physiological responses such as slower digestion (Jordan & Steffensen, 2007), a reduced food intake (Chabot & Claireaux, 2008 ; Mandic et al., 2009), or delayed reproduction (Wu et al., 2003). If all those strategies are still insufficient to maintain an adequate oxygen supply, only two metabolic strategies remain. Fish may decrease their metabolic rate below the SMR and thus severely down-regulate their ATP demand. This strategy is used by a wide range of hypoxia tolerant species and will favor a reduced energy turnover. The second strategy is less frequently used and will relying to the anaerobic glycolytic pathway as a main ATP supplier (Hochachka et al., 1996 ; Dalla Via et al., 1998).

Adjustments in aerobic/anaerobic metabolism can correlate with reversible activity of key metabolic enzymes. For example, many authors have reported an increase of the anaerobic enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH) in specific tissues of different fish exposed to hypoxia (Zhou et al., 2000 ; Cooper et al., 2002 ; Chippari-Gomes et al., 2005 ; Martinez et al., 2009), or a decrease in citrate synthase (CS) activity associated with a reduction of the aerobic metabolism (Zhou et al., 2000 ; Chippari-Gomes et al., 2005 ; Rutjes et al., 2007). Alteration of the mitochondrial electron transport system (ETS) rate by hypoxia or mainly hypoxia-normoxia transition may also lead to an important increase of partially reduced oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-) or hydrogen peroxide (H_2O_2) (Chandel et al., 2000 ; Lushchak et al., 2005 ; Lushchak & Bagnyukova, 2006 ; Lushchak & Bagnyukova, 2007). Oxidative stress occur when an over production of ROS disturbs the ratio between ROS and antioxidant defenses and induces damage to cellular constituents such as lipids, proteins or nucleic acids that can be harmful to the organism. Cellular ROS are normal by-products of aerobic metabolism and many enzymes or low molecular weight molecules such as carotenoids and vitamins control their production (Grune et al., 2005). Enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) or enzymes implicated in the glutathione cycle are good example of cellular oxidant protection. Increases of the antioxidant activity in fish exposed to hypoxia have been frequently observed (Lushchak et al., 2001 ; Cooper et al., 2002 ; Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002 ; Wilhelm et al., 2005). Based on the hypothesis of the «preparation for oxidative stress» postulated by Hermes-Lima et al. (1998), well hypoxia-adapted fish will enhance their antioxidant activity when exposed to low dissolved oxygen (DO), as a

preparatory mechanism to deal with the rapid increase of ROS production when returning to normoxic conditions (Bolli et al., 1989 ; Ferrari et al., 1990 ; Oliver et al., 1990). This hypothesis is supported by many other studies in which a higher antioxidant activity was observed in fish exposed to hypoxia compared to normoxia (Storey, 1996 ; Lushchak et al., 2001 ; Cooper et al., 2002 ; Ferreira et al., 2003 ; Martinez-Alvarez et al., 2005).

Spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) is an endangered demersal fish of the northern Atlantic ocean and has been identified as an interesting new candidate for cold marine aquaculture (Le François et al., 2002). This species appears to be tolerant to hypoxia since Foss et al. (2002) observed that wolffish still maintained acceptable growth rates at O₂ concentrations of 4 mg/L (~ 40% air saturation (sat. therein)), during a 11 weeks experiment. The decreased in weight gain compared to the normoxic group was mainly explained by a reduction in feed intake, presumably because digestion proceeded at a slower pace due to the lowered aerobic scope. Another study by Lays et al. (2009) evaluated the stress response of the spotted wolffish potentially induced by hypoxia. After a short exposure to hypoxic conditions (60, 40 and 20 % sat.), the most severely hypoxic group showed a higher blood cortisol concentration.

Recently, interest was given to the hybrid of the spotted and the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus* L.). The combination or the improvement of desirable trait in one species is a common procedure in aquaculture (Bartley et al., 2000 ; Goyard et al., 2008). Atlantic wolffish have an aggressive behaviour at high density and have a lower growth rate compared to spotted wolffish. However, their higher level of plasma antifreeze protein,

could be a valuable marine by-product in aquaculture production (Desjardins et al., 2007). It has been suggested that wolffish can hybridize in nature (Lohmann, 1954 ; Templeman, 1986) but until now no wild specimen was reported as genetically hybrid (Imslund et al., 2008). However, different hybrid families have been produced at the Centre Aquacole Marin de Grande Rivière, Qc, Canada (CAMGR). Studies on the early-life of hybrid wolffish have focussed on the mitochondrial functional incompatibilities and concluded that hybrid was viable (Gaudreau et al., 2009 ; Gaudreau et al., In prep.).

The objective of the present study was to investigate the effect of chronic exposure of spotted wolffish and the hybrid *A. lupus* x *A. minor* (hereafter "hybrid") to different levels of moderate hypoxia (40, 50, 60 sat. and normoxia (~ 100% sat.)). The studies of Foss et al. (2002) and Lays et al. (2009) reveal that chronic moderate hypoxia levels affect specific growth rate and cortisol response of the spotted wolffish. In the present study, the objective was to evaluate a wider range of indicators of the metabolism stress as well as different growth index, on different sized wolffish. Except for Gaudreau et al. (In prep.), this is the first report to describe and compare different physiologically functional markers between hybrid *A. minor* x *A. lupus* and the spotted wolffish. We measured growth and condition (hepatosomatic index (HIS), food ingestion (g days⁻¹/ tank) and by comparing final and initial values for the total mass (M_T), the fork length (L_F), the specific growth rate (SGR) and the Fulton's condition (K). We also measured the haematocrit levels, the activity of the citrate synthase (CS) as aerobic metabolism activity indicator, the glycolytic enzymes lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate kinase (PK) and the antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione reductase (GR). Oxidative damage was

determined with the aconitase (ACO), a very sensitive enzyme to oxidative damage (Gardner & Fridovich, 1991), and the levels of the malondialdehyde (MDA) with the thiobarbituric acid reactive substance assay (TBARs), which is an index of lipid peroxidation by the oxidative stress.

This research propose to evaluate the hypothesis that high DO levels would correlate positively with growth (SGR, L_F , M_T), condition (Fulton's K and HIS) as well as activity of metabolic enzymes. No change in the glycolytic enzymes PK and LDH activity are expected because hypoxia levels were not severe enough to trigger the initiation of anaerobic metabolism. In preparation for the potential increase in oxidative stress upon a return to normoxia, antioxidant activity was expected to be higher during hypoxia exposure. Finally, spotted wolffish and hybrids should not differ from each other for the dependent variables that were measured due to the relative closeness of the species genetic. To our knowledge, this is the first report about the physiological impact of hypoxia on adult spotted wolffish and hybrid *A. minor* x *A. lupus* and their tolerance, when exposed to chronic hypoxia.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Acclimatation and control group

Experimental fish are offspring of 10-15 years old wild captive spotted and Atlantic wolffish captured in Canadian waters and maintained by the Université du Québec à Rimouski (UQAR) as broodstock at the Centre Aquacole Marin (Grande-Rivière, QC,

Canada) operated by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). In summer 2009, 198 fish ($n = 63$ spotted and 135 hybrids) weighing 0.4-2kg were transferred at the Maurice-Lamontagne Institute aquaculture facilities (MLI, Mont-Joli, Qc, Canada). During the one month acclimation period, fish were fed at maintenance rations with frozen shrimps (*Pandalus borealis* P.) in combination with a commercial diet (CoreyAqua, 7.5-13 mm, Fredericton, Canada). On day 15 of the acclimation period, all fish were anaesthetized using Aquacalmtm (Western Chemical, USA), tagged internally (Passive Integrated Transponder, PIT tag, Biomark, Idaho, USA). Therefore, fish was measured (fork length, L_F in cm) and weighted (total mass in g (± 0.1)). A small part of the dorsal fin was removed for genetic analyses in order to definitely discriminate the hybrids from spotted wolffish. All procedures on live fish were approved by the IML's animal care committee (CPA) 09-02.

2.3.2 Experimental setup

After the acclimatation, fish were distributed among 16 circular tanks (800 l, 0,8 m²) organized in four semi-recirculating water systems. Each tank housed around eight hybrids and four spotted wolffish for an overall density of ~ 25 kg/m². Four different DO levels (40, 50, 60 & $> 80\%$ sat.) were randomly assigned to the 16 tanks (four replicates), across four water lines (randomized block design). This experiment did not considerate severely DO levels because a related experiment (Jetté et al., 2010) was also conducted to determinate the hypoxia CL_{50} and critical PO_2 of the spotted wolffish. Moreover, this experiment considerate that levels below 40% sat. are not representative of moderate hypoxia. During

the experiment, fish were feed three times a week and attention was given on each tank to evaluate when fish were satiate. Food was weighted before and after each feeding in order to measure the ingestion rate. Water intake for each tank went through a gas exchange column. Dissolved oxygen was measured with computer in each tank (Oxyguard model 420 galvanic oxygen electrode, Bikerød, Denmark) once every 5 min and adjusted the mix of air and nitrogen injected into each column to maintain target DO levels. DO levels were also frequently measured with a portative oxygen probe (YSI Professional plus, galvanic probe, model 605000, Yellow Springs, USA). Furthermore, DO was measured by Winkler titration (Jones et al., 1992) on seven occasion. Computer or electrical problems caused DO control to fail on five occasions, which resulted in periods of normoxia in all tanks lasting several hours at each occurrence (total of about 15 days in normoxia) on the overall experimental period that lasted 102 days. Table 2.1 summarizes experimental conditions whereas wolffish mean mass (g), fork length (cm) and Fulton's condition (K) at the beginning of the experiment are reported on table 2.2. One way analysis of variance (ANOVA) on initial fish size and condition confirm that fish were similar across tanks on the beginning of the experiment (weight $p > 0.946$, length $p > 0.948$ and Fulton's condition > 0.75).

Table 2.1. Oxygen and temperature parameters during the experiment.

Treatment (% O ₂)	Tanks	<i>n</i>		O ₂ ¹ (% saturation)	Temperature ¹⁻² (°C)
		Hyb	Spot		
40	A2	9	5	39.96 ± 0.01	7.64 ± 0.003
40	B3	8	3	38.72 ± 0.01	7.65 ± 0.004
40	C1	8	4	40.18 ± 0.02	7.65 ± 0.002
40	D4	9	3	39.69 ± 0.01	7.49 ± 0.007
50	A1	9	4	47.05 ± 0.02	7.6 ± 0.005
50	B4	9	3	50.67 ± 0.02	7.57 ± 0.003
50	C3	9	4	49.87 ± 0.02	7.63 ± 0.005
50	D2	8	4	51.16 ± 0.03	7.43 ± 0.003
60	A4	7	3	56.64 ± 0.05	7.46 ± 0.005
60	B1	8	4	58.65 ± 0.01	7.41 ± 0.005
60	C2	8	4	55.52 ± 0.03	7.57 ± 0.007
60	D3	9	3	59.68 ± 0.01	7.7 ± 0.004
100	A3	9	5	93.2 ± 0.04	7.57 ± 0.003
100	B2	6	4	85.98 ± 0.02	7.65 ± 0.005
100	C4	8	5	84.92 ± 0.03	7.68 ± 0.005
100	D1	9	5	88.03 ± 0.03	7.4 ± 0.005

¹. Computer based measurements taken every 5 min ($n = \sim 53760$) and corrected using 7 series of Winkler titration.

². Measured daily on week days using Fluke 51II thermometer. Data are reported as mean ± SEM.

Table 2.2. Mass (M), length (L_F) and Fulton's condition (K) of spotted wolffish at the beginning of the experiment in each tanks.

O ₂ levels	# Tanks	n	Spotted wolffish			n	Hybrid		
			M (g)	L_F (cm)	ΔK		M (g)	L_F (cm)	ΔK
40 % sat.	A2	4	1214 ± 161	48.7 ± 1.6	1.03 ± 0.5	9	663 ± 108	40.5 ± 2.1	0.89 ± 0.05
	B3	4	990 ± 287	44.6 ± 4.3	1.04 ± 0.03	8	736 ± 143	42.1 ± 2.4	0.89 ± 0.03
	C1	4	990 ± 289	48.2 ± 4.1	0.94 ± 0.02	8	712 ± 164	41.1 ± 2.5	0.91 ± 0.04
	D4	5	990 ± 379	44.5 ± 7.6	0.95 ± 0.05	9	801 ± 111	43.3 ± 2	0.94 ± 0.04
50 % sat.	A1	5	758 ± 229	41.7 ± 3.7	0.98 ± 0.03	9	712 ± 110	41.8 ± 1.8	0.9 ± 0.04
	B4	4	798 ± 349	43 ± 5.2	0.88 ± 0.07	6	616 ± 128	39.3 ± 2.4	0.89 ± 0.03
	C3	4	943 ± 404	42.4 ± 6.2	0.94 ± 0.10	8	694 ± 112	41.6 ± 1.9	0.89 ± 0.03
	D2	4	762 ± 252	41.6 ± 4.1	0.92 ± 0.08	8	722 ± 102	42.1 ± 1.9	0.92 ± 0.03
60 % sat.	A4	5	1380 ± 331	50.9 ± 3.1	0.99 ± 0.09	9	704 ± 88	42.5 ± 1.5	0.88 ± 0.03
	B1	3	1002 ± 130	47.4 ± 2.1	0.93 ± 0.01	8	643 ± 111	40.6 ± 1.9	0.90 ± 0.03
	C2	4	1083 ± 250	47.5 ± 3.4	0.94 ± 0.06	9	614 ± 119	39.1 ± 1.7	0.94 ± 0.04
	D3	3	1090 ± 384	45.4 ± 5.5	1.03 ± 0.06	9	888 ± 126	44.9 ± 1.6	0.94 ± 0.05
100 % sat.	A3	3	1026 ± 209	46.1 ± 3.2	0.96 ± 0.05	7	671 ± 106	40.8 ± 2.2	0.91 ± 0.03
	B2	3	1101 ± 200	48.7 ± 2.4	0.92 ± 0.03	9	612 ± 100	39.7 ± 2	0.94 ± 0.02
	C4	5	1185 ± 272	46.7 ± 3.8	1.09 ± 0.05	8	740 ± 113	42.6 ± 1.7	0.9 ± 0.04
	D1	3	1379 ± 286	49.8 ± 3.2	1.04 ± 0.07	9	762 ± 95	42.1 ± 1.5	0.98 ± 0.05
Control group		9	1471 ± 98	50 ± 1.5	1.18 ± 0.05	9	604 ± 86	40.1 ± 1.7	0.88 ± 0.03

Data are shown as mean ± SEM.

2.3.3 Blood and tissue sampling

At the end of the acclimation period, (Day 0 of the experiment), nine hybrid and nine spotted wolffish (initial control group) were anaesthetized, weighted and measured. Blood was sampled with an heparinised syringe in the caudal vein. Then, fish were killed by a sharp blow to the head for liver and white skeletal muscle sampling. Microhematocrit centrifugation was rapidly performed on blood samples using capillary tubes (ClearCRIT #270-107). Liver and gonads were weighted and all tissues immediately frozen in liquid nitrogen, and then transferred to -80°C for further analysis. Six fish per tank (three hybrids and three spotted) were also selected for blood haematocrit sampling at the day 73 and sacrificed at day 102 for tissues sampling, as described above. All the fish was also weighted and measured at day 102.

2.3.4 Biochemicals assays

Liver and white muscle were thawed and homogenized one minute on ice in 100 mM Tris-HCL buffer, ph 7.8 (1:10 w/v) and centrifuged (Thermo IEC Micromax. RF) at 4 °C, 18 000 g, 10 minutes. The supernatant was carefully removed and stored in a separate tube at -80 °C for further analysis. All enzymatic activities were analyzed using a spectrophotometer (Ultrospec™ 2100 pro) at 15 °C in duplicata, using an optimized protocol for each tissue. TBARs assay were analyzed in duplicata using a spectrofluorometer (Hitachi F-2500). The measurement of PK activity (EC.2.7.1.40) was based on reduction of the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) by NADH. The reaction was initiated by the addition of NADH (0.15 mM) and phosphoenolpyruvate (PEP)

(5 mM) and measured at 340 nm (Pelletier et al., 1994). LDH activity (EC.1.1.1.27) was determined by reduction of the NAD^+ by NADH, initiated by the addition of NADH (0.16mM) and pyruvate (0.4 mM) at 340 nm (Thibault et al., 1997). The CS activity (EC.4.1.3.7) was based on the transfer of the sulphhydryl groups to 5,5 dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). The reaction was activated by DTNB (0.1 mM) and acetyl-CoA (0.1 mM), measured at 412 nm (Thibault et al., 1997). The ACO activity (EC.4.2.1.3) was assayed by the formation rate of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH) and the reaction was initiated by chloride manganese MnCl_2 (0.6 mM), sodium citrate (5 mM) and NADP^+ (0.2 mM) at 340 nm (Miwa & Brand, 2005). The CAT activity (EC.1.11.1.6) was performed with the diminution of hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration. Activity was measured at 240 nm in quartz cuvettes (Orr & Sohal, 1992). The GR activity (EC.1.6.4.2) was measured by the oxidation of NADPH and the reaction was initiated by reduced glutathione GSH (1.2 mM) and NADPH (0.06 mM), and read at 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1985). The concentration of thiobarbituric acid reactive substances was quantified using an assay kit (Zeptometric Corporation, catalog# 0801192): malondialdehyde made adduction with thiobarbituric acid, which was measured using a fluorometer, at 550 nm, in quartz cuvettes. LDH, PK and GR are reported in mol of NADH oxidized and CS in reduced DTNB by g^{-1} of wet tissue. The extinction coefficient of NADH/NADPH was 6.22 and DTNB 13.6. MDA content was expressed as nmol/ml. The total protein content of all homogenate were determined using the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985) in order to report the enzymatic activities as U mg^{-1} protein. However, laboratory problem occurred and enzymatic activities were report in U g^{-1} fish.

2.3.5 Statistical procedure

Growth and condition indicators were calculated as follows (Foss et al., 2002):

Specific Growth Rate (SGR):

$$\text{SGR (\% day}^{-1}\text{)} = 100[(\ln(M_{t4}) - \ln M_{(t0)}) / \text{duration}]$$

where M_{t0} and M_{t4} are mean mass (g) at the beginning (time 0) and the end (time 4)

of the experiment and duration is $t4-t0$ or 102 days.

Fulton's condition factor (K):

$$K = (M/L_F^3) * 100$$

where M = mass and L_F = fork length (Nash et al., 2006).

Hepatosomatic index (HSI)

$$\text{HSI} = M_L / (M - M_g) * 100$$

where M_L = liver mass, M (g) = total mass of the fish and M_g = mass of the gonads (g).

Effects of DO treatment and fish group on growth and conditions (mass, length, hepatosomatic index, Fulton's factor, specific growth rate and feed intake) and biochemical parameters (citrate synthase, pyruvate kinase, glutathione reductase, lactate dehydrogenase, aconitase, TBARs content and haematocrit levels) were analyzed using a linear mixed effects model (LME), with DO treatment and fish group as fixed factor and tank as a nested factor with treatments (DO). When the overall test was significant, Tukey posteriori

comparisons of means was used to identify which groups differed from the control group. The significance level was set to 0.05. All analyses were performed using R software (R Development Core Team, 2010), with NLME (Pinheiro et al., 2010) and MULTCOMP (Hothorn et al., 2008) packages for mixed models and multiple comparisons respectively. SigmaPlot 11.2 (Systat Software, 2009) was used to produce graphics.

2.4 RESULTS

2.4.1 Growth and condition

Condition factor (K), SGR, HSI and mean food consumption by treatment are reported in table 2.1. These variables are affected by DO for spotted and hybrid wolffish.

Table 2.3. Condition factor, SGR, HIS and feed consumption of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days.

O ₂ levels	Δ Fulton's condition (K)	Specific growth Rate (% d ⁻¹)	Hepato-somatic index (%)	Ingestion rate (g day ⁻¹ / tanks)
<i>A. minor</i>				
Initial group			2.28 ± 0.21*	
40%	0.02 ± 0.01	0.048 ± 0.09*	2.38 ± 0.14*	27.78 ± 1.3
50%	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.012*	2.69 ± 0.11*	39.09 ± 2.7
60%	0.16 ± 0.02	0.123 ± 0.012*	3.25 ± 0.19*	44.35 ± 2.4
100%	0.19 ± 0.02	0.139 ± 0.012*	3.45 ± 0.21*	59.96 ± 1.8
Hybrid				
Initial group			2.54 ± 0.25	
40%	0.06 ± 0.01	0.101 ± 0.008	3.39 ± 0.15	
50%	0.13 ± 0.01	0.152 ± 0.009	3.63 ± 0.20	
60%	0.16 ± 0.01	0.155 ± 0.008	3.72 ± 0.21	
100%	0.16 ± 0.01	0.164 ± 0.01	4.02 ± 0.3	

Significant differences from the normoxic group (100%) are reported in bold and when differences occurred between fish groups by * (< 0.05). Hybrid and spotted wolffish are pooled in food consumption data. Data are shown as mean ± SEM.

Fish group and treatment both influenced SGR and HIS. All hypoxic treatments were different (< 0.0002) from the 40% sat. group for SGR, while difference between fish group were significant (< 0.0001) (Figure 2.1). Difference in size and condition occurred during the experiment and in Δ mass occurred between treatment (< 0.0001) but it appears to be especially marked on spotted wolffish (significant interaction: < 0.0001), particularly in

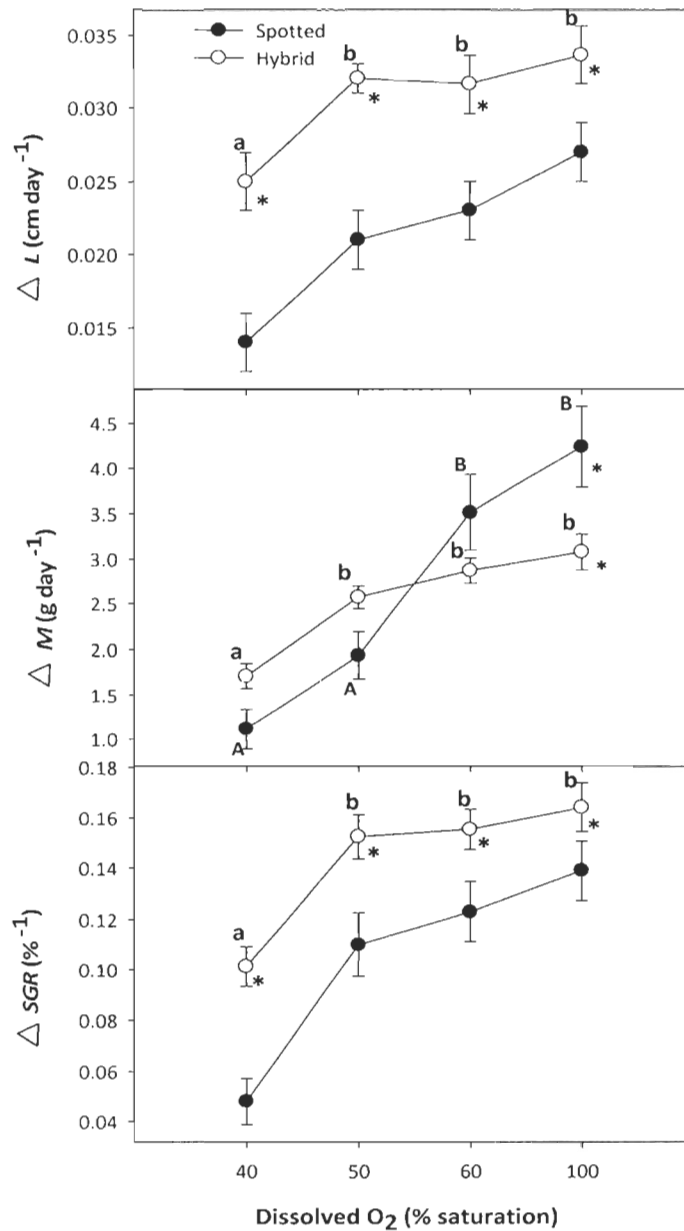


Figure 2.1. Relationship between Δ length (A), Δ mass (B) and specific growth rate (C) relative to dissolved oxygen on spotted wolffish and the hybrid *A. minor* x *A. lupus*. Means with the same letters did not differ significantly and difference between fish group are represented by *. Linear mixed model give a positive interaction between oxygen treatment and fish group for Δ mass data. Further analysis give difference in Δ mass fish group only at 100 % sat. Error bars are standard error of the mean (SEM).

60 and 100 % sat. treatment (figure. 2.1). Length is mostly affected by group fish (< 0.0001) as well as 40% sat. treatment differ from the others treatment (< 0.0033) for length (figure 2.1).

Livers tended to be smaller in hypoxic groups, especially for spotted wolffish whereas hybrid display a higher HIS index (< 0.0001). However, no significant difference occurred between oxygen treatment except for the initial group who have a lower HIS index compare to the 50%, 60% and 100% sat (< 0.0005) (figure 2.2). Oxygen levels also affected ΔK during the experiment (< 0.0001), although a significant interaction was observed (< 0.0344). A higher Fulton's condition is nerveless observed in severless hypoxia treatment (figure 2.2).

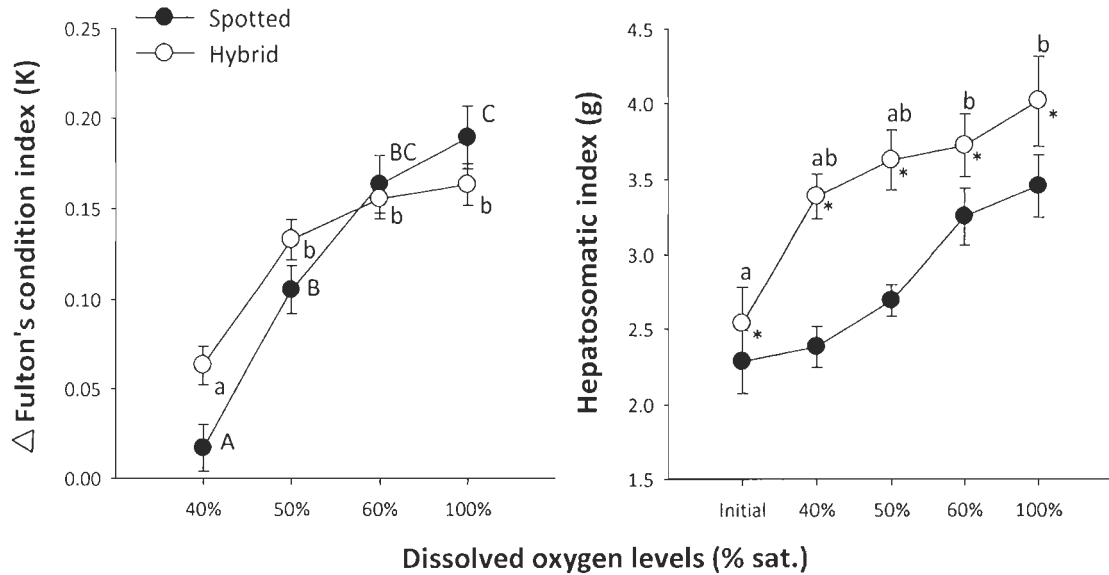


Figure 2.2. Relationship between Δ condition factor (K) and hepatosomatic index (HSI) relative to dissolved oxygen levels on spotted wolffish and the hybrid *A. minor* x *A. lupus*. Means with the same letters did not differ significantly and differences between fish groups are represented by *. Linear mixed model gave a significant interaction between oxygen treatment and fish group for Δ K. Error bars are standard error of the mean (SEM).

2.4.2 Biochemical parameters

Muscle and liver enzymatic activities and biochemical parameters are given in table 2.4 and 2.5 respectively.

Tableau 2.4. Activity of CS, PK, LDH and ACO at four different DO levels in muscle of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days.

O ₂ levels	Muscle			
	CS	PK	LDH	ACO
<i>A. minor</i>				
Initial group	1.42 ± 0.26	110.22 ± 8.74*	513.38 ± 28.79*	0.32 ± 0.06
40%	2.02 ± 0.28	86.5 ± 8.28*	472.82 ± 23.03*	0.33 ± 0.07
50%	2.16 ± 0.24	93.96 ± 8.41*	431.16 ± 19.33*	0.39 ± 0.07
60%	2.12 ± 0.26	113.11 ± 13.38*	588.19 ± 35.09*	0.45 ± 0.06
100%	1.66 ± 0.22	127.84 ± 8.74*	543.83 ± 30.63*	0.21 ± 0.03
Hybrid				
Initial group	1.9 ± 0.47	156.54 ± 10.04	637.46 ± 38.28	0.41 ± 0.08
40%	2.31 ± 0.27	157.59 ± 11.38	658.35 ± 33.38	0.35 ± 0.05
50%	1.91 ± 0.19	163.95 ± 6.01	640.87 ± 23.09	0.4 ± 0.09
60%	2.09 ± 0.27	161.96 ± 19.57	691.71 ± 51.05	0.30 ± 0.06
100%	2.29 ± 0.27	176.23 ± 15.31	655.24 ± 45.01	0.39 ± 0.06

Enzymatic activities are given as U g⁻¹ tissue. Significant differences between fish groups are represented by *. Value are given as mean ± SEM.

Tableau 2.5. Activity of CS, PK, GR, ACO and MDA content at four different DO levels in liver of spotted wolffish and hybrid exposed to different oxygen levels during 102 days.

O ₂ levels	Liver				
	CS	PK	GR	ACO	MDA (nmol/ml)
<i>A. minor</i>					
Initial group	0.99 ± 0.04*	3.84 ± 0.24	0.56 ± 0.02	0.74 ± 0.05*	60.11 ± 1.18*
40%	1.01 ± 0.04*	2.54 ± 0.29	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.03*	60.6 ± 0.93*
50%	0.94 ± 0.03*	2.56 ± 0.28	0.47 ± 0.03	0.52 ± 0.03*	57.93 ± 0.84*
60%	0.98 ± 0.04*	2.69 ± 0.26	0.48 ± 0.02	0.53 ± 0.4*	57.85 ± 1*
100%	0.96 ± 0.02*	2.88 ± 0.25	0.46 ± 0.03	0.56 ± 0.2*	57.9 ± 0.88*
Hybrid					
Initial group	1.1 ± 0.04	6.54 ± 0.41	0.46 ± 0.04	0.65 ± 0.04	56.19 ± 0.61
40%	1.04 ± 0.03	2.95 ± 0.22	0.54 ± 0.02	0.43 ± 0.03	55.17 ± 0.64
50%	1.01 ± 0.05	3.39 ± 0.24	0.55 ± 0.02	0.43 ± 0.03	54.88 ± 0.55
60%	0.99 ± 0.03	4.36 ± 0.24	0.56 ± 0.02	0.47 ± 0.03	55.25 ± 1.07
100%	1.02 ± 0.06	3.74 ± 0.22	0.5 ± 0.02	0.47 ± 0.04	54.74 ± 0.59

Enzymatic activities are given as U g⁻¹ tissue. Significant differences between fish groups are represented by *. Value are given as mean ± SEM.

No significant differences were observed between the hypoxic and the normoxic groups on any of the biochemical parameters measured in either muscle or liver tissues of spotted or hybrid wolffish (figure 2.3 & 2.4) except for the liver PK activity (figure 2.3). However, this difference was mainly linked to the control group which was higher than experiment treatments, although the 60% sat. treatment also differed from the 40% sat. (< 0.003). For the same analyses, mixed model showed positive interaction between treatment and group fish ($< 0.5 \times 10^{-4}$). Variability within DO treatments and groups were high for CS activity in both liver and muscle as well as ACO activity in muscle (figure 2.3). However, difference between fish groups were observed when variability tended to be low [PK activity in muscle (< 0.0001) and ACO activity in liver (< 0.0004)]. A difference in fish groups was also observed in muscle CS activity (< 0.02), however the very high variability make this observation not really relevant (figure 2.3).

Differences between spotted wolffish and hybrid were observed for the LDH muscle activity (< 0.0001), which was significantly lower in spotted wolffish. On the other hand, liver lipid peroxidation (MDA content) was higher in spotted wolffish (< 0.0001) (figure 2.4). No differences were observed for the antioxidant enzymes GR activity (figure 2.4) as well as the erythrocytes levels between fish groups nor treatments, although higher levels were observed in the hypoxic groups, especially for the October sampling (figure 2.5). Finally, a one way analyses of variance (ANOVA) showed differences (< 0.0001) between DO levels on food weigh ingestion (figure 2.6). Finally, ingestion rate affect mass gain (figure 2.6) but no relationship was found between glycolytic enzymes activities and size fish (figure 2.7).

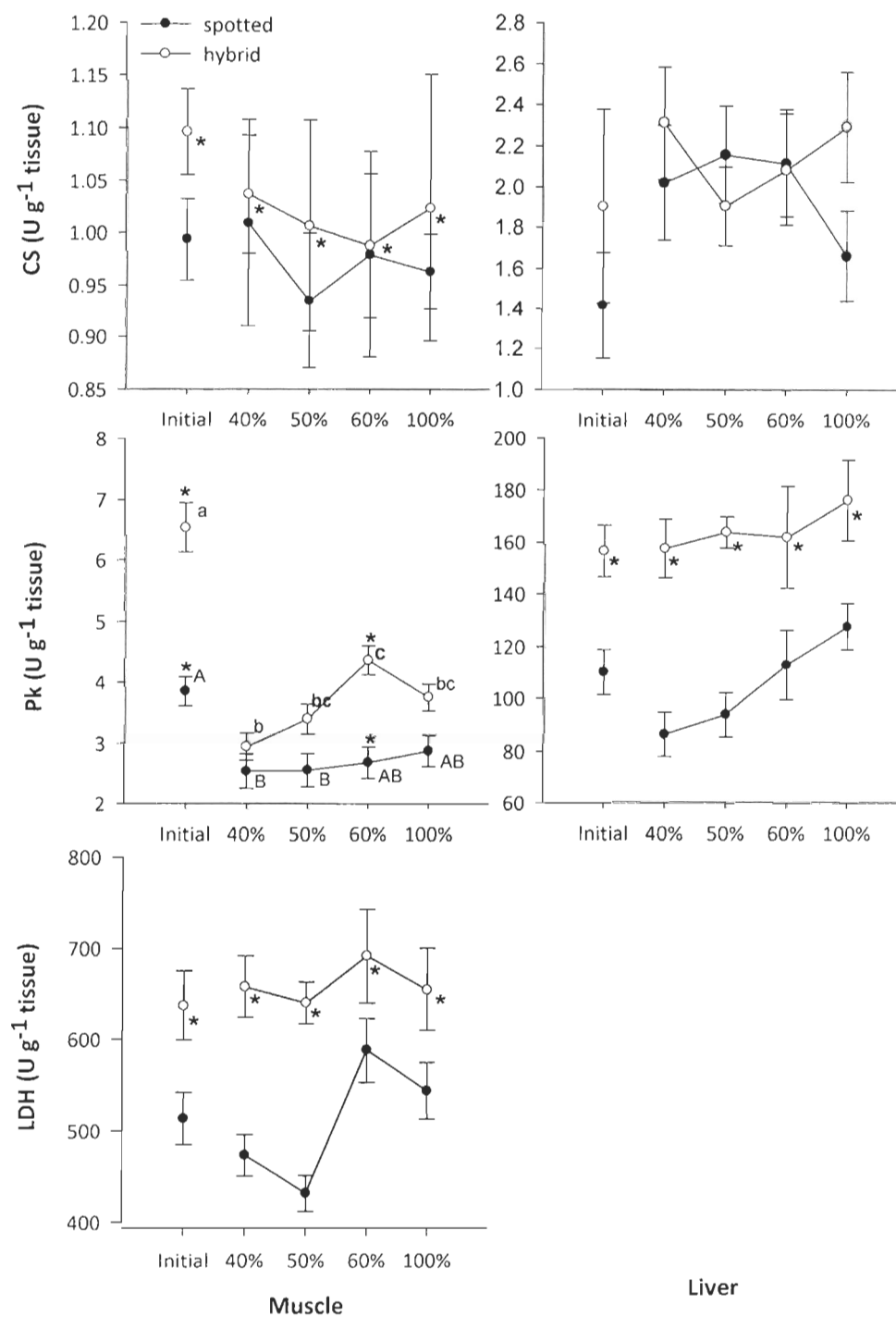


Figure 2.3. Relationship between CS, PK, and ACO activity on muscle and liver of spotted and hybrid wolffish at different DO levels ($U\ g^{-1}\ tissue$). Means with the same letters or no letters did not differ significantly and differences between fish groups are represented by *. There was no difference across treatments except for PK in liver. Error bars are standard errors of the mean (SEM).

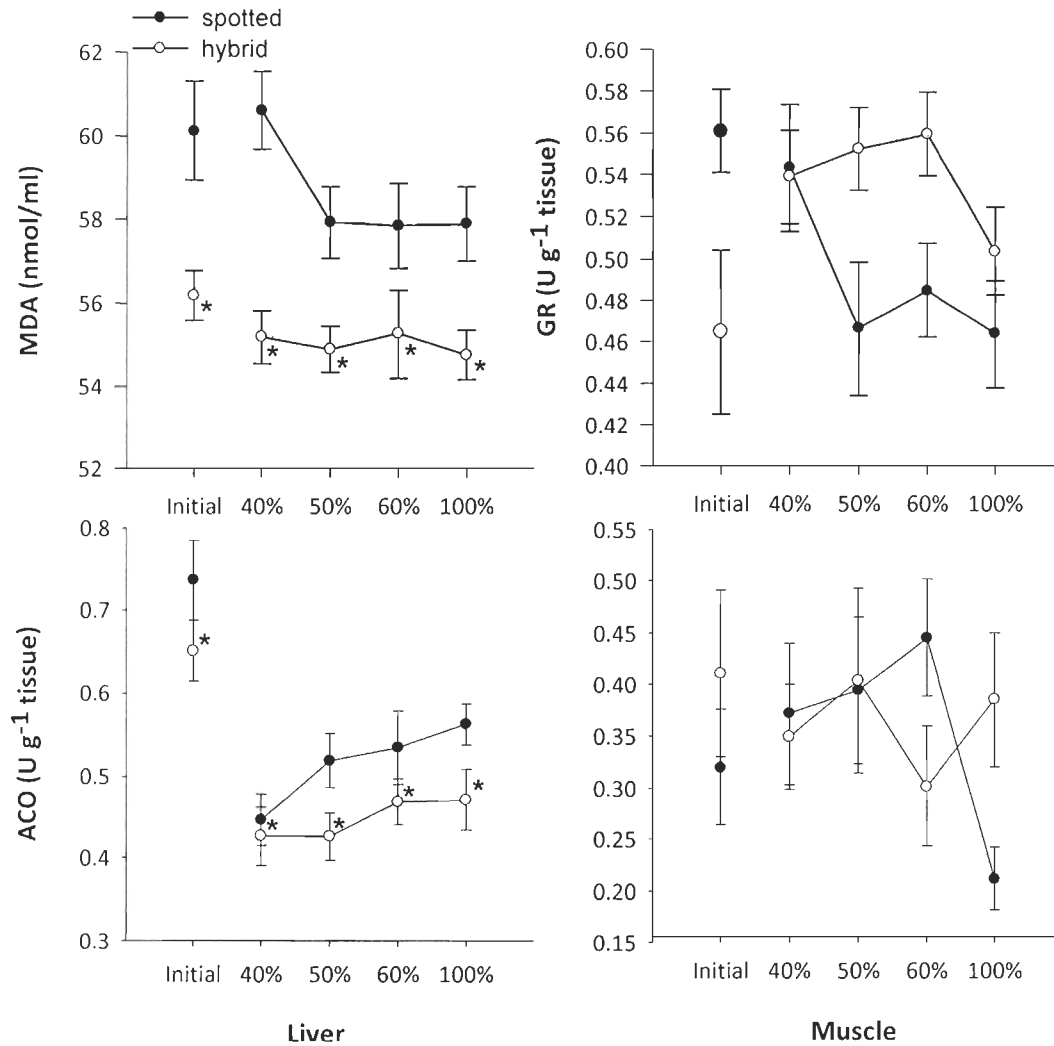


Figure 2.4. Liver MDA and ACO and muscle ACO and GR activity in spotted and hybrid wolffish at different DO levels (U g⁻¹ tissue). Difference between fish groups are represented by *. Error bars are standard error of the mean (SEM).

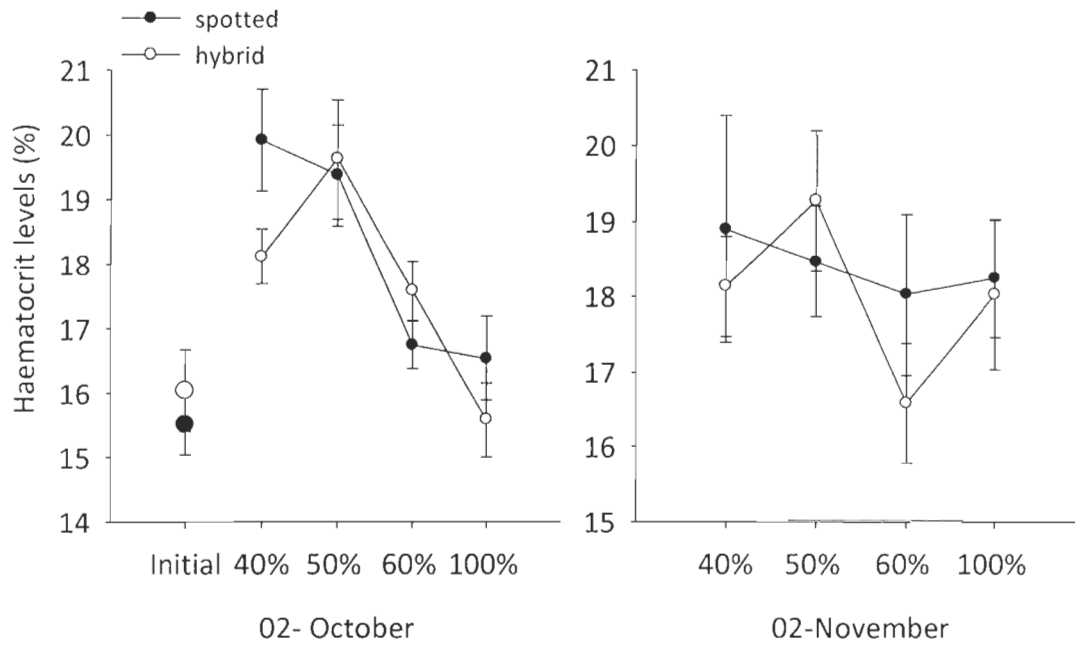


Figure 2.5. Blood haematocrit levels (%) of spotted and hybrid wolffish exposed to different DO levels. Error bars are standard error of the mean (SEM)

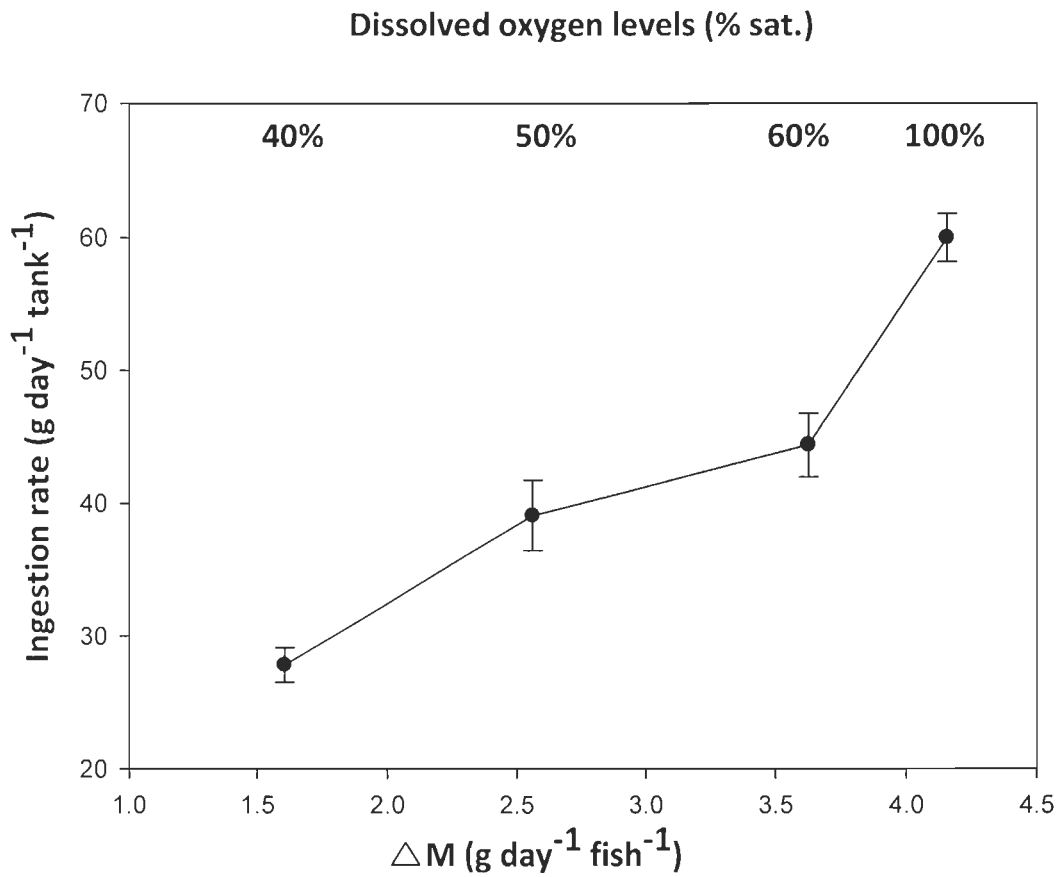


Figure 2.6. Mass gain (Δ mass) in relationship to mean ingestion rate per days⁻¹ (tanks pooled by treatment), spotted and hybrid wolffish pooled and dissolved oxygen levels. Error bars are standard error of the mean (SEM).

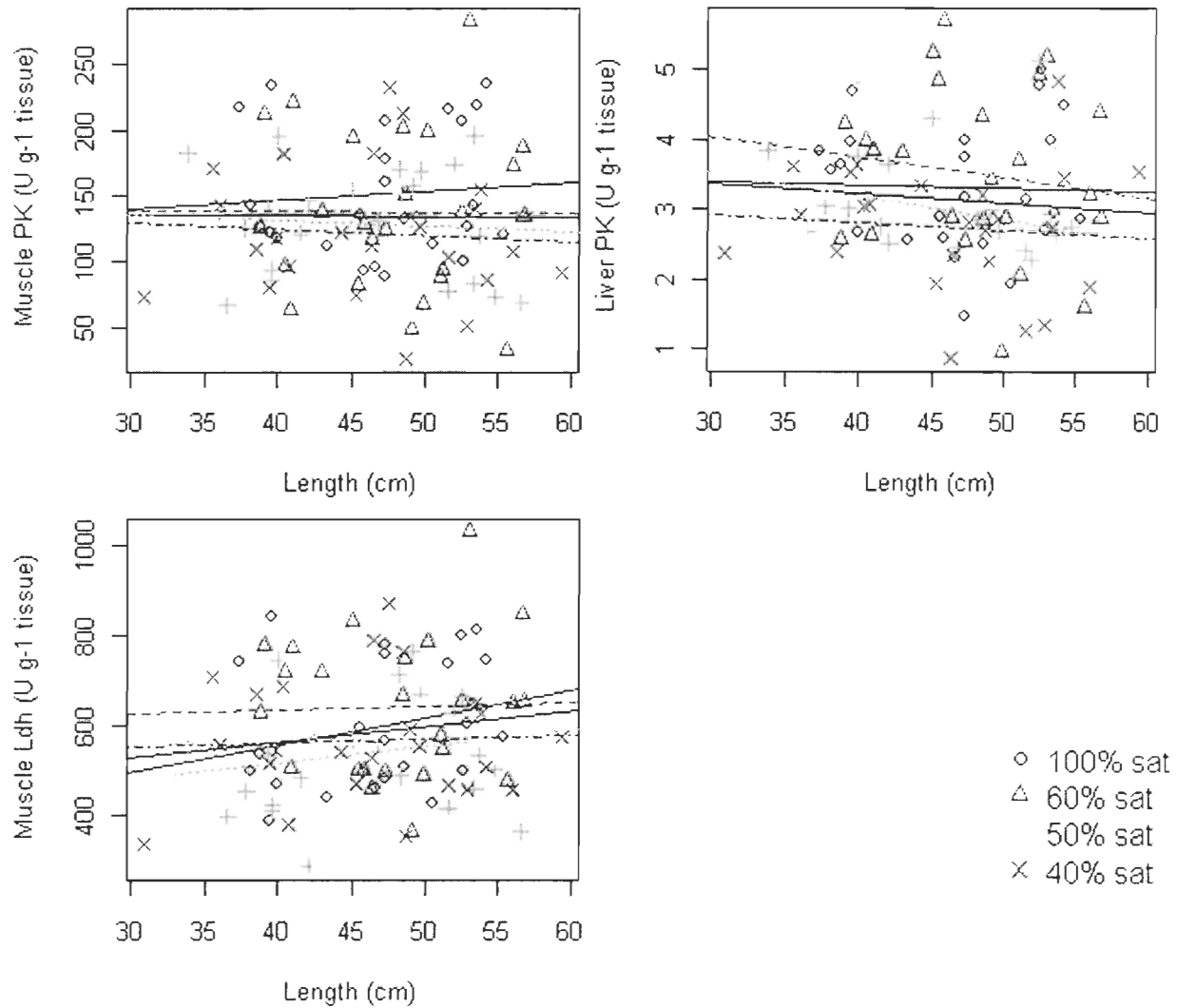


Figure 2.7. Relationship between PK and LDH activities with length at the end of the experiment. Fish size doesn't affect glycolytic enzymes activities. All relationships were not significant (> 0.05)

2.4.3 Removed fish

A total of 10 spotted wolffish died during the course of this experiment at different DO levels (6 at 40%, 2 at 50% and 2 at 60% sat.). Six of them had a negative growth rate after the first experimental month, and other one died before the second growth measurement. After those unexpected mortalities, seven others spotted wolffish were removed from the experiment at the end of the second experimental month (1 at 40% sat, 2 at 50%, 3 at 60% and 1 at 100% sat.). They showed the same characteristic as the dead fish (i.e. negative growth rate, whiter, appetite loss, injuries from other fish). Seventeen spotted wolffish were removed from the experiment and thus were not used for any analyses.

2.5 DISCUSSION

The present work aimed to investigate the effect of hypoxia on growth, condition and different physiological responses of spotted wolffish and the hybrid. Preliminary results determined that hypoxia LC_{50} (lethal concentration for 50% of the fish) for ~ 2 kg spotted wolffish was around 20.9 % sat. after 96 h of exposure (Jetté et al., 2010). The DO treatments used here were considerably above this threshold, and also above the LC_{05} (26.1 % sat.), therefore no fish was expected to die during the experiment. Indeed, (Foss et al., 2002) demonstrated that juvenile wolffish were well adapted to chronic moderate hypoxia (> 40 % sat.) and all fish presented a positive SGR throughout their experiment, even at the lower DO oxygen levels (~ 40% sat.= 0.46% day⁻¹, ~100% sat. = 0.90% day⁻¹). In

comparison, SGR was $0.11\% \text{ day}^{-1}$ at 40% sat. and 0.32 day^{-1} at 100% sat. for > 2 years spotted wolffish. According to the literature, reduced growth is the major response in several fish species exposed to hypoxia (Brett & Blackburn, 1981 ; Chabot & Dutil, 1999 ; Wilhelm et al., 2005 ; Wang et al., 2009). Oxygen is known as a limiting factor for metabolism (Fry, 1971). It reduces maximum metabolic rate and therefore the aerobic scope for activity. This forces fish to make choices when exposed to hypoxia, such as a reduction in intensity or frequency of locomotor activity and a reduction of food ingestion (Harris et al., 1999 ; Chabot & Claireaux, 2008). In juvenile Atlantic cod (*Gadhus morhua* L.), postprandial oxygen consumption can be double that of starved fish (Soofiani & Hawkins, 1982). This experiment, food consumption was directly correlated with all growth and condition parameters, which were affected by oxygen levels. Fooding was more than twice higher in the normoxic treatment ($59.96 \text{ g day}^{-1} \text{ fish}^{-1}$) than the severely hypoxic group ($27.77 \text{ g day}^{-1} \text{ fish}^{-1}$) (figure 2.6). All growth parameters were thus lower in hypoxic treatments (figure 2.1-2.2, table 2.3). At the end of the experiment, body mass gain for spotted and hybrid wolffish consumed around twice higher in normoxia compared to the 40% sat. treatment (figure 2.1). Spotted wolffish is generally known to show a superior growth rate in captivity than the Atlantic wolffish (Moksness, 1994). This study concludes that SGR was higher in hybrid than spotted wolffish, despite the fact that the growth of the former should be intermediate between that of both parent species. However, this must be interpreted cautiously as the hybrids were small fish overall, and should have had a greater SGR.

The liver is an important energy storage organ for fish. Hepatosomatic index (HSI) was higher in hybrid fish compared to spotted wolffish. Although no positive interaction was observed, it seems that 40 and 50 % sat. treatment had a higher effect on spotted than hybrid wolffish (figure 2.2). The correlation between liver mass and growth rate have been demonstrated in many fish (Holdway & Beamish, 1984 ; Chellappa et al., 1995 ; Sopinka et al., 2009). A healthy fish with an abundant food supply will have an elevated SGR and energy left over will be stored. This study, food consumption has been pooled by tanks and thus it was not possible to validate if hybrids consumed more food than spotted wolffish. However, figures 2.1 and 2.6 reveal that hybrids fish has a mean mass gain superior at low DO levels whereas spotted wolffish seem to perform better at moderate and high levels of DO (i.e. 60 and 100% sat.). This suggests that spotted wolffish may be more sensitive to low DO levels than the hybrids fish. However, since there were differences in initial body mass of spotted wolffish (1139 ± 1953 g, 46 ± 30.5 cm) and the hybrid (598 ± 1509 g, 41.5 ± 20 cm), mass gain should be taken with caution. Nevertheless, even if the hybrids displayed an inferior initial mean mass, they still showed a higher mass gain at low DO levels.

In this experiment, biochemical parameters were expected to change in relation to the oxygen treatment rather than fish group. Indeed, the reduction of the aerobic activity in hypoxic condition should have been associated to a decrease of the metabolic rate and thus be reflected in the metabolic enzymes activities. This was not seen in this study. We did observe some differences between the two types of fish. Glycolytic enzymes LDH and PK activity were significantly higher on the hybrid white muscle, while PK tends to be higher

in the liver (figure 2.3). This same trend have been observed in *A. minor* x *A. lupus* (Gaudreau et al., In prep.), where one family of newly hatched hybrid showed a higher LDH activity compared to spotted wolffish. The authors suggested that the glycolytic difference was a result of size differences, as the hybrids were smaller than spotted wolffish, since many enzymes activities are size-dependant. For example, Somero & childress (1980) have demonstrate that the activity of the aerobic enzyme CS of 13 different-sized teleost fish increased in larger fish while the glycolytic enzymes PK and LDH decreased in smaller fish. In the present study, hybrids were overall smaller than spotted wolffish mass at the beginning of the experience, but this cannot explain the observed difference. The relation between fish length at the end of the experiment was tested, and no interaction was found with PK & LDH activities (figure 2.7). Fish group appear to be the main factor that can explains this variation. Many studies have report significant increases of the anaerobic enzyme activities in fish submitted to hypoxic conditions (Almeida-val et al., 1995 ; Cooper et al., 2002 ; Chippari-Gomes et al., 2005). However, those studies focused on more severe hypoxic levels inducing initiation of anaerobic metabolism, which is not the case here. A study on sole (*Solea solea* Linnaeus), concluded that the progressive reduction of the aerobic scope occurred when the oxygen level fell below 40 % sat. and that anaerobic metabolism was activated when DO was between 20 and 12 % sat. (Van den thillart et al., 1994). Hypoxia levels used in this study were probably not sufficient to induce a major impact on the energetic metabolism, except probably on digestion metabolism (see below).

This study suggest a minor effect of hypoxia on the oxidative stress and antioxidant enzymes activities. Only one indicator of the antioxidant capacity was used (GR) (figure 2.4), since CAT activity was below the detection threshold of the method. Furthermore, GR was to low to be measured in the muscle. Oxidative damage was measured through two indicators, ACO deactivation and MDA content levels. The DO levels used in this experiment were likely too high to induce oxygen tissue deprivation. No difference was found between the oxygen treatments. Long term exposure to moderate hypoxia seems thus to not affect the oxidative mechanism of wolffish. However, a difference was evident between spotted and hybrid wolffish (figure 2.4). Indeed, MDA liver content and ACO liver activity was lower on the hybrid fish.

Recently, a major report on the habitat of the spotted and Atlantic wolffish habitat in the Gulf of St.Lawrence, based on acoustic surveys of sea bottom and wolffish catches between 1971-2007 (scientific surveys & commercial fisheries) was published (Larocque et al., 2010). Since we have good knowledge of the different oxygen levels found of the Gulf St.Lawrence (Gilbert et al., 2005), it is possible to assess hypoxia exposure of wolffish in their habitat. Atlantic and spotted wolffish habitats are different but overlapping mainly on deep coastal areas and along the Laurentian Channel, with high densities along the west coast of Newfoundland. Oxygen levels associated with those areas are variable, but mainly above 40% sat. In the light of the results in this research, wild population may be subject to growth loss due to low dissolved oxygen levels, but wolffish seem physiologically well adapted to survive.

To conclude, the dissolved oxygen levels tested were a negative effect on growth parameters. However, no clear effects were detected on the activity of many key enzymes of aerobic and anaerobic metabolic pathways or on the level of oxidative stress. The reduction of metabolic scope likely caused a reduction on food intake and fish may have initiated different adaptatives mechanism. Higher haematocrit on hypoxic levels have been observed in October only (figure 2.5), and other mechanisms not evaluated in the present study such as gill ventilation or locomotor activity could also be involved. However, difference are reported between spotted and hybrid wolffish on the activities of different enzymes as ACO, LDH, and MDA content. Overall, hypoxia levels tested not seem to affect the wolffish energetic metabolism and oxidative stress.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thanks Jérôme Gagnon for his technical skills and fish maintenance, Arianne Savoie for her comments on an earlier version of this manuscript and other diversified tasks, Nicolas Pichaud for his guidance in lab analysis and of course, all technical assistants who participated in many ways to the realization of this project. We also acknowledge the financial support of the Aquaculture Collaborative Research and Development Program, the Departement of Fisheries and Oceans of Canada and in particular the ACRDP program, the Université du Québec à Rimouski, the Biodôme de Montréal and the Réseau Aquaculture Quebec.

CHAPITRE 3

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a démontré l'un des principaux effets appréhendés lors d'une exposition de poissons à des conditions chroniques d'hypoxie, c'est-à-dire une perte de croissance (Brett & Blackburn, 1981 ; Chabot & Dutil, 1999 ; Harris et al., 1999 ; Buentello et al., 2000 ; Pichavant et al., 2001 ; Foss et al., 2002 ; Wilhelm et al., 2005 ; Braun et al., 2006). La principale cause de cette perte de croissance proposée dans la littérature dépend du registre aérobie (section 1.4.1), qui représente l'écart entre le taux minimal (SMR) et le taux maximal de consommation d'oxygène (AMR) d'un organisme. En diminuant l'oxygène du milieu, le métabolisme actif (AMR) est alors restreint. Le registre aérobie est donc proportionnel à l'oxygène dissous ambiant et en cas de registre aérobie réduit, le poisson est forcé de réduire la fréquence ou l'intensité de ses activités, comme la nage ou la digestion, pour ne pas dépasser son registre aérobie. Chez les poissons, le métabolisme postprandial (qui accompagne la digestion) constitue une dépense métabolique majeure (Soofiani & Hawkins, 1982). Si la teneur en oxygène du milieu limite le registre aérobie, la digestion peut aussi être affectée : l'augmentation de consommation d'oxygène suivant le repas pourrait ne pas être aussi élevée qu'en normoxie et la digestion, ainsi ralentie, durerait plus longtemps pour des repas de taille égale, ou le poisson prendrait de plus petits repas (Harris et al., 1999 ; Chabot & Claireaux, 2008). C'est donc en limitant la digestion que l'hypoxie cause indirectement des pertes de croissances. Lors de cette expérience, les

indices de croissances et de conditions du loup tacheté et de l'hybride furent négativement affectés par les niveaux d'hypoxie, quoique l'hybride semble moins affecté par l'hypoxie que le loup tacheté. Selon la littérature, le loup tacheté aurait un taux de croissance supérieure au loup atlantique (Moksness, 1994 ; Le François et al., 2010b). La croissance supérieure de l'hybride observée lors de cette étude pourrait en partie s'expliquer par « la vigueur de l'hybride », parfois observée chez certaines souches d'hybrides (Legendre et al., 1992 ; Galbreath & Thorgaard, 1995), et qui se résume par l'acquisition de trait supérieur aux espèces mères. Cette conclusion hâtive ne peut cependant être retenue sans considérer un des aspects majeurs de cette expérience : les différences de tailles initiales entre les deux souches. Au début de l'expérience, 49% des 63 loups tachetés pesaient plus d'un kilo (masse moyenne \pm CI95 : 1139 ± 1953 g, longueur moyenne : 46 ± 30.5 cm), contre seulement 21% pour les 135 hybrides (598 ± 1509 g et 41.5 ± 20 cm). Comme SGR décroît quand la masse moyenne augmente (Elliott & Hurley, 1995), il est possible que la meilleure croissance des hybrides ait été causé en parties par leur plus petite taille. Ceci est supporté par le fait qu'il n'y a pas de différence entre les espèces en considérant seulement les individus de plus d'un kilo (29 tachetés, 31 hybrides) (Annexe : figure 3.1). Même si cette démonstration est basée sur un petit échantillon (< 5 individus par groupe et par traitement), elle suggère néanmoins qu'à taille égale, les loups tachetés et hybrides auraient obtenu des croissances similaires.

Jusqu'à ce jour, il n'existe que trois études portant sur le loup de mer exposé à l'hypoxie. La première porte sur les effets de l'hypoxie chronique sur des loups tachetés juvéniles au niveau de la croissance et de la conversion alimentaire (Foss et al., 2002). La

deuxième constitue un CL50 obtenu suite à 96 heures d'exposition, sur des juvéniles de loup Atlantique (Le François et al., 2001). Finalement, une troisième étude porte sur les effets de l'hypoxie sévère sur des loups tachetés de ± 700 g au niveau du glucose et du cortisol sanguin (Lays et al., 2009). Un des aspects fondamentaux de l'étude présente réside dans l'utilisation d'indicateur du métabolisme énergétique et oxydatif. L'hypothèse initiale était basée sur la diminution du taux métabolique chez les groupes en hypoxie qui aurait été caractérisée par une baisse marquée de l'activité de la CS et possiblement de l'ACO, deux enzymes impliqués dans le métabolisme aérobie. Les niveaux d'oxygène utilisés durant cette expérience n'étaient cependant pas assez sévères pour induire une augmentation du métabolisme anaérobie et donc aucune hausse de l'activité glycolytique (LDH et PK) n'était appréhendée. Les résultats obtenus ici ne démontrent aucun effet clair des teneurs en oxygène sur le taux métabolique tant chez le loup tacheté que chez l'hybride. Par contre, l'activité de la PK et de la LDH est plus élevée chez l'hybride, alors que chez le loup tacheté, c'est plutôt au niveau de l'ACO et des contenus en MDA que l'on observe une augmentation. Cette différence imprévue aurait à priori pu être expliquée par les différences de tailles. En effet, il a été démontré chez plusieurs espèces de poissons que l'activité de plusieurs enzymes clés impliqués dans le métabolisme énergétique, dont la CS, la PK et la LDH, était corrélée à la taille du poisson (Somero & Childress, 1980 ; Rodnick & Williams, 1999). Les poissons de faible taille auraient donc une activité glycolytique plus faible (PK & LDH), mais une activité du métabolisme en aérobie plus élevée (CS). Cependant, une analyse de la relation entre la taille des poissons et les enzymes exprimant des différences entre les 2 groupes (i.e PK foie et muscle, LDH muscle et ACO foie) (Chap.

II. Figure 2.7) démontre que lors de cette expérience, la taille n'était pas un facteur pouvant expliquer cette différence. L'hybridation serait donc la principale cause de ces différences au niveau de l'activité métabolique.

Durant cette expérience, l'ACO fût utilisée à titre d'indicateur de stress oxydant dû à sa sensibilité aux dommages oxydatifs (Gardner & Fridovich, 1991) ainsi que la peroxydation des lipides en dosant la quantité de MDA. Pour ce qui est de la capacité antioxydante, la CAT et la GR furent sélectionnées, mais seule la GR provenant du foie put être mesurée. Des lacunes dans la mise au point de la méthode ou bien une activité trop faible sont probablement les raisons ayant empêchées le dosage de la CAT. Les hypothèses postulées appréhendaient une augmentation de l'activité antioxydante chez les groupes en hypoxie, en prévision d'un retour en normoxie, qui est généralement associé à une hausse du stress oxydatif (Hermes-Lima et al., 1998), et possiblement accompagné d'une hausse du dommages oxydatif. Les résultats obtenus n'ont pu démontrer clairement une augmentation de la capacité antioxydante. La GR au niveau de foie ne démontre aucune tendance, que se soit entre les traitements ou du groupe de poisson. La mesure de la capacité antioxydante sur un seul antioxydant au niveau du foie aurait, dans le cadre de cette expérience, pu être bonifiée par l'ajout de mesure d'autres antioxydants comme par exemple la SOD ou la GPx. Pour ce qui est des dommages oxydatifs, les résultats obtenus ne semblent pas démontrer de hausse occasionnée par les traitements en oxygène. Cependant, la peroxydation lipidique semble généralement plus élevée chez les hybrides alors que l'activité de l'ACO apparaît plus faible. Il est difficile d'associer la baisse de l'activité de l'ACO au stress oxydatif, étant donné qu'aucun effet traitement ne semble

observé. Encore une fois, l'analyse de la relation entre la taille des poissons et les variables ACO et MDA démontre que la différence observée entre les deux groupes de poissons proviendrait d'avantage de l'hybridation que de la différence de taille observée.

Les mesures biochimiques de cette expérience n'ont démontré aucun effet significatif entre les traitements d'oxygène, mais ont néanmoins établi des différences biochimiques entre le loup tacheté et l'hybride *A. minor* x *A. lupus*. L'ajout du loup atlantique à l'expérience aurait pu permettre d'identifier si les différences observées étaient des valeurs intermédiaires entre les deux espèces parentes ou encore différentes. De plus, les hybrides utilisés dans le cadre de cette expérience provenaient de différentes familles et nos analyses n'en ont pas tenu compte. Plusieurs paramètres biochimiques étaient différents à la fin de l'expérience par rapport à ce qui fut observé dans le groupe témoin sacrifié au début, trois mois plutôt. Il pourrait s'agir d'un effet saisonnier ou encore un effet dû à l'expérience.

Le métabolisme des espèces étudiées ne semble pas être affecté par des niveaux modérés d'hypoxie sur une période de 14 semaines, ce qui suggère que les deux espèces étudiées tolèrent assez bien des valeurs d'oxygène dissous supérieures à 40% sat. Par contre, les niveaux d'hypoxie utilisés ont clairement affecté la croissance, autant chez l'hybride que chez le loup tacheté. Les différences de tailles initiales ainsi que les nombres inégaux entre les deux espèces peuvent néanmoins imposer des contraintes aux analyses statistiques. À titre comparatif, une expérience similaire est présentement en cours et porte sur des juvéniles de tailles homogènes en nombres beaucoup plus élevés. De plus, cette

expérience a incorporé quelques spécimens de loup Atlantique à chaque bassin expérimental. Les résultats obtenus seront ensuite comparés aux résultats de l'expérience présente.

ANNEXE

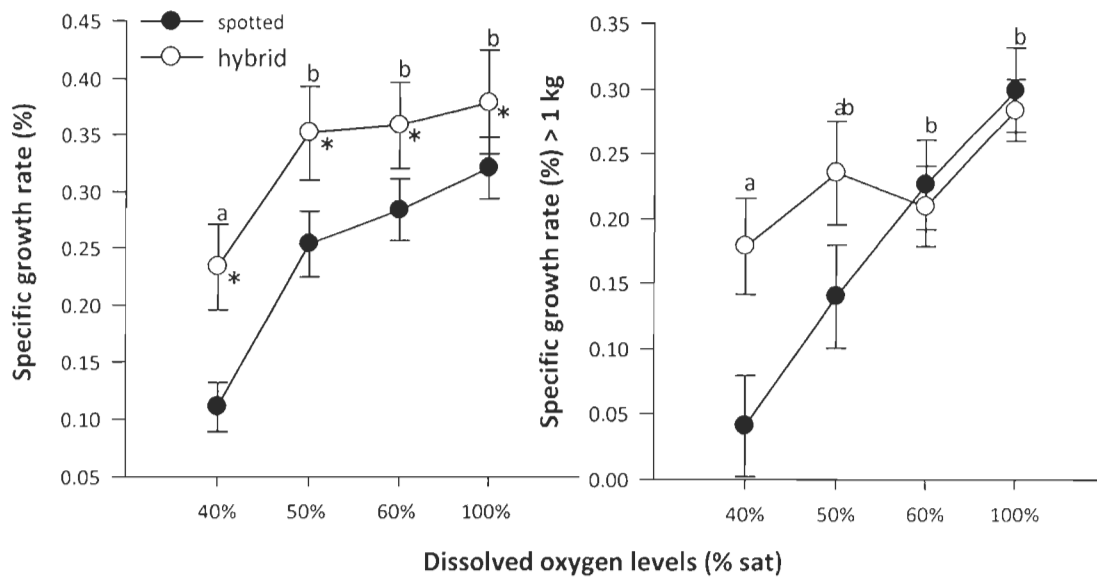


Figure 3.1. Relation entre la croissance spécifique ($\% \text{ day}^{-1}$) de 196 loups de mer, toutes tailles confondues et ceux de $> 1 \text{ kg}$ par rapport aux différents teneurs en OD.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almeida-val VMF, Farias IP, Silva MNP, Duncan WP, Val AL,1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **28**, 1257-1263.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T,2005. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell, **120**, 483-495.
- Bartley DM, Rana K, Immink AJ,2000. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, **10**, 325-337.
- Beckman KB, Ames BN,1998. The free radical theory of aging matures. Physiological Reviews, **78**, 547-581.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB,1989. Marked reduction of free-radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion - evidence that myocardial stunning is a manifestation of reperfusion injury. Circulation Research, **65**, 607-622.
- Boutilier RG,2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. Journal of Experimental Biology, **204**, 3171-3181.
- Boutilier RG, Donohoe PH, Tattersall GJ, West TG,1997. Hypometabolic homeostasis in overwintering aquatic amphibians. Journal of Experimental Biology, **200**, 387-400.
- Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC,2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. Cell Death and Differentiation, **8**, 1143-1156.
- Braun N, de Lima RL, Moraes B, Loro VL, Baldisserotto B,2006. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. Aquaculture Research, **37**, 1524-1531.
- Brett JR, Blackburn JM,1981. Oxygen requirements for growth of young Coho (*Oncorhynchus kisutch*) and Sockeye (*Oncorhynchus nerka*) salmon at 15C. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **38**, 399-404.
- Buentello JA, Gatlin DM, Neill WH,2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, **182**, 339-352.
- Carlberg I, Mannervik B,1985. Glutathione reductase. Methods in Enzymology, **113**, 484-495.
- Carpenter SR, Caraco NF, Correll DL, Howarth RW, Sharpley AN, Smith VH,1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecological Applications, **8**, 559-568.
- Chabot D, Claireaux G,2008. Environmental hypoxia as a metabolic constraint on fish: The case of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Marine Pollution Bulletin, **57**, 287-294.

- Chabot D, Dutil JD,1999. Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. Journal of Fish Biology, **55**, 472-491.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT,2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha during hypoxia - A mechanism of O₂ sensing. Journal of Biological Chemistry, **275**, 25130-25138.
- Chapman LJ, McKenzie DJ,2009. Behavioral responses and ecological consequences. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 25-40
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY,1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male 3- spined stickleback Journal of Fish Biology, **47**, 775-787.
- Chippari-Gomes AR, Gomes LC, Lopes NP, Val AL, Almeida-Val V,2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **141**, 347-355.
- Claireaux G, Webber DM, Lagardere JP, Kerr SR,2000. Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Journal of Sea Research, **44**, 257-265.
- Cooper RU, Clough LM, Farwell MA, West TL,2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **279**, 1-20.
- Dalla Via J, Van den Thillart G, Cattani O, Cortesi P,1998. Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie, **76**, 2108-2113.
- Dalla Via J, Van den thillart G, Cattani O, Dezwaan A,1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy-metabolism of *Solea solea*. 2. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. Marine Ecology-Progress Series, **111**, 17-27.
- Desjardins M, Le François NR, Fletcher GL, Blier PU,2007. High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) make them an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters. Aquaculture, **272**, 667-674.
- Diaz RJ,2001. Overview of hypoxia around the world. Journal of Environmental Quality, **30**, 275-281.
- Diaz RJ, Breitburg DL,2009. The Hypoxic environment. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 2-17
- Diaz RJ, Rosenberg R,2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. Science, **321**, 926-929.
- Droge W,2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews, **82**, 47-95.
- Dutil JD, Sylvestre EL, Gamache L, Larocque R, Guderley H,2007. Burst and coast use, swimming performance and metabolism of Atlantic cod *Gadus morhua* in sub-lethal hypoxic conditions. Journal of Fish Biology, **71**, 363-375.

- Elliott JM, Hurley MA,1995. The functional relationship between body size and growth rate in fish. Functional Ecology, **9**, 625-627.
- Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Porter M, Gadd D,2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. Journal of Fish Biology, **61**, 493-531.
- Enders EC, Boisclair D, Boily P, Magnan P,2006. Effect of body mass and water temperature on the standard metabolic rate of juvenile yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). Environmental biology of fishes, **76**, 399-407.
- Falk-Petersen IB, Hansen TK,2003. Early ontogeny of the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). Aquaculture Research, **34**, 1059-1067.
- Falk-Petersen IB, Hansen TK, Fieler R, Sunde LM,1999. Cultivation of the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen) - a new candidate for cold-water fish farming. Aquaculture Research, **30**, 711-718.
- Farrell AP,2007. Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart - why hypoxic bradycardia in fishes? Journal Experimental of Biology, **210**, 1715-1725.
- Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, Pardini A, Caradonna E, Visioli O,1990. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human-heart. Circulation, **81**, 201-211.
- Ferreira MVR, Alencastro ACR, Hermes-Lima M,2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de zoologie, **81**, 1239-1248.
- Foss A, Evensen TH, Imsland AK, Oiestad V,2001. Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish. Journal of Fish Biology, **59**, 416-426.
- Foss A, Evensen TH, Oiestad V,2002. Effects of hypoxia and hyperoxia on growth and food conversion efficiency in the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen). Aquaculture Research, **33**, 437-444.
- Foss A, Evensen TH, Vollen T, Oiestad V,2003. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. Aquaculture, **228**, 215-224.
- Foss A, Imsland AK, Falk-Petersen IB, Oiestad V,2004. A review of the culture potential of spotted wolffish *Anarhichas minor* Olafsen. Reviews in Fish Biology and Fisheries, **14**, 277-294.
- FQSA,2003. Mémoire sur le projet d'élevage en cage d'ombles de fontaine dans la Baie de Gaspé ProgrammeÉco. In: http://www.saumon-fqsa.qc.ca/UserFiles/File/Memoire_aquaculture_ECO.pdf.
- Fry FEJ,1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. . In: Environmental Relations and Behaviour (ed. by Hoar WS, Randall DJ). Academic Press, New York, Pp. 1-98. .
- Galbreath PF, Thorgaard GH,1995. Sexual maturation and fertility of diploid and triploid Atlantic salmon x brown trout hybrids. Aquaculture, **137**, 299-311.
- Gardner PR, Fridovich I,1991. Superoxide sensitivity of the *escherichia colia* aconitase. Journal of Biological Chemistry, **266**, 19328-19333.

- Gaudreau CM, Le François NR, Blier P, In prep. Mtdna divergence and mitochondrial functions: insights from hybridization of *Anarhichas minor* and *A. lupus*.
- Gaudreau CM, Le François NR, Ditlecadet D, Tveiten H, Blier PU, 2009. Characterization of the early-stages of the wolffish hybrid *Anarhichas minor* x *A. lupus*: conservation and aquaculture applications. Aquat. Living Resour., **22**, 371-377.
- Gilbert D, Sundby B, Gobeil C, Mucci A, Tremblay GH, 2005. A seventy-two-year record of diminishing deep-water oxygen in the St. Lawrence estuary: The northwest Atlantic connection. Limnology and Oceanography, **50**, 1654-1666.
- Gonzalezflecha B, Demple B, 1995. Metabolic sources of hydrogen-peroxide in aerobically growing *escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, **270**, 13681-13687.
- Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Brun P, de Decker S, Dufour R, Galinie C, Peignon JM, Pham D, Vourey E, Harache Y, Patrois J, 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *stylirostris*. Aquaculture, **278**, 43-50.
- Grune T, Schröder P, Biesalski H, 2005. Low molecular weight antioxidants. In: Reactions, Processes. Springer Berlin / Heidelberg, Pp. 185-350.
- Guzy RD, Schumacker PT, 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. Pp. 807-819.
- Hansen TK, Falk-Petersen IB, 2001. The influence of rearing temperature on early development and growth of spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen). Aquaculture Research, **32**, 369-378.
- Harris JO, Maguire GB, Edwards SJ, Johns DR, 1999. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. Aquaculture, **174**, 265-278.
- Hena A, Kamal M, Mair GC, 2005. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. Aquaculture, **247**, 189-201.
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB, 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **120**, 437-448.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T, 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, **133**, 537-556.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC, 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **93**, 9493-9498.
- Hochachka PW, Lutz PL, 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **130**, 435-459.

- Hochachka PW, Somero GN,2002. Cellular metabolism, regulation and homeostasis. In: Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution (ed. by Hochachka PW, Somero GN). Oxford University Press, New York, Pp. 22.
- Holdway DA, Beamish FWH,1984. Specific growth rate and proximate body composition of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **81**, 147-170.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P,2008. Simultaneous inference in general parametric models. Biometrical Journal, **50**, 346-363.
- Imsland AK, Gunnarsson S, Foss A, Sigurdsson B, Sigurdsson S,2009. Stocking density and its influence on growth of spotted wolffish, *Anarhichas minor*, in shallow raceways. Journal of the World Aquaculture Society, **40**, 762-770.
- Imsland AK, Gunnarsson S, Foss A, Sparboe LO, Oiestad V, Sigurdsson S,2007. Comparison of juvenile spotted wolffish, *Anarhichas minor*, growth in shallow raceways and circular tanks. Journal of the World Aquaculture Society, **38**, 154-160.
- Imsland AK, Stensland K, Johansen T, Le Francois NR, Lamarre SG, Naevdal G, Foss A,2008. Population genetic structure of the spotted wolffish, *Anarhichas minor*, in the North Atlantic. The Open Marine Biology Journal, **2**, 7-12.
- Jetté M, Chabot D, Le François NR, Garant D,2010. Determination of the lethal dissolved oxygen threshold in spotted wolffish (*Anarhichas minor*) of Quebec origin according to two methods: LC₅₀ and PO_{2crit}. In: Aquaculture Canada 2010 (ed. by Benfey T, Reid GK). Aquaculture Association Canada, St.John's, Pp. 48-50.
- Jobling M,1994. Dissolved gases. In: Fish Bioenergetics (ed by Jobling M). Chapman & Hall, London, UK., Pp. 233-263
- Johannessen T, Gjørseter J, Moksness E,1993. Reproduction, spawning behaviour and captive breeding of the common wolffish *Anarhichas lupus* L. Aquaculture, **115**, 41-51.
- Johansen K,1970. Air Breathing in Fishes. In: The Nervous System, Circulation and Respiration (ed. by Hoar WS, Randall DJ). Academic Press, Pp. 361-408.
- Johnstone KA, Marshall HD, Carr SM,2007. Biodiversity genomics for species at risk: patterns of DNA sequence variation within and among complete mitochondrial genomes of three species of wolffish (*Anarhichas* spp.). Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie, **85**, 151-158.
- Jones EP, Zemlyak F, Stewart P,1992. operating manual for the bedford institute of oceanography automated dissolved oxygen titration system. In: Canadian Technical Report of Hydrography and Ocean Sciences. Bedford Institute of Oceanography, Dartmouth,Nova Scotia, Pp. iv+51.
- Jordan AD, Steffensen JF,2007. Effects of ration size and hypoxia on specific dynamic action in the cod. Physiological and Biochemical Zoology, **80**, 178-185.
- Kjartansson H, Fivelstad S, Thomassen JM, Smith MJ,1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. Aquaculture, **73**, 261-274.
- Kramer DL, McClure M,1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. Environmental biology of fishes, **7**, 47-55.

- Lambert Y, Dutil JD,2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. Aquaculture, **192**, 233-247.
- Larocque R, Dutil JD, Proulx S, Thorne M, Scallon-Chouinard PM, Gendron MH, Plourde J, Schmitt T,2010. Contribution à la description de l'habitat des loups de mer (*Anarhichas* spp.) près de la péninsule gaspésienne par vidéo remorquée et relevés acoustiques multifaisceaux Rapp. tech., Pp. vii + 44p.
- Lays N, Iversen MMT, Frantzen M, Jorgensen EH,2009. Physiological stress responses in spotted wolffish (*Anarhichas minor*) subjected to acute disturbance and progressive hypoxia. Aquaculture, **295**, 126-133.
- Le François NR, Dutil JD, Blier P, Lord K, Chabot D,2001. Tolerance and growth of juvenile common wolffish (*Anarhichas lupus*) under low salinity and hypoxic conditions: Preliminary results. In: Aquaculture Canada 2000 (ed. by Hendry CI, McGladdery SE). Aquaculture Association Canada, Saint Andrews, Pp. 57-59.
- Le François NR, Lamarre SG, Blier PU,2004. Tolerance, growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities. Aquaculture, **236**, 659-675.
- Le François NR, Lemieux H, Blier PU,2002. Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture. Aquaculture Research, **33**, 95-108.
- Le François NR, Savoie A, Blier PU,2010a. Quantitative approaches for identifying finfish species suited for sustainable and productive aquaculture. In: Finfish Aquaculture Diversification (ed. by Le Francois NR, Jobling M, Carter C, Blier PU). CABI, Pp. 147-173.
- Le François NR, Tveiten H, Halfyard LC, Foss A,2010b. The wolffishes(Family : Anarhichadidae). In: Finfish Aquaculture Diversification (ed. by Le Francois NR, Jobling M, Carter C, Blier PU). CABI, Pp. 417-418.
- Lee JY, Kim CJ, Chung MY,2010. Effect of high-dose vitamin C on oxygen free radical production and myocardial enzyme after tourniquet ischaemia-reperfusion injury during bilateral total knee replacement. Journal of International Medical Research, **38**, 1519-1529.
- Legendre M, Teugels GG, Cauty C, Jalabert B,1992. A comparative-study on morphology, growth-rate and reproduction of *Claria Gariepinus* (Burchell, 1822), *heterobranchus longifilis* Valenciennes, 1840, and their reciprocal hybrids (Pisces, Clariidae). Journal of Fish Biology, **40**, 59-79.
- Lehninger AL, Nelson DL,2005. Principles of biochemistry, 4e edition.
- Liu YB, Fiskum G, Schubert D,2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. Journal of Neurochemistry, **80**, 780-787.
- Lohmann M-,1954. Ober intermediare Formen zwischen *Anarhichas minor* O. und *A . lupus* L. (Teleostei). Ber.Otsch. Wiss. Komm. Meeresforsch, **13**, 310-326. (Fisheries Research. Board Can. Transl. Ser., No. 1812, 1971.).
- Lushchak VI, Bagnyukova TV,2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **144**, 283-289.

- Lushchak VI, Bagnyukova TV,2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **148**, 390-397.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Lushchak OV, Storey JM, Storey KB,2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **37**, 1319-1330.
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M,2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, **280**, R100-R107.
- Lutz PL, Nilsson GE,1997. Contrasting strategies for anoxic brain survival - Glycolysis up or down. Journal of Experimental Biology, **200**, 411-419.
- Mandic M, Todgham EA, Richards GJ,2009. Mechanisms and evolution of hypoxia tolerance in fish. Proceedings of the royal society Biological, **276**, 735-744.
- MAPAQ,2008. La pêche et l'aquaculture commerciales, Bilan 2008 et perspectives. In: <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche/md/Publications/pecheaquacultureBilan2008.htm>
- Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A,2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries, **15**, 75-88.
- Martinez ML, Chapman LJ, Rees BB,2009. Population variation in hypoxic responses of the cichlid *Pseudocrenilabrus multicolor victoriae*. Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie, **87**, 188-194.
- Milsom WK, Bursleson ML,2007. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. Respiratory Physiology & Neurobiology, **157**, 4-11.
- Miwa S, Brand MD,2005. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila mitochondria*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, **1709**, 214-219.
- Moksness E,1994. Growth rates of the common wolffish, *Anarhichas lupus* L., and spotted wolffish, *A. minor* Olafsen, in captivity. Aquaculture Research, **25**, 363-371.
- Muusze B, Marcon J, van den Thillart G, Almeida-Val V,1998. Hypoxia tolerance of Amazon fish respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology, **120**, 151-156.
- Nash RDM, Valencia AH, Geffen AJ,2006. The origin of Fulton's condition factor - Setting the record straight. Fisheries, **31**, 236-238.
- Nikinmaa M,2001. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. Respiration physiology, 317-329.
- Nilsson GE,2007. Gill remodeling in fish - a new fashion or an ancient secret? Journal of Experimental Biology, **210**, 2403-2409.
- Nixon SW,1990. Marine eutrophication - A growing international problem. Ambio, **19**, 101.
- O'Dea NB, Haedrich RL,2002. A review of the status of the Atlantic wolffish, *Anarhichas lupus*, in Canada. Canadian Field-Naturalist, **116**, 423-432.

- Oliver CN, Starkereed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA,1990. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine-synthetase activity, and production of free-radicals during is ischemia reperfusion-induced injury to gerbil brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **87**, 5144-5147.
- Orr WC, Sohal RS,1992. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **297**, 35-41.
- Pelletier D, Dutil JD, Blier P, Guderley H,1994. Relation between growth-rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive-tract in cod, *Gadus morhua*. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology, **164**, 179-190.
- Perry SF, Gilmour KM,2002. Sensing and transfer of respiratory gases at the fish gill. Journal of Experimental Zoology, **293**, 249-263.
- Perry SF, Jonz MG, Gilmour KM,2009. Oxygen sensing and the hypoxic ventilatory response. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 217-230.
- Pichavant K, Person-Le-Ruyet J, Le Bayon N, Severe A, Le Roux A, Boeuf G,2001. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. Journal of Fish Biology, **59**, 875-883.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Development Core Team,2010. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-97.
- Przyklenk K, Kloner RA,1989. Reperfusion injury by oxygen-derived free-radicals- effect of superoxide-dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood-flow. Circulation Research, **64**, 86-96.
- R Development Core Team,2010. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-Project.org.
- Rabalais NN, Diaz RJ, Levin LA, Turner RE, Gilbert D, Zhang J,2001. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. Biogeosciences, **7**, 585-619.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA,1991. Detection of catalase in rat-heart mitochondria Journal of Biological Chemistry, **266**, 22028-22034.
- Reid SG, Perry SF,2003. Peripheral O₂ chemoreceptors mediate humoral catecholamine secretion from fish chromaffin cells. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, **284**, R990-R999.
- Richards JG,2009. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 443-478.
- Rodnick KJ, Williams SR,1999. Effects of body size on biochemical characteristics of trabecular cardiac muscle and plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology, **122**, 407-413.

- Rosenberg R, Hellman B, Johansson B,1991. Hypoxic tolerance of marine benthic fauna. Marine Ecology-Progress Series, **79**, 127-131.
- Ross SW, Dalton DA, Kramer S, Christensen BL,2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, **130**, 289-303.
- Rutjes HA, Nieveen MC, Weber RE, Witte F, van den Thillart G,2007. Multiple strategies of Lake Victoria cichlids to cope with lifelong hypoxia include hemoglobin switching. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, **293**, R1376-R1383.
- Schmidt-Nielsen K,1990. Energy metabolism. In: Animal Physiology: Adaptation and environment (ed. by Schmidt-Nielsen K, Duke JB). Cambridge University Press, Pp. 70.
- Scott MG, Scott WB,1988. Atlantic fishes of Canada. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science, **219**, 431-435.
- Shen JM, Liu SJ, Sun YD, Zhang C, Luo KK, Tao M, Zeng C, Liu Y,2006. A new type of triploid crucian carp-red crucian carp (female) x allotetraploid (male). Progress in Natural Science, **16**, 1348-1352.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC,1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, **150**, 76-85.
- Somero GN, Childress JJ,1980. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger-size fish. Physiological Zoology, **53**, 322-337.
- Soofiani NM, Hawkins AD,1982. Energetic costs at different levels of feeding in juvenile cod, *Gadus morhua* L. Journal of Fish Biology, **21**, 577-592.
- Sopinka NM, Fitzpatrick JL, Desjardins JK, Stiver KA, Marsh-Rollo SE, Balshine S,2009. Liver size reveals social status in the African cichlid *Neolamprologus pulcher*. Journal of Fish Biology, **75**, 1-16.
- Souza RHD, Soncini R, Glass ML, Sanches JR, Rantin FT,2001. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology, **171**, 483-489.
- Storey KB,1996. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **29**, 1715-1733.
- Storey KB, Storey JM,1990. Metabolic-rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. Quarterly Review of Biology, **65**, 145-174.
- Sundin L, Burleson ML, Sanchez AR, Amin-Naves J, Kinkead R, Gargaglioli LH, Hartzler LK, Wiemann M, Kumar P, Glass ML,2007. Respiratory chemoreceptor function in vertebrates - comparative and evolutionary aspects. Integrative and Comparative Biology, **47**, 592-600.
- Systat Software I,2009. SigmaPlot 11.2. San Jose, CA.
- Templeman W,1986. Spotted forms of the northern wolffish (*Anarhichas denticulatus*). Journal of Northwest Atlantic Fishery Science, **7**, 77-80.

- Thibault M, Blier PU, Guderley H,1997. Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, **16**, 139-155.
- Tremblay-Bourgeois S, Le François NR, Roy RL, Benfey TJ, Imsland AK,2010. Effect of rearing density on the growth and welfare indices of juvenile spotted wolffish, *Anarhichas minor* (Olafsen). Aquaculture Research, **41**, 1179-1189.
- Turrens JF,2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Journal of Physiology-London, **552**, 335-344.
- Tveiten H, Solevag SE, Johnsen HK,2001. Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolffish. Journal of Fish Biology, **58**, 374-385.
- Van den thillart G, Dalla Via J, Vitali G, Cortesi P,1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy-metabolism of *Solea solea*. 1. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. . Marine Ecology-Progress Series, **104**, 109-117.
- Vaquier-Sunyer R, Duarte CM,2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. Proceedings of national academy of sciences of the United States of America, **105**, 15452-15457.
- Verspoor E, Hammar J,1991. Introgressive hybridization in fishes- the biochemical-evidence. Journal of Fish Biology, **39**, 309-334.
- Vornanen M, Stecyk JAW, Milsson GE,2009. The anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.) In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 399.
- Wang J, Xia D,2002. Studies on fish heterosis with DNA fingerprinting. Aquaculture Research, **33**, 941-947.
- Wang T, Lefevre S, Huong DTT, Van cong N, Bayley M,2009. The effects of hypoxia on growth and digestion. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 362-391.
- Welker TL, McNulty ST, Klesius PH,2007. Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia. Journal of the World Aquaculture Society, **38**, 12-23.
- Wells RMG,2009. Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia. In: Hypoxia (ed. by Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, London, Pp. 255-288.
- Wilhelm D, Torres MA, Zaniboni E, Pedrosa RC,2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). Aquaculture, **244**, 349-357.
- Wu RSS,2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin, **45**, 35-45.
- Wu RSS, Zhou BS, Randall DJ, Woo NYS, Lam PKS,2003. Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. Environmental Science & Technology, **37**, 1137-1141.
- Zhou BS, Wu RSS, Randall DJ, Lam PKS, Ip YK, Chew SF,2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. Journal of Fish Biology, **57**, 1160-1171.

Zhou LF, Stanley WC, Saidel GM, Yu X, Cabrera ME, 2005. Regulation of lactate production at the onset of ischaemia is independent of mitochondrial NADH/NAD(+): insights from in silico studies. Journal of Physiology-London, **569**, 925-937.

