

Effets des polychlorobiphényles et de l'hypoxie sur l'énergétique, les performances cardiaques et le comportement anti-prédateur chez les juvéniles de sole commune (Solea solea)

Marcella Cannas

▶ To cite this version:

Marcella Cannas. Effets des polychlorobiphényles et de l'hypoxie sur l'énergétique, les performances cardiaques et le comportement anti-prédateur chez les juvéniles de sole commune (Solea solea). Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2011. Français. NNT: 2011LAROS331. tel-00688130

HAL Id: tel-00688130 https://theses.hal.science/tel-00688130

Submitted on 16 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE ÉCOLE DOCTORALE DE LA ROCHELLE UMR6250, LITTORAL, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉS

Effets des Polychlorobiphényles et de l'hypoxie sur l'énergétique, les performances cardiaques et le comportement anti-prédateur chez les juvéniles de sole commune (Solea solea)

Thèse de doctorat

Soutenance prévue le 6 Juillet 2011

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Océanologie Biologique et Environnement marin

Par

Marcella Cannas

Composition du jury:

Denis Chabot, Prof. associé, Institut Maurice-Lamontagne, Canada

Rapporteur

Paolo Domenici, Directeur de recherche, Conseil National des recherches, Italie

David McKenzie, Chargé de recherche CNRS, Univ. Montpellier II

Examinateur

Paco Bustamante, Prof., LIENSs, Univ La Rochelle

Christel Lefrançois, MCU, LIENSs, Univ La Rochelle

Responsable scientifique





Remerciements

Je voudrais d'abord souhaiter mes plus vifs remerciements aux membres du jury, le Professeur Denis Chabot, Docteur Paolo Domenici et Docteur David McKenzie pour qu'ils me font l'honnore de juger mon travaille de recherche.

J'exprime ma profonde gratitude envers l'UMR LIENSs 6250 et l'Ifremer l'Houmeau et à leur directeurs Pierre Richard et Philippe Jacques Hatt pour m'avoir accueilli et m'avoir soutenue pendant les trois années des ma thèse.

An « immenso grazie » à mes chef Paco et Christel parce que pendant toute ma thèse ils m'ont soutenue, encouragée, aidée, ect....!

Merci beaucoup à Nathalie Imbert et Valerie Huet pour m'avoir appris le secret du « cœur » !

Je voudrais remercie tout le monde de l'Houmeau parce qu'ils m'ont accueilli, aidée, et avec qui j'ai passè de très très bons moments. Merci à MarieLaure et Xavier qu'ont m'aide chaque fois j'avais besoin d'aide. Merci également à Didier per pour avoir toujours été disponible à m'aider et à faire me sourire aussi quand les petites soles me faisaient désespérer.

En particulière Michel...merci de m'avoir toujours compris et aidé même quand tu comprennes rien de quoi je disais (c'est bizarre l'italian !!). Tu te rappelle la leçon française-italien pour réussir à construire les respirometre ??

Un énorme merci à Sam pour être autre qu'un collègue valide, un vrai ami que m'a aidé quand je suis arrivée en France en me faisant de traducteur personnel. Merci à Maie-Élise pour m'avoir "chouchouté" avec ses « buonissimi » gateaux et avec sa bonne humeur.

Un enorme grazie a Fabrizio pour m'avoir aidé pour les manips...aussi quand il était difficile avec seulement 2 heures de sommeil!!! Grazie di nuovo a Fabrizio et Tarek pour etre que grands amis, mes "body's guards".

Merci a Thomas, Gwen, Matteo, Andrea, Antoine, Camille P., Julie, pour les très très bonne miment passé ensemble (.....voir Bout du Monde, Saoufé) !!!

Merci vraiment à tout le gens du labo LIENSs pour la gentillesse la sympathique et l'accueil qui j'ai toujours trouvé. En particulier je voudrais remercier Aurore, Vanessa, Tiphaine et Marc pour m'avoir aide, moralement et physiquement à la fin de la thèse... sur la partie la moins « agréable » de la thèse...la bibliographie.

Ci vorrebbe un enciclopedia per poter ringraziare tutti quelli che ho incontrato durante questi tre anni di duro lavoro...

Vorrei ringraziare con tutta me stessa e con tutto il mio cuore la mia « famigllia adottiva » : Nathalie, Paco, Fernando, Tony, Christin, Serena, Jérôme, Helene, Christel, Akuna...senza di voi non sarei mai riuscita a finire la tesi! Siete stati li dal primo momento che sono arrivata in Francia e siete stati con me nel momento più difficile della mia vita....grazie perché quando volevo mollare tutto mi avete dato la forza di reagire....questa tesi é dedicata anche a voi!!

Un grazie speciale va alla mia chef....non ci sono parole e non riusciro' mai a ringraziarti per tutto quello che hai fatto per me. Hai avuto fiducia in me delle volte molto di più di quanto ne avessi io stessa, mi hai aiutato e insegnato tutto quello che mi serviva, anche di piu', per fare una tesi. Grazie con tutto il mio cuore.

Un grazie speciale va al mio papà e alla mia mamma. Finalmente siamo riusciti a realizzare il nostro sogno...e in francese addirittura. Senza di voi non sarei mai riuscita ad arrivare dove sono, mi avete sostenuto, creduto e avuto fiducia in me sempre...Vi ringrazio per le serate passate a parlare delle mie sogliole, del PCB e dei vari cuoricini strappati alle sogliole (che facevano tanta tenerezza alla mia mamma), mi siete sempre stati ad ascoltare anche quando non capivate quasi niente di quello che dicessi...ma solo perché era la mia passione. Grazie alla mia fantastica famiglia...Anto, Roby, Andre, Micky, Lilli Fabio é raro riuscire a trovare una famiglia come voi.... Vi ringrazio per non avermi mai fatto pesare il fatto che fossi

lontano...anche quando sarei dovuta essere li! Grazie per tutto quello che avete fatto, e continuate a fare per me !!!

E come dimenticare i miei angeli : Ester, Davide, Alice e Samuele....siete la luce dei miei occhi !!

E grazie a te Stefano...per avermi sostenuto, amato, e incoraggiato sempre...

SOMMAIRE

Liste des figures	13
Liste des tableaux	17
Abréviations	18
I. Introduction générale	19
II. Etat de l'art	27
II.1. Hypoxie	29
II.1.1. Définition	29
II.1.2. Conséquences générales sur les organismes	30
II.2. Les Polychlorobiphényles (PCB)	32
II.2.1. Définitions	32
II.2.2. Propriétés chimiques	33
II.2.3. Toxicité	36
II.3. Bioénergétique	36
II.3.1. Production d'ATP	37
II.3.2. Métabolisme énergétique et concept de Fry (1947, 1971)	39
II.3.3. Classification des facteurs abiotiques selon Fry (1947, 1971)	42
II.3.4. Effets de l'hypoxie et des PCB sur les performances métaboliques de l'individu	u 44
II.4. Le système cardiovasculaire	48
II.4.1 Anatomie du cœur	49
Sinus veineux	49
Atrium ou oreillette	50
Ventricule	50
Bulbe artériel	50
II.4.2. Muscle cardiaque	50
Myofilaments	52
II.4.3 Couplage Excitation-Contraction	53
II.4.4 Battement cardiaque	55
II.5 Effets des PCB sur les performances cardiaques	57
II.6. Le comportement anti-prédateur	59
II.6.1.Definitions	59
II.6.2.Les effets de l'hypoxie sur le comportement anti-prédateur	62

CHAPITRE III - Métabolisme aérobie et tolérance à l'hypoxie chez les juvéniles de sole comi	mune
(Solea solea L. 1758) contaminés aux PCB	63
III.1. Introduction générale	65
III.2. Introduction	69
III.3. Materials & methods	71
III.3.1 Experimental animals	71
III.3.2 Protocol of food contamination	71
III.3.3 Protocol of sole contamination	72
III.3.4. PCB analysis.	73
III.3.5. Respirometry	74
III.3.6. Experimental protocol	74
III.3.7. Calculation of the oxygen consumption and O _{2crit}	75
III.3.8. Assessment of Active Metabolic Rate (AMR), Standard Metabolic Rate (SMR), Aer	
Metabolic Scope (AMS) and critical oxygen saturation (O _{2 crit})	
III.3.9. Statistical analysis	
III.4. Results	78
III.5. Discussion	82
III.6. Conclusion	
III.7. Synthèse	87
CHAPITRE IV - Performances cardiaques chez les juvéniles de sole commune (Solea solea L. contaminés aux PCB	
IV.1. Introduction générale	91
IV.2. Introduction	94
IV.3. Materials & methods	95
IV.3.1 Animals handling and care	95
IV.3.2 Protocol of food contamination	96
IV.3.3 Protocol of sole contamination	96
IV.3.4 Tissue preparation	97
IV.3.5 Experimental protocol	97
IV.3.6 Experimental design	98
IV. 3.7. Statistics	100
IV.4. Results	101
IV.4.1 Frequency effect	101
IV.4.2 Peak tension	102
IV.5. Discussion	104

IV.6. Synthèse	. 109
CHAPITRE V - L'effet de l'hypoxie sur la fréquence de ventilation chez la sole commune (Solea sol 1758) exposée à un stimulus de danger	
V.1. Introduction générale	. 113
The effect of hypoxia on ventilation frequency in startled common sole (Solea solea L. 1758)	115
V.2. Introduction	. 116
V.3. Materials & methods	. 117
V.4. Results	. 118
V.5. Discussion	. 120
V.6. Synthèse	. 123
CHAPITRE VI –	. 125
La contamination par polluants organiques influence-t-elle la tolérance hypoxique et thermique de sole commune (Solea solea L. 1758) ?	
VI.1. Introduction générale	. 127
VI.2. Introduction	. 130
VI.3 Material & methods	. 134
VI.3.1 Animal	. 134
VI.3.2 Food contamination	. 134
VI.3.3 Fish contamination.	. 135
VI.3.4 Experimental set-up	. 135
VI.3.5 Hypoxic challenge	. 136
VI.3.6 Thermal challenge	. 136
VI.3.7 Variables	. 136
VI.3.8 Statistical analysis	. 137
VI.4 Results	. 137
VI.4.1 Hypoxic challenge	. 137
VI.4.2 Thermal challenge	. 138
VI.5 Discussion	. 139
VI. 6. Synthèse	. 143
CONCLUSION GENERALE	. 145
Bibliographie	. 156

Liste des figures

- Figure II.1. Distribution globale des zones à faible teneur en oxygène (< 2ml O₂ I⁻¹) dans les zones côtières (d'après Diaz et al. 2010).
- Figure II.2. Structure chimique générale des PCB.
- Figure II.3. Structure chimique des congénères de PCB employés dans les études présentées aux Chapitres III, IV et VI.
- Figure II.4. Représentation schématique de la voie du métabolisme aérobie et anaérobie pour la production d'ATP (source: http://jeanzin.fr/ecorevo/sciences/mitochon.htm).
- Figure II.5. Individu considéré comme un « système ouvert » : la matière brute ingérée (e.g. nourriture/ matière organique) est transformée à travers les processus métaboliques en énergie chimique nécessaire pour accomplir les différentes « activités ».
- Figure II.6. Représentation schématique des effets des facteurs environnementaux sur la capacité métabolique aérobie d'un poisson. (A) <u>Facteurs de contrôle</u> (e.g. température); ils agissent sur la cinétique des réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme et induisent l'augmentation du métabolisme actif (AMR) et de maintenance (SMR). (B) <u>Facteurs limitants</u> (e.g. oxygène); l'hypoxie provoque une diminution du AMR et par conséquence de la capacité métabolique aérobie qui s'amplifie lorsque la raréfaction en oxygène s'aggrave; (C) <u>Facteurs masquants</u> (e.g. salinité, polluants); ils induisent l'augmentation du SMR.
- Figure II.7. Représentation schématique de la variation du taux métabolique maximal en fonction de la concentration d'oxygène dans l'eau (____). A chaque taux métabolique de routine (RMR) correspond une concentration en oxygène limitante (LOC) en deçà de laquelle il ne peut être maintenu. L'animal bascule alors d'un état oxy-régulateur à un état oxy-conformeur. La LOC augmente avec le RMR; lorsque RMR₂ >RMR₁ □, alors LOC₂>LOC₁. Au niveau métabolique de maintenance, la LOC correspond à la teneur en oxygène critique (CritO₂; d'après Neill et al. 1999, modifié par Claireaux et Lagardère 1999). Les

- «facteurs masquants» vont induire l'augmentation du métabolisme de maintenance (MM*), en induisant une augmentation de la concentration critique en oxygène (CritO₂*)
- Figure II.8. Représentation du cœur d'un poisson. Les flèches bleues vont indiquer le sens de circulation du sang. Le sinus veineux reçoit le sang appauvri en O₂ provenant de la circulation systémique. Le sang passe successivement dans l'atrium puis dans le ventricule et est ensuite éjecté par l'aorte ventrale, en passant par le bulbe artériel, vers les branchies pour être oxygéné (Satchell 1991).
- Figure II.9. Représentation schématique d'un cardiomyocyte; RS: réticulum sarcoplasmique, ICa: canal calcique de type L (*low*) voltage-dépendant, NCX: échangeur Na/Ca (en mode inverse ou réverse); RyR: canal calcique ligand dépendant, sensible à la ryanodine; ATP: pompes calciques chargées d'expulser le calcium à l'extérieur ou de repomper le calcium dans le RS (SERCA au niveau du RS et PCMA au niveau du sarcolemme).
- Figure II.10. Représentation schématique de la modulation de la fréquence et de la force de contraction cardiaque chez un téléostéen. Les cellules pacemaker imposent le rythme cardiaque (voie intrinsèque), modulé par le tonus accélérateur adrénergique (voie nerveuse et humorale) ou inhibiteur cholinergique (voie nerveuse).
- Figure III.1.Correlation between the concentrations of CB 153 (ng g⁻¹ dw) and standard metabolic rate (SMR) in the high PCB-contaminated group during 60 days (PCB_{high-60}: SMR= 18.83+0.022 [CB153], R²= 0.77; Pearson correlation: $r_{PEARSON}=0.85$, $P_{PEARSON}<0.001$).
- Figure III.2. Average maximum metabolic rate (MO_{2max}) measured in tested groups after 30 (Control, n= 8; Solvent, n=8; PCB_{low}, n=7; PCB_{high}, n=8) and 60 days of contamination (Control, n= 6; Solvent, n=13; PCB_{low}, n=14; PCB_{high}, n=11). For a given level of O₂ saturation and a given period of contamination, * indicates a significant difference with the control group (P_{ANOVA}<0.05); for a given level of O₂ saturation and a given treatment, ^a indicates a significant

- difference between 30 and 60 days of contamination ($P_{PLANNED}$ COMPARISON < 0.05). All the values are means \pm S.D.
- Figure IV.1. PCB-contamination effect evaluated at each pacing frequency (Hz) tested. * indicates a significant effect of the AD (p<0.05); ^a represents a significant difference from the CTRL group (p<0.05).
- Figure IV.2. Force-frequency response obtained under different treatments, as showed in the legend. * indicates a significant effect of the RYA on the ventricle pretreated with different concentrations of AD (10nmol⁻¹ and 10μmol⁻¹) compared to the ventricle without RYA.
- Figure V.1. Average ventilation frequency (F_V) vs time in freezing *S. solea* in normoxia TN, \blacktriangle and hypoxia: TH, \blacksquare . Relative experimental time is indicated as t control, the time period used for calculating F_V control (i.e. F_V during the 5 min prior to stimulation); t $_{0s}$, the time period used for calculating $F_{V \ 0s}$, (i.e. F_V during the 15 s that followed stimulation); t $_{30s}$, t $_{60s}$,, t $_{300s}$, the time periods during which the post-stimulus F_V measurements were taken. For each level of oxygen tested, values with different superscripts are significantly different from their F_V control (P < 0.05). For each time period, an asterisk (*) indicates a significant difference between TN and TH (P < 0.05). All values are means \pm S.E.
- Figure VI.1. Temperature and oxygen-related variations in aerobic metabolic scope (AMS).

 A- AMS is maximal at a species-specific thermal optimum (T_{opt} - -) below and above which it decreases to become almost nil at a low and high critical temperature (T_{crit-min/max}----). Limiting environmental conditions such as hypoxia reduce (→) the active metabolic rate and a decreased AMS (■) is observed. As a consequence the low and the high critical temperatures are increased and reduced respectively (T_{crit-min/max} - -), which reduces the range of temperature the fish can tolerate. B- At a fixed temperature the maximal aerobic metabolic rate (MO_{2 max}) decreases with the oxygen level until it reaches the standard metabolic rate (SMR). The particular oxygen level at which MO_{2 max} = SMR is the critical oxygen level (O_{2crit}, Fry, 1948; Steffensen et al. 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann and Steffensen 1997; Iversen et al. 2010). Exposition to pollutants may induce both a reduction in (MO_{2 max} ■) and an increase in (SMR ■). As a consequence, the fish critical oxygen level is

increased (O_{2crit}), the AMS is reduced (\leftarrow and \rightarrow) and the fish tolerance to hypoxia is decreased.

- Figure VI.2. Hypoxia tolerance. Minimum level of oxygen (O_{2-min}) at which sole lost equilibrium. Four treatments were tested: uncontaminated control sole (C) and individuals fed with pellets containing solvent (S), polychlorinated biphenyl (PCB) or polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH).
- Figure VI.3. Thermal tolerance. Critical thermal maxima (CT_{max}) in control sole (C) and in individuals fed with pellets treated with solvent (S), polychlorinatedbiphenyl (PCB) or polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Sole were exposed to a thermal challenge in normoxia (n) or in hypoxia (n). For a given treatment, \square indicates significant difference between CT_{max-50} assessed in normoxic and hypoxic conditions.

Liste des tableaux

- Table III.1. Concentration (ng g⁻¹) of the four PCB congeners used for the contamination of commercial pellets. PCB_{low} and PCB_{high} correspond to a total concentration of 670 and 2239 ng PCB g⁻¹ of food respectively.
- Table III.2. Concentration (Mean \pm SD, ng g⁻¹ dw) of the congener CB153 in the liver of PCB-contaminated soles after 30 and 60 days of contamination. Soles from the group PCB_{low} and PCB_{high} were exposed to a total of PCB concentration of 670 and 2239 ng PCB g⁻¹ of food, respectively. Values not sharing a common superscript were significantly different (P_{ANOVA} <0.05).
- Table III.3. Average (\pm SD) of the Active Metabolic Rate (AMR), Standard Metabolic Rate (SMR), Aerobic Metabolic Scope (AMS) and critical oxygen saturation (O_{2crit}) in the four experimental groups of sole: the PCB-exposed individuals (PCB_{low} and PCB_{high}) and the uncontaminated individuals (Control and Solvent). For each treatment, * indicates values that are significantly different between 60 and 30 days ($P_{PLANNED COMPARISON} < 0.05$).
- Tableau IV.1 Peak tension (mN mm-2) value in the four tested groups added with the tonic and maximal concentrations of adrenaline (10 nmol-1 and 10 μ mol-1 respectively)

Abréviations

a.s.: saturation en air, air saturation

ADP: adénosine diphosphate

AMP: adénosine monophosphate

AMR: taux métabolique actif, active metabolic rate

AMS: capacité métabolique aérobie, aerobic metabolic scope

ATP: adénosine triphosphate

CEC: couplage excitation contraction, excitation-contraction coupling

CIRC: Ca^{2+} - Induce- Ca^{2+} release

CT_{max}: température critique maximale, critical thermal maxima

CT_{max-50}:température à laquelle 50% des individus testés perdent l'équilibre, temperature at which 50% of the tested individuals lost equilibrium

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

LOC: concentration en oxygène limitante, limiting oxygen concentration

MO₂: consommation d'oxygène, oxygen consumption

MO_{2 max}: consommation d'oxygène maximale, *maximal oxygen consumption*

O_{2 crit}: concentration critique en oxygène, *critical oxygen concentration*

O_{2min}: niveau d'oxygène auquel un poisson perd l'équilibre, *level of oxygen at which* a fish lost equilibrium

O_{2min-50}: niveau d'oxygène auquel 50% des individus testés perdent l'équilibre, *level of oxygen at which 50% of the tested individuals lost equilibrium*

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons

PBDE: polybromodiphényléthers

PCB: polychlorobiphényles, polychlorinated biphenyls

POP: polluants organiques persistent, persistent organic pollutants

RMR: taux métabolique de routine, routine metabolic rate

RS: reticulum sarcoplasmique, sarcoplasmic reticulum

SMR: taux métabolique de maintenance, standard metabolic rate

I. Introduction générale

Introduction générale

La zone côtière est située à l'interface de deux grands biomes du globe : l'océan et le continent. Cette situation géographique particulière confère aux habitats côtiers des propriétés qui dépendent des interactions à l'échelle locale entre les écosystèmes aquatiques et terrestres. Les habitats côtiers sont ainsi généralement caractérisés par une forte biodiversité associée à une productivité élevée (Costanza 1997). Ces particularités font que, pour la plupart des téléostéens, ces zones représentent des nourriceries, définies comme des zones géographiques limitées où les juvéniles se concentrent pour s'y nourrir et se développer pendant leurs premières années d'existence (Beck et al. 2001). Cependant, les milieux côtiers sont également caractérisés par une forte variabilité physico-chimique (Diaz et Rosenberg 1995). Ils sont ainsi sources de compromis pour les organismes s'y développant entre, d'une part, les avantages qu'ils fournissent, c'est-à-dire une source d'aliments importante et diversifiée, assurée par une forte production primaire et secondaire (Nixon 1995; Loneragan et Bunn 1999) et d'autre part, les pressions environnementales comme les variations de la température, de la concentration d'oxygène dans l'eau, du pH, de la salinité, ... Bien que d'origine naturelle, cette variabilité environnementale est également sous influence anthropogénique, et certains paramètres se retrouvent amplifiés du fait du changement climatique (Diaz et Rosenberg 1995, 2008). Par exemple, une augmentation de la température de 0.26°C par décennies a été enregistrée entre 1977 et 2007 dans le Golfe de Gascogne (Goikoetxea et al. 2009) qui constitue l'une des nourriceries les plus productives de l'Atlantique Nord Est (Le Pape et al. 2003). Si la température est au cœur de la problématique du changement climatique, d'autres facteurs environnementaux font aussi partie du débat comme le pH ou la teneur en oxygène dissous. L'hypoxie, ou diminution de la concentration en oxygène dissous dans l'eau, est également un phénomène d'origine naturelle qui se vérifie lorsque les taux de respiration des organismes excèdent la production d'oxygène issue des organismes autotrophes et de la diffusion de l'oxygène atmosphérique. En raison d'une accentuation des phénomènes d'eutrophisation d'origine anthropogénique, la fréquence et l'amplitude de ces événements hypoxiques s'intensifient dans les habitats aquatiques du monde entier (Diaz 2001; Wu 2002; Diaz et al. 2004). Par exemple, sur les côtes de l'Oregon aux Etats-Unis, des conditions d'hypoxie précédemment non signalées ont été observées depuis le début des années 2000, avec des niveaux atteints particulièrement sévères en 2006 (10% de saturation en air).

Au-delà de l'amplification de la variabilité environnementale d'origine naturelle, les activités anthropiques causent également l'introduction dans le milieu marin de **substances**

xénobiotiques, comme les métaux lourds ou les polluants organiques persistants (POPs) (Lipiatou et al. 2007 ; Fernandes et al. 1997 ; Van Dolah et al. 2008 ; Moon et al. 2009). Par exemple, dans la Baie de la Seine, une des zones les plus contaminées en France, la concentration de Polychlorobiphényles (PCB) augmente de 2 ng 1^{-1} en mer ouverte à 250 ng 1^{-1} dans la zone estuarienne pour arriver à des concentrations de $1,3\mu g$ 1^{-1} dans les zones ayant une turbidité élevée (Abarnou et Simon 1986 ; Marchand 1989).

Ainsi, les organismes marins côtiers sont exposés à un ensemble de facteurs environnementaux qui ont été définis par différents auteurs comme une matrice présentant des variations spatiales mais aussi temporelles (e.g. Kerr 1990, Claireaux et Lefrançois 2007). Au sein de cette matrice, les facteurs interagissent entre eux de manière synergique, antagoniste ou additive. Par exemple, la température peut modifier la biogéochimie d'un certain nombre de polluants chimiques aboutissant à un changement significatif de leur toxicité (Schiedek et al. 2007). Il est aussi généralement admis qu'une augmentation de température peut induire une élévation du taux d'assimilation de polluants via des changements thermo-dépendants du métabolisme et du taux de ventilation, qui, en s'accélérant, favorise les échanges entre le sang et le milieu environnant de l'animal (Kennedy et Walsh 1997; Schiedek et al. 2007).

Face à ces contraintes environnementales, les poissons côtiers doivent faire preuve d'une forte capacité d'adaptation pour survivre. Ce succès adaptatif est particulièrement déterminant chez les juvéniles, dont la survie influence le niveau de recrutement et participe au maintien de la population. Les organismes exposés à la variation des facteurs environnementaux sont considérés comme étant dans un état de stress, défini comme un 'état d'altération' qui augmente la demande énergétique des individus (Martinez-Porchas et al. 2009). En 1929, Cannon définit le terme d'homéostasie comme l'aptitude d'un organisme à rétablir son équilibre intérieur suite à des perturbations provoquées par des facteurs extérieurs en mettant en œuvre toute une série de mécanismes physiologiques (e.g. nerveux, hormonaux). D'une façon générale, c'est en s'éloignant de cet équilibre qu'un organisme peut être considéré en situation de stress. D'après Selye (1985), le stress peut être divisé en deux catégories : « eustress » ou stress positif et « distress » ou stress négatif. Pour mieux le définir, on peut dire que l' « eustress » correspond au cas d'un organisme exposé à des contraintes environnementales provoquant des changements physiologiques aboutissant au rétablissement de l'homéostasie, et ainsi à l'optimisation de ses performances biologiques.

Au contraire, les organismes se trouvent dans une situation de «distress» lorsque les changements physiologiques sont tels que l'organisme n'est plus capable de rétablir l'état d'homéostasie, et donc de maintenir son intégrité fonctionnelle. Tous les facteurs environnementaux qui tendent à perturber l'équilibre homéostatique sont appelés **stresseurs**; dans cette dénomination sont inclus les facteurs environnementaux abiotiques (e.g. température, taux d'oxygène dessous dans l'eau, pH, salinité), biotiques (e.g. compétition pour la nourriture, pression de prédation) ou d'origine anthropique (e.g. substances xénobiotiques).

De façon générale, la réponse au stress chez les téléostéens est caractérisée par la stimulation de l'hypothalamus, qui va à son tour stimuler le système neuroendocrinien provoquant la libération dans le sang d'hormones dites 'de stress' (i.e. les catécholamines et corticostéroïdes). L'émission de corticostéroïdes dans le sang et dans les tissus provoque la mobilisation de substrats énergétiques comme le glucose, qui constituera alors la source d'énergie requise pour assurer les ajustements physiologiques nécessaires au rétablissement de l'homéostasie de l'animal dans son nouvel environnement (Wedemeyer et al. 1990; Wendelaar Bonga 1997; Barton 2002; Lowe et Davison 2005). Dans ce contexte, il est nécessaire de définir la notion de coût de tolérance. La tolérance peut être définie comme la capacité des organismes à faire face aux stress auxquels ils sont exposés dans leur environnement (Wedemeyer et al. 1984). Le concept de coût de tolérance se base sur le fait que cette capacité représente une dépense énergétique supplémentaire pour l'organisme, impliquant une diminution de l'énergie disponible pour ses autres activités (Holloway et al 1990), comme la locomotion, la digestion, la croissance ou la reproduction. Ainsi, même lorsque les contraintes environnementales n'induisent pas la mort des organismes à court terme, il est raisonnable de penser qu'à plus ou moins long terme les activités et les fonctions physiologiques de l'animal peuvent être compromises. Petersen et Pihl (1995) ont par exemple observé que durant des épisodes hypoxiques dans le détroit de Kattegat, situé entre le Danemark et la Suède, la limande Limanda limanda et la plie Pleuronectes platessa étaient régulièrement exposées à une oxygénation inférieure à 40% de saturation en air. Au travers d'une étude expérimentale menée en parallèle, ces mêmes auteurs ont démontré que l'exposition pendant 4 à 8 semaines à une concentration en oxygène < 3 mg l⁻¹ (~ 40% saturation en air) induisait une diminution de croissance chez ces poissons. Dans cette étude, la réponse sub-létale aux facteurs environnementaux a été estimée à travers la croissance, une des fonctions clés pour la population. D'une manière plus générale, ces effets peuvent aussi

être évalués à partir de réponses comportementales (e.g. nage, recherche de nourriture....) ou physiologiques (e.g. capacité métabolique, performances cardiaques, ...) qui participent toutes à la fitness des organismes et sont donc susceptibles d'influencer la population à plus ou moins long terme (e.g. Fry 1971; Priede 1985; Miller et al. 1991; Cooke et al. 2004; Claireaux et Lefrançois 2007).

Dans ce travail de thèse, j'ai ainsi évalué les effets sub-létaux de certains facteurs environnementaux, comme l'hypoxie et les polluants organiques persistants sur les performances physiologiques et comportementales de la sole commune, *Solea solea* (*Linneaus*, 1758).

L'intérêt d'étudier les réponses physiologiques et comportementales de la sole commune est lié à son style de vie, aussi bien qu'à son importance économique. La sole est un poisson benthique qui passe la plupart de sa vie sur les fonds meubles de sable fin, de sable vaseux ou de vase (Le Pape 2003). Principalement nocturne, la sole s'alimente surtout d'organismes benthiques comme de petits crustacés ou bivalves, de vers et, selon la taille, de petits poissons. Les adultes pondent leurs œufs au large. Les œufs et les larves dérivent avec le courant jusqu'aux côtes, où ils vont se développer et passer les deux premières années de leur vie dans des zones de nourricerie. Au sein des nourriceries, la survie des juvéniles de sole dépend de facteurs biotiques comme la présence de proies et de prédateurs (Amara et al. 1994), tout autant que de leur capacité à s'adapter aux variations des facteurs environnementaux abiotiques, tels que la température, l'oxygénation de l'eau, la salinité ou le pH. A cause de son style de vie benthique et de sa capacité de nage réduite, la sole est soumise aux propriétés du sédiment, liées à sa composition, et est ainsi fortement exposée aux phénomènes hypoxiques. Bouchet et al. (2007) ont par exemple montré dans les Pertuis Charentais que la concentration en oxygène à proximité du substrat peut descendre à 20% de saturation en air au cours des mois de mai et juin. Par ailleurs, les sédiments constituent un compartiment où les POPs ont tendance à s'accumuler (Jeremiason et al. 1999, Jonsson et Carman 2000). Les juvéniles de soles s'y développant sont ainsi susceptibles d'être plus fortement exposés par sédiment-contact à certains polluants en comparaison des espèces vivant dans la colonne d'eau. Par ailleurs, le fait de se nourrir d'organismes benthiques soumet les soles à la contamination par voie trophique.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR SoleBemol (Sole Bioaccumulation Ecotoxicologie MOdéLisation), qui vise à étudier le 'Devenir et les effets des contaminants dans les soles' et les 'Réponses biologiques à l'échelle de l'individu et de la population'. Pour mieux évaluer les conséquences liées à la survie dans un milieu côtier fortement anthropisé, j'ai étudié expérimentalement les effets de l'hypoxie et des PCB-Polychlorobiphényles sur les performances physiologiques et comportementales des juvéniles de sole commune. Pour cela, j'ai réalisé mon étude à deux échelles d'organisation biologique, l'organe et l'individu, afin de répondre aux objectifs suivants :

1/ examiner les effets d'une exposition chronique à des concentrations sub-létales de PCB sur le métabolisme aérobie et la tolérance à l'hypoxie ;

2/ évaluer l'altération des performances cardiaques suite à un stress induit par une contamination chronique aux PCB ;

3/ étudier la réponse anti-prédateur de la sole en conditions d'hypoxie sub-létale.

Ce manuscrit de thèse sera divisé en 6 parties. Dans la première et dans la deuxième partie (« *I. Introduction* » et « *II. Etat de l'art* ») sont présentés les effets dérivés par l'anthropisation en zone côtière et leurs influences sur la variabilité des facteurs environnementaux. Deux facteurs environnementaux seront abordés plus particulièrement : les PCB et l'hypoxie. Par la suite je présenterai l'état des connaissances concernant la bioénergétique, le système cardiovasculaire et le comportement anti-prédateur chez les téléostéens, qui seront au centre des études présentées ensuite dans les chapitres *III* à *VI*.

Dans la troisième partie (*Chapitre III*) je me suis intéressée aux effets de l'hypoxie et /ou de la pollution organique (i.e. exposition chronique aux PCB) sur le métabolisme énergétique et la tolérance à l'hypoxie des juvéniles des soles en utilisant des approches de respirométrie. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication accepté dans la revue *Aquatic Toxicology*.

Dans la quatrième partie (*Chapitre IV*), à travers une étude effectuée en laboratoire sur le cœur *in vitro*, j'ai voulu évaluer si les PCB en contamination chronique, en tant que « stresseurs potentiels » pouvaient affecter les performances cardiaques.

Introduction générale

Dans la cinquième partie (*Chapitre V*), je me suis intéressée au comportement antiprédateur chez la sole commune en condition d'hypoxie. En particulier, j'ai focalisé mon étude sur la réponse physiologique à travers l'étude de la fréquence de ventilation. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue *Journal of Fish Biology*.

Dans la sixième partie (*Chapitre VI*), j'ai étudié la tolérance à l'hypoxie et à la température au travers de challenges chez les soles ayant été soumises à des périodes de contamination sur du long terme (e.g. 24 mois) et à de deux types de contaminants, les PCB et HAP (i.e. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques).

II. Etat de l'art

II.1. Hypoxie

II.1.1. Définition

La solubilité de l'oxygène dans l'eau, tout en restant toujours plus faible par rapport à d'autres gaz comme le dioxyde de carbone, dépend de la température et de la salinité; à 15°C par exemple la solubilité de l'oxygène dans l'eau de mer est de 5,7 ml·l¹ alors qu'elle atteint 1019 ml·l¹ pour le dioxyde de carbone. La concentration d'oxygène est ainsi 20 à 40 fois plus faible dans l'eau que dans l'air, ce qui rend cet élément particulièrement limitant au sein des écosystèmes aquatiques. Ces dernières décennies, les activités anthropogéniques ont entrainé une augmentation des incidents hypoxiques, voire anoxiques, dans le monde entier (Fig. II.1). Les apports excessifs de nutriments en sont la principale cause. En stimulant le développement d'espèces algales, ils provoquent des phénomènes d'eutrophisation au cours desquels la dégradation de la matière organique consomme de l'oxygène, conduisant à une baisse générale de la concentration de cet élément dans le milieu.

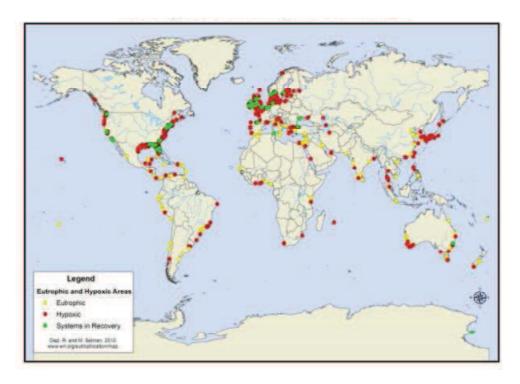


Figure II.1. Distribution globale des zones à faible teneur en oxygène ($< 2ml O_2 l^{-1}$) dans les zones côtières (d'après Diaz et al. 2010)

Un habitat marin est considéré hypoxique lorsque la concentration en oxygène est au-dessous de 20% (Diaz 2001). Ce seuil est souvent considéré dans la littérature pour caractériser l'état chimique d'un habitat. Toutefois l'hypoxie peut être définie par rapport à ses effets sur les organismes. L'espèce, les niveaux d'organisation biologique, ainsi que le type d'exposition (chronique ou aigue) sont alors à prendre en considération (Vaquer-Sunyer et Duarte 2008 ; Richards 2011). Par exemple, Petersen et Pihl (1995) ont observé chez la plie Pleuronectes platessa et la limande commune Limanda limanda une diminution de la croissance (25-30%) dès 40% de saturation en air. Pour des espèces très actives comme le thon listao Katsuwonus pelamis, une teneur en O2 en dessous de 60% est létale (Gooding et al. 1981). Au contraire, parmi les poissons d'eau douce, le carassin commun Carassius carassius et le poisson rouge Carassius auratus sont parmi les espèces les plus tolérantes à l'hypoxie (Vornanen et al. 2009). Ces cyprinidés sont capables de résister à l'absence complète d'oxygène jusqu'à plusieurs mois dépendamment de la température à laquelle ils sont exposés (Vornanen et al. 2009). Dans ce manuscrit, on considérera donc une définition plus générale pour l'hypoxie; à savoir que l'hypoxie est vérifiée lorsque l'oxygène dans l'eau atteint des concentrations auxquelles les fonctions physiologiques des organismes qui y sont exposées sont compromises (Farrell et Richards 2009).

II.1.2. Conséquences générales sur les organismes

L'hypoxie environnementale provoque chez les organismes qui y sont exposés une hypoxie dite systémique, caractérisée par une diminution de la teneur en oxygène dans le sang (e.g. Farrell et Richards 2009). La demande en oxygène des tissus excède alors l'apport d'oxygène circulatoire, comme il peut être observé au cours d'une activité physique intense, d'une variation de la température corporelle ou du pH (Pörtner et Lannig 2009).

Les poissons qui se trouvent dans un environnement hypoxique présentent des adaptations physiologiques, anatomiques et comportementales qui limitent l'hypoxie systémique, en augmentant l'apport en oxygène et/ou en diminuant les besoins en oxygène (Hughes 1973). Ces adaptations varient selon l'espèce, le stade de développement (Diaz et Rosenberg 1995 ; Andersen et al. 2005 ; Ishibashi et al. 2007), et aussi selon que l'hypoxie soit chronique ou aigue.

A la perception des conditions hypoxiques, une des premières réponses compensatoires est une réponse comportementale d'évitement vers des habitats présentant une meilleure oxygénation. Généralement, cette réponse est observée chez les espèces pélagiques (Domenici et al. 2000 ; Herbert et Steffensen 2005, 2006) et peut parfois être présente chez des espèces benthiques si la zone hypoxique est restreinte. L'absence de vésicule natatoire chez la plupart des poissons benthiques engendre en effet une élévation de la dépense énergétique liée aux déplacements dans la colonne d'eau, limitant l'activité natatoire prolongée (Duthie 1982 ; Dalla Via et al. 1994). La réaction d'évitement peut être aussi liée à la recherche de zones où la température est plus basse et présentant, de ce fait, une concentration en oxygène plus importante (Crawshaw et O'Connor 1997). D'un point de vue physiologique, la diminution de température participe également à une diminution du métabolisme aérobie réduisant ainsi les besoins en oxygène (e.g. Schurmann et Steffensen 1992).

En complément des réponses comportementales, les ajustements physiologiques permettent aux poissons de faire face à la diminution en oxygène à plus ou moins long terme.

A court terme, l'augmentation de la fréquence et /ou de l'amplitude des mouvements ventilatoires permet, en augmentant le débit d'eau ventilé, d'optimiser le gradient d'oxygène eau/sang et de maintenir une diffusion importante à travers l'épithélium respiratoire (Randall 1982 ; Graham 1997 ; Maxime et al. 2000 ; Lefevre et al. 2011). La diffusion est également améliorée par (i) l'augmentation de la perfusion des branchies (Smith et al. 2001 ; Russel et al. 2008) et (ii) le recrutement de lamelles branchiales non perfusées en conditions normoxiques (Randall 1982 ; Vornanen et al. 2009). Une diminution de la fréquence cardiaque (bradycardie) est également une réponse souvent observée chez les téléostéens soumis à des conditions hypoxiques (Farrell 2007). Cependant, le niveau d'oxygénation auquel la bradycardie est déclenchée est très variable (Randall 1982 ; Fritsche et Nilsson 1989 ; Claireaux et al. 1995). Cette variation peut être attribuée à la diversité des conditions expérimentales testées, ainsi qu'au caractère espèce-spécifique des mécanismes de régulation du rythme cardiaque. La capacité de transport de l'oxygène dans le sang peut aussi être améliorée à travers l'augmentation de l'hématocrite, correspondant au pourcentage relatif du volume occupé par les hématies par rapport au volume sanguin (Wu 2002).

Lorsque les stratégies pour améliorer l'apport en oxygène ne sont plus suffisantes, les poissons entrent dans un état de dépression métabolique appelé aussi état hypométabolique. Cet état se traduit par un ralentissement du métabolisme aérobie et, donc, par une réduction de la demande en oxygène ; il s'accompagne également d'une sollicitation majeure du métabolisme anaérobie (Richards 2009). Cette réduction du métabolisme aérobie aboutit à des modifications du comportement des poissons comme une diminution de l'activité de nage, de la recherche de nourriture ou de la prise alimentaire (Schurmann et Steffensen 1994; Chabot et al. 2001; Herbert et Steffensen 2005). Par exemple, Dalla Via et al. (1998) ont montré comment, chez la sole commune Solea solea, l'hypoxie induisait des variations de l'activité natatoire. La diminution d'oxygène entre 80 et 20% de saturation en air est accompagnée par un ralentissement de l'activité natatoire. En dessous de ce seuil, la sole s'immobilise sur le substrat. Entre 20 et 6% de saturation en air, elle commence à utiliser deux stratégies métaboliques différentes ; elle 'active' son métabolisme anaérobie, alors que le métabolisme est ralenti jusqu'à un taux inférieur au métabolisme de base. À 5% de saturation en air, la sole nage vers la surface par mouvements saccadés, perd l'équilibre pour finalement rester paralysée sur le substrat. L'effet spécifique de l'hypoxie sur le métabolisme aérobie sera développé dans le paragraphe III.3.4.1.

A plus long terme, les espèces de téléostéens exposées chroniquement à l'hypoxie ont développé des adaptations améliorant l'assimilation de l'oxygène. Certaines de ces adaptations sont d'ordre anatomique et vont d'une forte vascularisation de la cavité buccale, d'une augmentation de la surface branchiale (Sollid et al. 2005, 2006) jusqu'au développement d'organes pour la respiration aérienne permettent l'utilisation de l'oxygène atmosphérique (Brauner et al. 1995; Randall et al. 2004; Soares et al. 2006; McKenzie et al. 2007a).

II.2. Les Polychlorobiphényles (PCB)

II.2.1. Définitions

Parmi les POPs présents dans les zones côtières, les PCB sont parmi les plus toxiques et largement distribués dans l'environnement (Barron et al. 2004).

Les PCB ont été synthétisés pour la première fois en 1881 et La *Monsanto Industrial Chemical Company* (St. Louis, Missouri, Etats Unis) a débuté leur production industrielle en 1929. Les PCB ont été largement utilisés dans les produits de l'industrie électrique comme les agents isolants présents dans les transformateurs et condensateurs (Eisler 1996). Bien que la production de PCB ait été interdite aux Etats Unis depuis 1977, en Europe depuis 1985 (85/467/EEC, 6th amendement to Directive 76/769/EEC) et en France depuis 1987, les PCB sont à ce jour toujours présents dans les écosystèmes marins et terrestres du monde entier.

La contamination par les PCB a été mise en évidence en Suède, il y a environ 30 ans, dans la chair du brochet *Esox lucius* (Jensen 1966). Á la suite de cette découverte, de nombreuses études se sont intéressées aux PCB et la présence de ces éléments dans de nombreux habitats naturels a été avérée (e.g. Edwards 1971; Kalmaz et Kalmaz 1979; Waid 1986). Aujourd'hui, les PCB sont considérés comme un problème environnemental au niveau mondial (Breivik et al. 2002) principalement à cause de leur capacité à s'accumuler tout au long de la chaîne trophique.

II.2.2. Propriétés chimiques

Le terme de PCB désigne une famille de composés organochlorés de synthèse de haut poids moléculaire, de formule chimique $C_{12}H_{10-x}Cl_x$, (Fig. II.2) obtenus par chloration du biphényle.

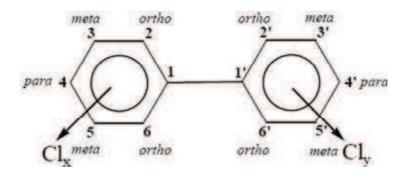


Figure II. 2. Structure chimique générale des PCB

Les PCB sont constitués de 209 congénères variant selon le nombre et la position des atomes de chlore. Le classement en groupes homologues se base sur le nombre d'atomes de chlore présents sur le noyau du biphényle que contient chaque composé, qui vont des

monochlorobiphényles aux décachlorobiphényles, contenant respectivement un et dix atomes de chlore. Les propriétés physico-chimiques de chaque congénère de PCB (solubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau), ainsi que leur toxicité, sont déterminées par leurs caractéristiques structurales. A cause de leur stabilité chimique, leur caractéristique hydrophobe et leur persistance, les PCB ont été signalés dans tous les compartiments de l'environnement. Leurs concentrations peuvent aller de la dizaine de pg 1⁻¹ dans les eaux océaniques, pour atteindre quelques mg kg-1 dans les tissus adipeux des mammifères marins (Abarnou et Loizeau 1994). Dans les zones côtières, ce sont les estuaires qui sont les plus exposés à ces contaminants (Long 2000). C'est le cas de la baie de Seine en France où les niveaux de présence de ces composés atteignent 1,3 µg 1⁻¹ (Marchand 1989). La zone côtière est décrite comme un réservoir de POPs. Les PCB ont une très faible solubilité dans l'eau illustrée par un K_{ow} 1 compris entre 4,6 et 9,7. Leur propriété lipophile favorise ainsi leur adsorption à la matière organique présente. En plus, ce caractère lipophile participe à leur accumulation dans les tissus adipeux des organismes où ils sont piégés (e.g. Anguilla anguilla, Mariottini et al. 2006). En effet, la majorité des congénères sont très peu bio-transformables par les organismes et sont peu éliminés, entraînant une augmentation de leur concentration dans les organismes au cours de leur vie (Loizeau et al. 2001). Leur transfert s'effectue alors par voie alimentaire dans les réseaux trophiques, où ils sont susceptibles d'être bio-amplifiés à chaque niveau du réseau trophique (Borgå et al. 2001; Hoekstra et al. 2003; Burreau et al. 2004; Nfon et al. 2008). Par conséquent, les prédateurs qui se trouvent aux plus hauts niveaux de la chaîne trophique, comme les mammifères marins ou l'homme, sont particulièrement exposés, et peuvent présenter des concentrations en PCB très élevées, pouvant avoir des effets sur leurs fonctions physiologiques (Ahlborg et al. 1994; Loonen et al. 1996).

Les PCB employés pour la contamination dans mon étude sont quatre congénères choisis à cause de leur présence importante dans l'environnement : CB105, CB118, CB149 et CB153 (Fig. II.3).

¹ K_{ow} (coefficient de partage octanol-eau)

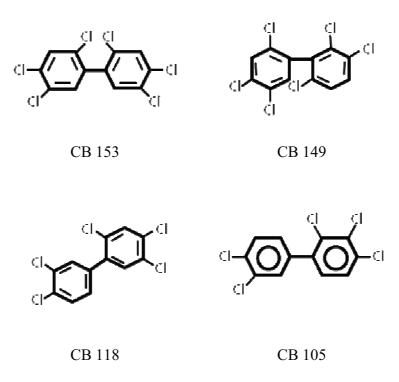


Figure II. 3. Structure chimique des congénères de PCB employés dans les études présentées aux Chapitres III, IV et VI

Le **CB 153** (2, 2', 4, 4', 5, 5' – Hexachlorobiphényle), un composé di-ortho-substitué (i.e. avec deux atomes de chlore substitué en position ortho), est le congénère le plus présent dans la matrice organique. Bien que le CB 153 présente une faible cytotoxicité, il est considéré comme le congénère le plus récalcitrant en ce qui concerne la biotransformation et donc, le plus persistant dans la chaine alimentaire (Kannan et al. 1995). Le **CB 149** (2, 2', 3, 4',5',6-Hexachlorobiphényle), également un composé di-ortho-substitué, est identifié comme un composé qui peut être partiellement métabolisé (Andersson et Förlin 1992). Le **CB 105** (2, 3, 3', 4, 4'-Pentachlorobiphényle) et le **CB 118** (2, 3',4,4', 5-Pentachlorobiphényle) sont eux des composés mono-ortho-substitués, ce qui les rend plus toxiques. Les congénères CB118 et CB 153 sont considérés par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer comme congénères 'indicateurs', c'est à dire comme représentatifs de la contamination en PCB du milieu aquatique (MacGregor et al. 2010).

II.2.3. Toxicité

Tous ces composés engendrent un large spectre de réponses toxicologiques, incluant une immunotoxicité, des déficits de reproduction, des effets tératogènes, des perturbations endocriniennes, le développement de tumeurs et carcinomes (Ahlborg et al. 1994; Hontela et al. 1995). Chez les vertébrés, les effets toxiques des PCB ont été mis en relation avec leur capacité à induire l'activation du cytochrome P450 (Cyt P450). La transformation des PCB en métabolites hydroxilés s'opère dans le foie via le système Cyt P450, qui constitue la voie majeure pour leur métabolisation (Sipes et Schelmann 1987). Cependant, la biotransformation des PCB par le Cyt P450 n'est pas toujours bénéfique pour l'organisme. Les dérivés produits peuvent parfois être plus toxiques et métaboliquement plus actifs que le composé de départ, et ainsi provoquer des dysfonctionnements cellulaires en se liant à des molécules biologiques fondamentales telles que les protéines, les ARN ou l'ADN (Parkinson et Safe 1987).

La toxicité induite par les PCB est espèce-spécifique et dépend principalement des capacités à les métaboliser, ainsi que de l'âge, de la biomasse et du contenu en lipides des individus (Abarnou et al. 2001). Par exemple, les stades embryonnaires et larvaires sont généralement reconnus comme étant beaucoup plus sensibles aux polluants que les stades adultes, à cause de défenses immunitaires réduites et d'une petite taille qui leur confère proportionnellement une plus grande surface d'échange. Outre la dose, la durée d'exposition, la voie d'administration et les congénères impliqués, il est également nécessaire de prendre en considération d'éventuelles interactions entre les différents congénères, avec d'autres composés organochlorés ou encore avec les métaux lourds (Eisler et Belisle 1996).

II.3. Bioénergétique

Tous les organismes ont besoin d'énergie pour pouvoir survivre, ainsi la plupart des biologistes la considèrent comme une « devise » commune à toute forme vivante. Cette énergie étant limitante, elle est au centre de problématiques visant à mieux comprendre son allocation vers les multiples, et complexes, processus régulant la survie d'un organisme dans son environnement. Dans la majorité des cas, cette énergie est obtenue à partir de substrats

énergétiques ingérés sous forme d'aliments, qui sont ensuite dégradés en nutriments et utilisées à travers des processus d'oxydation.

L'étude de la bioénergétique nous aide à comprendre les interactions entre les organismes et leur habitat, en évaluant comment l'énergie est repartie au sein de l'organisme en fonction de ses besoins et des contraintes environnementales auxquelles il est soumis (e.g. Fry 1971; Yamashita et al. 2001; Pörtner et Farrel 2008; Guderley et Pörtner 2010; Pörtner 2010).

Le terme de métabolisme reflète l'ensemble des réactions biochimiques qui se produisent dans un organisme lui permettant de se reproduire, de se développer, de maintenir sa structure et de répondre aux changements environnementaux. Il est composé de deux types de voies: l'anabolisme et le catabolisme. L'anabolisme regroupe l'ensemble des réactions de synthèse permettant la transformation de molécules simples en molécules complexes, comme les protéines; il est donc indispensable pour la réparation, la régénération des tissus et la croissance. Le catabolisme, au contraire, correspond aux réactions de dégradation moléculaire de l'organisme considéré. Les réactions de catabolisme font référence à des processus de dégradation de molécules complexes en molécule plus simples. Dans de nombreux cas, elles correspondent à des réactions d'oxydation qui utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. Ces réactions sont thermodynamiquement favorables, c'est-à-dire qu'elles sont exo- énergétiques et produisent donc de l'énergie et libèrent de la chaleur. Ces processus cataboliques génèrent l'adénosine triphoshate (ATP). Il est important de remarquer que la production d'ATP peut se dérouler en présence d'oxygène, on parle alors de métabolisme aérobie, ainsi qu'en absence d'oxygène, le métabolisme étant dans ce cas anaérobie. Une des différences entre ces deux voies de production réside en la différence du nombre de molécules d'ATP produites.

II.3.1. Production d'ATP

L'ATP est un nucléotide constitué d'une liaison à haute valeur énergétique entre une adénosine (base azotée + adénine + s-D-ribofurannose) et 3 groupements phosphates. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et en phosphate inorganique (Pi) est une réaction qui libère environ 30 kJ mol⁻¹. La réaction d'hydrolyse de l'ATP en AMP est d'avantage exergonique et libère 42 kJ mol⁻¹. L'ATP est produite à partir de glucides, de protéines ou de lipides, au

cours d'un processus dont la phase finale, la phosphorylation oxydative, requiert la présence d'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons.

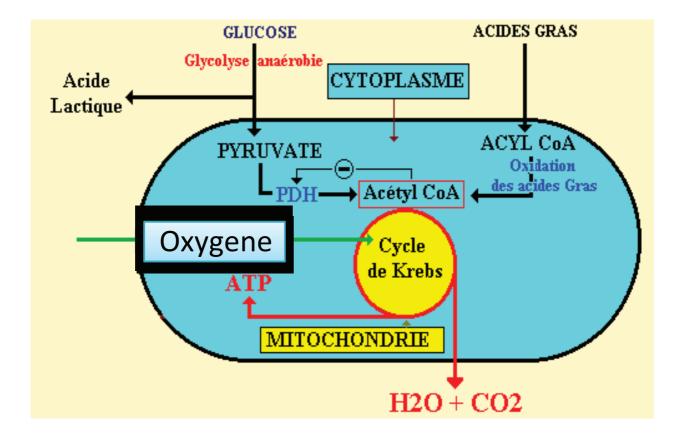


Figure II. 4. Représentation schématique de la voie du métabolisme aérobie et anaérobie pour la production d'ATP (source : http://jeanzin.fr/ecorevo/sciences/mitochon.htm)

Étant donné que les réserves en ATP sont faibles dans l'organisme, la production d'ATP à partir des substrats énergétiques est continue. Par contre, ceci nécessite de mettre en réserve les précurseurs de ces substrats énergétiques lorsque le milieu intérieur s'enrichit (i.e. après un repas) ; ils seront ensuite hydrolysés en cas de besoin. C'est par exemple le cas

du glucose qui est stocké sous forme de glycogène, principalement dans le foie. La première étape de production d'ATP par voie métabolique aérobie est la glycolyse (Figure II.4). La glycolyse est une suite de réactions d'oxydo-réduction dont le produit final est le pyruvate qui en se décarboxylant forme de l'acétylcoenzyme A. Cette molécule alimente le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) qui se déroule dans la matrice mitochondriale. Au cours des réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs, des coenzymes sont réduits au niveau de la membrane interne de la mitochondrie chez les eucaryotes. Ces réactions s'opèrent au travers de la chaîne respiratoire qui nécessite de l'oxygène. Au cours des réactions successives de la chaîne respiratoire, l'ADP est phosphaté en ATP. Au final, 38 moles d'ATP sont produites par mole de glucose grâce au métabolisme aérobie. L'oxygène est donc indispensable à cette voie métabolique afin de fournir en quantité suffisante l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Toutefois, lorsque la quantité d'oxygène disponible est limitée ou inexistante, la production d'ATP est alors assurée par la voie métabolique anaérobie, la fermentation lactique, qui ne nécessite pas d'oxygène. Cependant, la voie de production d'énergie anaérobie est 19 fois moins efficace que la voie aérobie (bien que plus rapide). Ainsi, seulement 2 moles d'ATP sont produites par mole de glucose. Par conséquent, lorsque l'oxygénation du milieu n'est pas adéquate pour approvisionner le métabolisme aérobie, la marge de manœuvre énergétique des organismes diminue rapidement. Ils ne sont plus alors capables d'assurer leurs fonctions physiologiques de manière aussi efficace qu'en présence d'oxygène, limitant ainsi leur survie à plus ou moins long terme.

II.3.2. Métabolisme énergétique et concept de Fry (1947, 1971)

En 1971, Fry développe un concept basé sur la bioénergétique et ses régulations enviro-dépendantes; concept qui sera revisité ensuite par plusieurs auteurs (e.g. Priede 1977, 1985; Evans 1990; Claireaux et Lefrançois 2007). Dans ce concept, le poisson est assimilé à un système ouvert au travers duquel l'énergie circule. Les processus métaboliques qui transforment l'énergie brute (nourriture/matière organique) en énergie chimique (l'ATP) sont considérés comme le « **moteur physiologique** » produisant l'énergie nécessaire à l'ensemble des activités de l'animal.

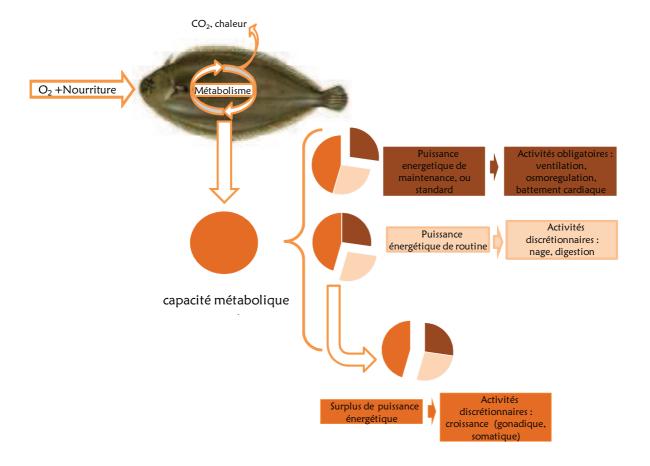


Figure II.5. Individu considéré comme un « système ouvert » : la matière brute ingérée (e.g. nourriture/ matière organique) est transformée à travers les processus métaboliques en énergie chimique nécessaire pour accomplir les différentes « activités ».

Il est à noter que le terme « **activité** » est employé au sens large et comprend (i) le travail de biosynthèse, comme la croissance ou le renouvellement cellulaire, (ii) le travail de transport, comme les échanges d'ions, et (iii) le travail mécanique, comme la nage ou la ventilation. Le terme d'activité s'applique donc à différents niveaux d'organisations biologiques; des régulations cellulaires aux performances de l'individu entier.

La puissance énergétique de ce « moteur physiologique » est mesurable à travers le taux métabolique de l'organisme. Fry (1971) a défini trois niveaux de taux métaboliques : les niveaux de maintenance, de routine et actif (Figure II.5).

Le <u>taux métabolique de maintenance ou standard</u> (ou SMR, Standard Metabolic Rate) correspond au niveau métabolique minimal nécessaire au maintien des fonctions vitales (e.g. ventilation, travail cardiaque, osmorégulation, production et sécrétion d'hormones, pompes ioniques...). Il est mesuré au repos, à jeun, en dehors de la période de reproduction et de source stress.

Le <u>taux métabolique actif</u> (ou AMR, Active Metabolic Rate) qui représente la dépense énergétique maximale qu'un poisson peut présenter. Ce taux est mesurable chez un individu qui fournit un effort intense, comme une activité de nage soutenue.

Le <u>taux métabolique de routine</u> (ou RMR, Routine Metabolic Rate) correspond au métabolisme mesuré chez un poisson libre de ses mouvements. Ce taux métabolique illustre l'énergie dépensée pour un niveau intermédiaire d'activités discrétionnaires (nage, digestion par exemple). Il oscille donc entre le SMR et l'AMR.

Fry (1971) a défini la différence entre le taux métabolique actif et le taux métabolique de maintenance comme étant la capacité métabolique aérobie ou registre aérobie (AMS ou Aerobic Metabolic Scope; Figure II.6) d'un organisme. L'AMS représente ainsi la quantité d'énergie globale pouvant être allouée vers les différentes activités non obligatoires de l'animal et est, de ce fait, souvent appelée « capacité pour l'activité » (ou « scope for activity »). Cette puissance énergétique est utilisée pour assurer les activités de routine qui sont qualifiées de non obligatoires. Une fraction est employée à assurer les activités comme la nage et la digestion. La fraction d'énergie restante correspond au surplus de puissance énergétique. Selon les phases de développement de l'animal, ce surplus de puissance est préférentiellement alloué, soit à la croissance somatique, soit à la croissance gonadique.

Il est important de noter que dans le concept de Fry (1971), le terme « métabolisme » désigne l'ensemble des processus biochimiques produisant de l'énergie, qui sont habituellement regroupés sous le terme de « catabolisme » faisant principalement référence à des mécanismes d'oxydo-réduction (§ II.3.1.). La capacité métabolique d'un organisme sera donc associée à son métabolisme aérobie et sa capacité à transporter de l'oxygène. Ainsi, son estimation se fait dans la plupart des cas à travers la consommation d'oxygène de l'organisme (e.g. Fry 1971; Duthie 1982; Wieser 1985; Priede 1985; Steffensen et al.

1994; Lefrançois et Claireaux 2003; McKenzie et al. 2007). C'est la définition et l'approche méthodologique qui ont été retenues dans ce manuscrit.

II.3.3. Classification des facteurs abiotiques selon Fry (1947, 1971)

Il y a deux manières fondamentales de classer le milieu; soit en décrivant les éléments abiotiques en se basant sur leurs propriétés physico-chimiques soit en décrivant comment ces éléments peuvent influencer un organisme. Cette seconde manière a été choisie par Fry (1947, 1971) qui a classé les facteurs environnementaux en 5 catégories selon leur influence sur le registre métabolique: *contrôlants, limitants, létaux, masquants et directifs*.

Les facteurs de contrôle (Figure II.6) gouvernent le taux métabolique de par leur influence sur l'état d'activation moléculaire des composants de la chaîne métabolique. La température est le plus remarquable facteur de contrôle. Elle agit sur la cinétique des réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme. Ces facteurs influencent ainsi directement le métabolisme de maintenance et le métabolisme actif.

Les facteurs limitants (Figure II.6) agissent en limitant l'approvisionnement des composants dans la chaîne métabolique. Leur absence, ou leur amenuisement, réduit le taux métabolique maximal fixé par les facteurs de contrôle. C'est le cas de la disponibilité en oxygène. Certaines toxines ou polluants sont également considérées comme facteurs limitants, lorsque leur présence interfère avec le transport de l'oxygène (e.g. nitrites).

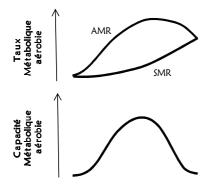
Les *facteurs létaux* sont définis comme entraînant la mort de l'organisme par l'arrêt des processus métaboliques. C'est le cas de valeurs extrêmes de température, de polluants, de la concentration en oxygène ou en dioxyde de carbone.

Les facteurs masquants (Figure II.6) augmentent le coût métabolique de maintenance provoquant une diminution de la capacité métabolique aérobie. Des conditions suboptimales de salinité vont par exemple engendrer un coût énergétique supplémentaire lié à l'osmorégulation.

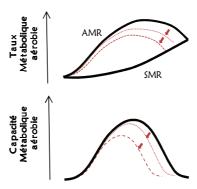
Les *facteurs directifs*, comme la température, l'oxygène ou la photopériode, déclenchent des réponses comportementales et physiologiques. Ces facteurs orientent

l'animal vers des habitats ou des états physiologiques auxquels il est mieux adapté, entraînant ainsi une variation des coûts métaboliques.

(A) Facteur de contrôle (e.g. temperature)



(B) Facteur limitant (e.g. oxygène)



(C) Facteur masquant (e.g. salinité, polluants)

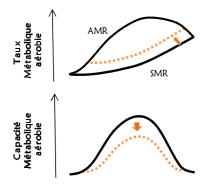


Figure II.6. Représentation schématique des effets des facteurs environnementaux sur la capacité métabolique aérobie d'un poisson.

- (A) Facteurs de contrôle (e.g. température) ; ils agissent sur la cinétique des réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme et induisent l'augmentation du métabolisme actif (AMR) et de maintenance (SMR).
- (B) <u>Facteurs limitants</u> (e.g. oxygène); l'hypoxie provoque une diminution du AMR et par conséquence de la capacité métabolique aérobie qui s'amplifie lorsque la raréfaction en oxygène s'aggrave ;
- (C) <u>Facteurs masquants</u> (e.g. salinité, polluants) ; ils induisent l'augmentation du SMR.

II.3.4. Effets de l'hypoxie et des PCB sur les performances métaboliques de l'individu

En se basant sur la classification de Fry (1971), l'hypoxie est considérée comme une situation environnementale limitante. Quant aux polluants, ils peuvent avoir des effets multiples sur le métabolisme en ayant à la fois une action en tant que facteur limitant et facteur masquant : d'une part, ils sont susceptibles d'interférer avec le transport en oxygène (Nikinmaa 1992) et donc d'agir sur le taux métabolique maximal ; d'autre part, ils peuvent induire un coût énergétique supplémentaire par leur présence et les processus de détoxication associés, provoquant ainsi une augmentation du métabolisme de maintenance (Lannig et al. 2006).

II.3.4.1. L'hypoxie

Selon Fry (1971), la concentration en oxygène dans l'eau est l'un des facteurs qui influencent le plus la physiologie et les performances des poissons, puisqu'elle réduit le registre métabolique, et donc l'énergie à disposition des individus pour accomplir leurs activités. La plupart des individus sont capables de maintenir constant leur taux métabolique de routine sur une large gamme de concentration d'oxygène dans l'eau; ils sont alors qualifiés d'oxy-régulateurs. Lorsque les conditions hypoxiques s'aggravent, les mécanismes physiologiques compensatoires (e.g. augmentation de la fréquence et/ou de l'amplitude de ventilation, l'augmentation de la perfusion des branchies, le recrutement de lamelles branchiales) ne sont plus suffisants et l'apport en oxygène est compromis. Le taux métabolique de routine diminue alors avec la concentration d'oxygène dans l'eau; l'individu passe à un état d'oxy-conformeur. En règle générale, la teneur en oxygène à laquelle s'opère la transition entre l'état d'oxy-régulateur et d'oxy-conformeur est définie comme la concentration en oxygène limitante (ou LOC, Limiting Oxygen Concentration; Claireaux et Lagardère 1999; Lefrançois et Claireaux 2003; Figure II.7). La LOC varie avec le niveau du taux métabolique aérobie : plus il augmente, plus les besoins en oxygène de l'animal sont importants et plus la LOC est élevée. Au niveau métabolique particulier de maintenance, la LOC est définie comme étant la concentration critique en oxygène (O_{2 crit}; Fry 1947; Neill et Bryan 1991; Claireaux et Lagardère 1999).

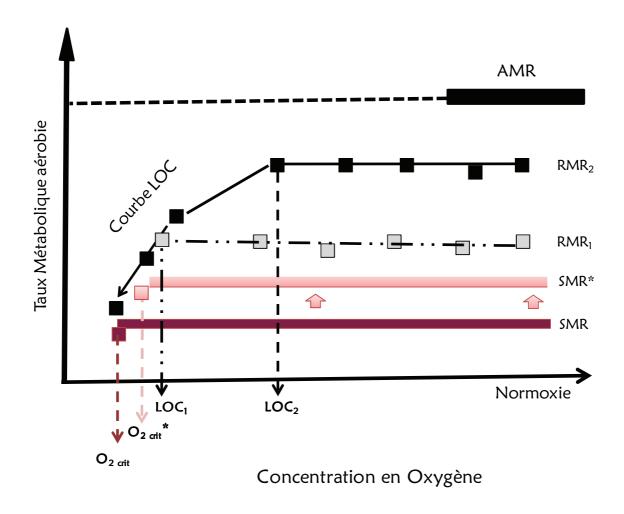


Figure II.7. Représentation schématique de la variation du taux métabolique maximal en fonction de la concentration d'oxygène dans l'eau (—). A chaque taux métabolique de routine (RMR) correspond une concentration en oxygène limitante (LOC) en deçà de laquelle il ne peut être maintenu. L'animal bascule alors d'un état oxy-régulateur à un état oxy-conformeur. La LOC augmente avec le RMR; lorsque RMR $_2$ \blacksquare >RMR $_1$ \square , alors LOC $_2$ >LOC $_1$. Au niveau métabolique de maintenance, la LOC correspond à la teneur en oxygène critique (O_2 $_{crit}$; Claireaux et Lagardère 1999). Les «facteurs masquant» vont induire l'augmentation du métabolisme de maintenance (SMR* dans la figure), en induisant une augmentation de la concentration critique en oxygène (O_2 $_{crit}$ dans la figure)

La tolérance à l'hypoxie peut être évaluée à travers la $O_{2 \text{ crit}}$, valeur d'oxygène pour laquelle les fonctions physiologiques sont compromises et pour laquelle le taux métabolique de routine (évalué chez le poisson engagé dans une activité de nage volontaire) ou le taux métabolique de maintenance (évalué chez le poisson inactif) ne peut plus être assuré (Fry 1947; Neill and Bryan 1991; Steffensen et al. 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann et Steffensen 1997; Lefrançois et Claireaux 2003; Davoodi et Claireaux 2007;

Iversen et al. 2010 ; Richards 2011). Bien que les deux définitions du $O_{2 \text{ crit}}$ existent dans la littérature, j'ai retenu dans ma thèse (Chapitre III), la définition se référant au taux métabolique de maintenance.

En général, on peut dire que la O_{2 crit} est espèce-spécifique (Chapman et al. 2002); les espèces les plus actives tendant à présenter une valeur de concentration critique en oxygène plus élevée (Chapman et McKenzie 2009). Lorsque la teneur en oxygène est proche, ou audessous de la O_{2 crit}, le challenge fondamental pour survivre est le maintien du bilan énergétique cellulaire. L'apport en énergie est alors associé à une activation du métabolisme anaérobie comme indiqué par l'augmentation de la concentration en lactate dans l'animal entier (Pörtner et Grieshaber 1993, Pörtner 2010). Cependant, le métabolisme anaérobie ayant un faible rendement énergétique en ATP, les activités de l'animal devront être réduites à plus ou moins court terme mettant ainsi en jeu sa survie. La capacité d'un organisme à réduire son taux métabolique en réponse à la production limitée d'ATP semble ainsi être la théorie adaptative commune expliquant la survie des animaux aux niveaux d'oxygène environnementaux inférieurs à leur O_{2 crit} (Hochachka et al. 1996).

La diminution oxygène-dépendante du registre métabolique du poisson implique des modifications en termes d'allocation énergétique. Parmi les effets sub-létaux les plus connus, on retrouve la baisse de croissance (Brett et Groves 1979; Pichavant 2000; Taylor et Miller 2001; McNatt et Rice 2004). Par exemple, chez deux espèces de poissons plats, le cardeau d'été Paralychthys dentatus et la plie rouge Pleuronectes americanus, une concentration en oxygène entre 2,0 and 3,5 mg O₂ l⁻¹ réduit respectivement le taux de croissance d'environ 50-60% et 25% par rapport à des conditions normoxiques (Stierhoff et al. 2006). Une des raisons serait la réduction de la fréquence de nourrissage que la réduction du taux d'oxydation de la nourriture, ont pu être observées chez de nombreuses espèces de téléostéens (Fry 1971; Neill et Bryan 1991). Chabot et Dutil (1999) ont montré chez la morue Atlantique Gadus morhua que la croissance était directement proportionnelle au niveau d'oxygène. Le même auteur (Chabot et al. 2001) a également observé chez la même espèce, que l'ingestion du nourriture, etait réduite au cours d'une hypoxie, expliquant ainsi la réduction de la croissance. Il a également été mis en évidence que l'hypoxie causait par exemple une diminution de la reproduction (Wu et al. 2003), en affectant un certain nombre de processus clés, comme la gamétogenèse, la quantité et la qualité du sperme et des œufs ou le comportement reproducteur. L'auteur suggère que la cause principale serait la réduction de la prise alimentaire (Wu et al. 2003). Welker et al. (2007) a quant à lui montré

que l'exposition à un niveau sub-létal d'hypoxie induisait une diminution de la réponse immunitaire chez la barbue de rivière *Ictalurus punctatus*, causée par une réduction des activités bactéricides et de la production d'anticorps, ayant comme conséquence une augmentation de la mortalité.

II.3.4.2. Les PCB

Chez les poissons, plusieurs effets ont été mis en évidence suite à une exposition aux PCB. Le Roy et al. (2006) ont montré chez le tambour brésilien Micropogonias undulatas que l'exposition à l'Aroclor 1254 causait une diminution de la production des hormones thyroïdiennes (T3 et T4) qui jouent un rôle déterminant dans le développement et la métamorphose chez les vertébrés (Power et al. 2001). Plusieurs études ont également démontré que l'exposition aux PCB induisait l'activité des enzymes du système cytochrome P450, en particulier de la sous famille CYP1A (Goksøyr et Förlin 1992; Hahn et Stegeman 1994; Bucheli et Fent 1995; Goksøyr 1995). Une des conséquences est la formation de ROS (« Reactive Oxygen Species »), qui sont des éléments à très forte réactivité capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les lipides des membranes cellulaires. Chez le choquemort Fundulus grandis (Fingerman et Russell 1980) et le poisson-chat Ictalurus melas (Fingerman et Short 1983), l'exposition à l'Aroclor 1254 induit une diminution des niveaux de norépinephrine, hormone produite par les cellules chromafines de la glande surrénale en cas de stress ou d'effort intense. Cette hormone fait partie des catécholamines et est mise en circulation dans l'organisme lorsque celui-ci est soumis à des conditions requérant une augmentation de l'oxygénation du sang et de la mobilisation de substrats énergétiques. En conséquence, la diminution de cette hormone limite le déclenchement des mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse au stress, et par conséquent la capacité de l'organisme à surmonter le stress, mettant en danger la survie de l'organisme exposé.

Toutefois, à l'heure actuelle aucune étude ne s'est intéressée aux effets des PCB sur le métabolisme aérobie des poissons. Pourtant, à travers les mécanismes de détoxication déclenchés au cours de la contamination, on pourrait s'attendre à une augmentation du métabolisme de maintenance (Figure II.6). Il a par exemple été démontré que l'exposition à l'ammoniaque chez la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss* (Shingles et al. 2001), aux pesticides organochlorés chez le saumon sockeye *Oncorhynchus nerka* (Farrell et al. 1998) ou à certains herbicides chez le saumon coho *Oncorhynchus kisutch* (Johansen et Geen

1990 ; Janz et al. 1991) engendrent une augmentation du métabolisme aérobie. Une augmentation du métabolisme de maintenance chez des individus contaminés aux PCB induirait une réduction de leur capacité métabolique, et par effet « cascade » de leurs activités. Par ailleurs, on pourrait s'attendre à une diminution de la tolérance à l'hypoxie puisqu'une augmentation du métabolisme de maintenance est associée par voie de conséquence à une élévation de l'O_{2 crit} (Figure II.6).

Cette problématique sera abordée chez la sole commune *Solea solea* au cours du Chapitre III de cette thèse où seront examinés.

II.4. Le système cardiovasculaire

Plusieurs études ont montré comment la capacité métabolique dépendait de la capacité du système cardio-vasculaire à transporter l'oxygène dans l'organisme (e.g. Priede 1977; Bennett 1980; Claireaux et al. 2005; Farrell 2007). L'oxygène est capté par diffusion au niveau des branchies puis transporté à travers l'organisme par convection. Le système cardio-vasculaire assure ces mouvements de convection, nécessaires à la fois à l'approvisionnement en oxygène des tissus et au transport de substances comme le CO₂, les nutriments dérivés de l'hydrolyse des aliments, les déchets ou les hormones.

Le système circulatoire chez les vertébrés consiste en quatre éléments essentiels : une pompe (cœur), un conteneur (vaisseaux sanguins), un milieu convectif (sang) et un système de commande (incluant des facteurs neuronaux, endocrines et paracrines). À la différence d'autres vertébrés, les systèmes respiratoire et circulatoire des poissons sont en « série » et seul du sang veineux traverse le cœur. La circulation principale (primaire) y est relativement simple : le sang quitte le cœur pour s'oxygéner au niveau des branchies; de là, le sang oxygéné est distribué aux différents organes *via* les vaisseaux systémiques pour finalement retourner au cœur.

II.4.1 Anatomie du cœur

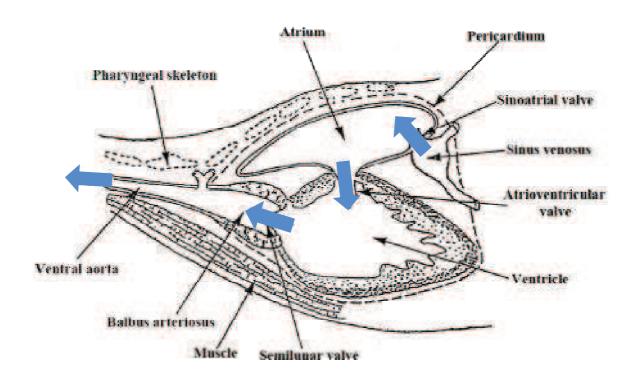


Figure II.8. Représentation du cœur d'un poisson. Les flèches bleues vont indiquer le sens de la circulation du sang. Le sinus veineux reçoit le sang appauvri en O₂ provenant de la circulation systémique. Le sang passe successivement dans l'atrium puis dans le ventricule et est ensuite éjecté par l'aorte ventrale, en passant par le bulbe artériel, vers les branchies pour être oxygéné (Satchell 1991)

Le cœur de poisson téléostéen est constitué de 2 chambres alignées : un *atrium* (ou *oreillette*) et un *ventricule* (Figure II.8). En amont de l'atrium, la veine est dilatée en un sinus, le *sinus veineux*, qui contribue à un apport continu de sang au cœur. En aval du ventricule, on trouve le *bulbe artériel* caractérisé par un épaississement de la paroi de l'aorte ventrale. Le *sinus veineux* et l'*atrium* ne sont pas particulièrement musclés et leur contraction produit seulement une petite pression d'impulsion. Au contraire, le *ventricule* est particulièrement musculeux, ce qui permet l'expulsion efficace du sang vers les branchies.

Sinus veineux

Le sinus veineux présente des parois très fines (Santer, 1985). Il reçoit le sang veineux à partir des canaux de Cuvier, des veines hépatiques et des veines jugulaires antérieures. Le rôle fonctionnel majeur du sinus veineux est lié à l'initiation et au contrôle du

rythme cardiaque. Il constitue le site de tissus spécialisés dans la stimulation cardiaque (cellules pacemaker) qui vont permettre d'initier les battements cardiaques (Laurent 1962; Santer 1985; Satchell 1991).

Atrium ou oreillette

Chez les téléostéens, au contraire des mammifères, le volume de l'atrium est presque identique à celui du ventricule. Il présente une paroi mince, peu extensible et avec de fines trabécules musculaires, qui produisent la pression juste suffisante pour remplir le ventricule.

Ventricule

Le ventricule montre une variabilité espèce-spécifique en ce qui concerne sa morphologie, son histologie et sa vascularisation (Santer 1985). La masse ventriculaire représente de 0,03 à 0,4% de la masse corporelle (Poupa et al. 1981) et tend à augmenter chez les espèces les plus actives. Par exemple, une espèce benthique comme le flet d'Europe *Platichtys flesus* présente une masse ventriculaire d'environ 0,035 % de la masse de l'organisme, alors que chez le thon listao *Katsuwonus pelamis* cette proportion atteint 0,38 %. Cette variabilité est associée à des différences interspécifiques du volume d'éjection systolique (volume de sang éjecté à chaque contraction) et de la pression sanguine générée.

Bulbe artériel

Le bulbe artériel est une à paroi élastique non contractile qui s'étend à chaque battement cardiaque afin d'absorber le flux pulsatile de sang éjecté du ventricule, créant ainsi un flux de sang plus continu dans la circulation systémique. Le sang provenant du ventricule va ainsi entrer dans la circulation branchiale via 4 à 7 artères branchiales afférentes à partir de l'aorte ventrale.

II.4.2. Muscle cardiaque

Le muscle cardiaque des poissons, comme des autres vertébrés, est constitué de fibres qui s'organisent en réseau. Chaque fibre se compose de nombreuses cellules contractiles distinctes, les **cardiomyocytes**, connectées à leurs extrémités. Les

cardiomyocytes sont longues et minces, et la plupart ont seulement un noyau. Cette forme allongée, particulièrement mince par rapport aux cardiomyocytes des mammifères, leur confère :

- (i) un important ratio surface-volume;
- (ii) une distance plus courte pour la diffusion du Ca²⁺ de l'extérieur vers le centre de la cellule ;
- (iii) une résistance électrique élevée et une faible vitesse de conduction du potentiel d'action.

La membrane plasmique des fibres musculaires est appelée **sarcolemme** (Figure II. 9). Contrairement aux muscles squelettiques et cardiaques des mammifères, chez les téléostéens le sarcolemme ne possède pas de système tubulaire typique. Ce système joue habituellement un rôle fondamental dans la propagation du potentiel d'action à l'intérieur des cardiomyocytes, au plus près des myofibrilles (protéines contractiles ou myofilaments, Figure II.9) et des stocks calciques internes aussi appelé **réticulum sarcoplasmique** (SR; Figure II.9). Les cardiomyocytes présentent un nombre élevé de mitochondries, ayant une position centrale dans la cellule cardiaque; les myofibrilles étant plutôt situées dans la partie périphérique (Figure II.9). Cette position présente l'avantage, en l'absence de système tubulaire, de réduire la distance de diffusion du Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule.

Le réticulum sarcoplasmique (SR) est présent partout dans les myofibrilles et surtout sous le sarcolemme (Santer 1974 ; Vornanen 1997). Il constitue une réserve interne d'ions Ca^{2+} qui jouent un rôle fondamental dans la contraction cardiaque (§ II.4.3). Chez la plupart des téléostéens, les cardiomyocytes sont riches en myoglobine, nécessaire pour faciliter le transport d'oxygène vers les mitochondries ; une forte concentration de myoglobine dans le muscle cardiaque est une caractéristique des espèces ayant une activité de nage plus élevée (Driedzic 1983 ; Giovane et al. 1980) et chez les espèces tolérantes à l'hypoxie (Bailey et Driedzic 1990).

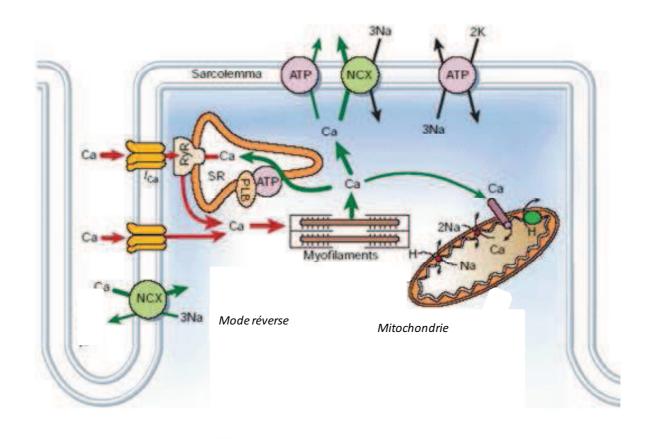


Figure II.9. Représentation schématique d'un cardiomyocyte ; SR pour réticulum sarcoplasmique, I_{Ca} : canal calcique de type L (low) voltage-dépendant, NCX : échangeur Na/Ca (en mode inverse ou réverse) ; RyR : canal calcique ligan-dépendant, sensible à la ryanodine ; ATP : pompes calciques chargées d'expulser le calcium à l'extérieur ou de repomper le calcium dans le réticulum sarcoplasmique SR

Myofilaments

Les cardiomyocytes se contractent grâce aux myofibrilles dont les propriétés déterminent la force et la cinétique de la contraction cardiaque. Les quantités de myofibrilles varient selon les espèces. Les protéines des myofibrilles comprennent des myofilaments épais (principalement la myosine) et fins (principalement l'actine, la troponine et la tropomyosine). Le glissement des filaments fins le long des filaments épais est à l'origine du raccourcissement (contraction) de la cellule et donc du muscle.

L'actine est présente sous forme de longs filaments polymères (dit actine F) composés de 2 monomères globulaires (dit actine G) qui s'enroulent en une double hélice. Chaque monomère d'actine-G contient un site de liaison pour la myosine.

La tropomyosine est une molécule polaire longue et fine contenant 2 chaînes de polypeptides sous la forme d'une hélice alpha.

La troponine (Tn) est composée de trois protéines : (i) la TnC qui lie le Ca²⁺ déclenchant la mise en route de l'activité cyclique des ponts d'union entre les différentes fibres et de la contraction, (ii) la TnI qui empêche en absence de calcium la liaison entre l'actine et la tête de la myosine et (iii) la TnT qui s'attache fortement à Tropomyosine.

La myosine est une molécule en forme de bâtonnet. Elle est composée de 2 chaînes de peptides enroulées ensemble et surenroulées sur elles-mêmes à leurs extrémités. A une des extrémités, une petite tête globulaire possède un site spécifique de liaison de l'ATP. La vitesse de contraction et l'activité de la myosine-ATPase sont plus élevées dans l'atrium que dans le ventricule (Aho et Vornanen 1999).

II.4.3 Couplage Excitation-Contraction

Parmi les ions qui sont impliqués dans le travail du cœur, le Ca²⁺ est considéré comme le plus important (Vornanen et al. 2002). Il est en effet indispensable dans les processus de contraction et de relaxation du cœur. L'augmentation de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire est l'élément critique qui permet le couplage entre l'excitation cardiaque et la contraction des cardiomyocytes. Ce processus est appelé le "Couplage Excitation-Contraction" ou Couplage E-C (CEC), et est généré à partir des cellules pacemaker situées au niveau du sinus veineux (Saito 1969). Ces cellules génèrent un potentiel d'action spontanée (PAs) qui se propage de cellule en cellule, induisant la dépolarisation de la membrane du sarcolemme et l'augmentation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire du CEC. La fréquence de décharge des PAs est fortement modulée par la température, le système nerveux autonome et purinergique (Harper et al 1995; Giles et Shibita 1981; Zaza et al. 1996). La dépolarisation de la membrane du sarcolemme induit l'entrée du Ca²⁺ dans les myocytes par les canaux calciques de type L voltage-dépendants et probablement *via* l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ (mode *réverse*, Figure II.9) (Vornanen 1999).

Par ailleurs, l'entrée de Ca²⁺ au niveau du sarcolemme induit la libération supplémentaire de cet élément par le SR (e.g. Fabiato 1983). L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire induit en effet la sortie de Ca²⁺ du SR via les récepteurs à la ryanodine (Rya) distribués à sa surface. En d'autres mots, c'est l'entrée d'une petite quantité de Ca²⁺ dans la cellule qui cause la libération d'une plus grande quantité de Ca²⁺ à partir des stocks intracellulaires ; le mécanisme est ainsi connu sous le nom de Ca²⁺- Induce- Ca²⁺ release ou CICR.

Chez le poisson, le degré de participation du SR à la libération de Ca²⁺, et donc à la contraction du muscle cardiaque, dépend de la température, du tissu cardiaque pris en considération (plus important dans le tissu atrial que dans le tissu ventriculaire) et de l'espèce. Les espèces plus actives ont tendance à présenter un cœur plus puissant, le Ca²⁺ provenant du SR serait plus sollicité (e.g. thon jaune *Thunnus albacares*; Shiels et al. 1999). L'évaluation de la participation du SR se fait grâce à des approches pharmacologiques à travers l'administration de Ryanodine (Rya). Ce ligand spécifique, alcaloïde d'origine naturelle, est capable de modifier de façon irréversible le fonctionnement des récepteurs à la Rya présents sur le SR empêchant ainsi la sortie du Ca²⁺ contenu dans le SR. C'est la méthode qui a été employée dans ce travail de thèse (§ Chapitre IV).

Quant à la relaxation des cardiomyocytes, elle n'est possible que lorsque la concentration de Ca²⁺ intracellulaire décline, permettant ainsi au Ca²⁺ lié à la troponine de se dissocier. Pour que cela se vérifie, il est nécessaire que le Ca²⁺ soit transporté au dehors du cytosol, ce qui s'effectue par le biais de 3 voies : 1) la pompe Ca²⁺-ATPase du SR (SERCA) ; 2) l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ du sarcolemme (mode *inverse*, Figure II.9) et 3) la pompe Ca²⁺-ATPase du sarcolemme (PMCA) (Bridge et al. 1988; Bers et al 1989).

A noter qu'un autre élément nécessaire à la contraction est l'apport continu en ATP. L'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au changement de conformation de la tête de myosine lorsque celle-ci se détache de l'actine. Il est généralement admis, que l'ATP en condition de normoxie, ne constitue pas un élément déterminant au regard du calcium.

II.4.4 Battement cardiaque

Le cœur n'a pas besoin d'une stimulation nerveuse externe pour se contracter. *In vivo*, il a un rythme intrinsèque dû aux *cellules pacemaker*; il est cependant sous l'influence principale du système nerveux autonome et d'une régulation hormonale (Lannig et al. 2004; Figure II.10).

En ce qui concerne le **système nerveux autonome**, le système nerveux sympathique augmente la fréquence et la force de contraction, alors que le système nerveux parasympathique ralentit la fréquence cardiaque. D'un point de vue **neuro-hormonal**, c'est la stimulation adrénergique (neuronale et humorale) qui augmente la fréquence, tandis que la stimulation cholinergique (vagale) la diminue (Farrell et Jones 1992).

Au repos, l'activité cardiaque est la résultante d'un équilibre entre ces différentes voies de régulation. Au cours d'une activité soutenue et/ou en conditions de stress, le battement cardiaque est augmenté suite à une élévation du tonus adrénergique, alors que le tonus vagal est inhibé. Le nombre maximum de battements cardiaques chez les téléostéens dépasse rarement les 120 battements.min⁻¹, indépendamment de la température et de la masse corporelle (Lillywhite et al. 1999). La seule exception est trouvée chez le thon pour lequel la fréquence cardiaque peut dépasser les 200 battements.min⁻¹ (Farrell 1996; Rantin et al. 1998). Au cours d'une exposition à l'hypoxie, une bradycardie est observée chez la plupart des espèces de téléostéens (e.g. esturgeon sibérien *Arcipenser baeri*, Maxime et al. 1998; thon jaune *Thunnus albacores*, Blank et al. 2002; thon bleu du Pacifique *Thunnus orientalis*, Blank et al. 2004; morue Atlantique *Gadus morhua*, Gollock et al. 2006). Cette bradycardie induite par l'hypoxie, ainsi que la bradycardie hypertensive, reflète une augmentation du tonus vagal cholinergique (Axelsson et al. 1988; Farrell 1982; Vornanen 1999).

II.4.4.1 La voie adrénergique

C'est une voie de régulation très importante chez les poissons. Elle met en jeu deux médiateurs chimiques appartenant aux catécholamines : la noradrénaline et l'adrénaline (Reid et al. 1998 ; Taylor et Miller 2001). La noradrénaline est libérée à partir de fibres nerveuses innervant le cœur. L'adrénaline est synthétisée par des cellules regroupées en

amas nommés tissus chromafines et localisés au sein des veines cardinales supérieures ou dans la partie antérieure du rein (Reid et al. 1998).

Les catécholamines circulant dans le plasma présentent généralement une concentration entre 1 et 10 nM correspondant à un niveau basal. Lors d'un stress, comme au cours d'une activité de nage soutenue, la concentration d'adrénaline dans le sang peut augmenter de 10 à 100 fois (Randall et Perry 1992 dans Reid et al. 1998 ; Olson et Farrell 2006). L'amplitude d'augmentation des catécholamines circulant dépend du type de stress, de sa sévérité et de l'espèce (Reid et al. 1998). Ces molécules vont agir sur le tissu cardiaque via la voie humorale (Farrell 1984). En effet, le tissu musculaire cardiaque constitue l'un des principaux effecteurs des catécholamines. Dans le cœur, les récepteurs des catécholamines sont de deux types: α- et β- adrénorécepteurs. La présence et la densité de ces récepteurs varient selon les tissus et les espèces concernés. Généralement, les catécholamines, en se liant aux β-adrénorécepteurs, génèrent un effet inotrope positif, c'est-à-dire une augmentation de la contraction ventriculaire (Farrell 1984), ainsi qu'un effet chronotrope positif par entrainement des cellules pacemaker du sinus veineux, c'est-àdire une augmentation du rythme cardiaque (Nilsson et Siesjö 1983; Farrell 1984). Les catécholamines peuvent également se lier aux α-adrénorécepteurs, mais les effets sont mineurs comparés à ceux des β-adrénorécepteurs. Dans ce dernier cas, on parle de tonus accélérateur adrénergique. La seule exception à cette tendance concerne les poissons plats qui semblent avoir une capacité adrénergique limitée en répondre au stress (Milligan 1987; Mendonça et Gamperl 2009 ; Sandblom et al. 2010), caractéristique probablement liée à leur vie benthique et style de vie inactif (Pereira et al. 1999). Il est à noter cependant que le contrôle neuro-hormonal de la fonction cardiaque chez le poisson plat n'a jamais été directement étudié; la régulation de la fonction cardiaque reste donc mal comprise chez ce taxon.

II.4.4.2 La voie cholinergique

Elle passe par l'action de l'**acétylcholine**, qui est libérée par le nerf vague localisé dans le tissu pacemaker et dans la région sino-atriale. Ce neurotransmetteur va induire des effets **chronotropes négatifs** *via* la stimulation des récepteurs muscariniques (Figure II.10; Saito 1969). C'est-à-dire que la voie cholinergique agit comme un frein en ralentissant la fréquence cardiaque. Par exemple, chez certains poissons la bradycardie observée en milieu

hypoxique est due à la voie cholinergique (Farrell et Jones 1992). Dans ce cas, on parle de tonus inhibiteur cholinergique. En effet, les systèmes nerveux sympathique et parasympathique envoient constamment des influx au cœur. Les voies adrénergique et cholinergique sont donc antagonistes. Chez les téléostéens au repos, l'importance relative des différentes voies de contrôle de l'activité cardiaque a fait l'objet de nombreuses études (Keen et al. 1995 ; Stecyk et Farrell 2006 ; McKenzie et al. 2007b).

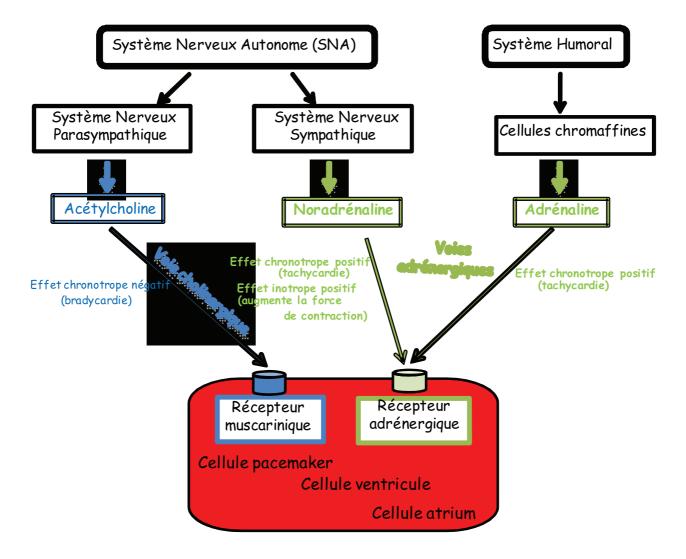


Figure II.10. Représentation schématique de la modulation de la fréquence et de la force de contraction cardiaque chez un téléostéen. Les cellules pacemaker imposent le rythme cardiaque (voie intrinsèque), modulé par le tonus accélérateur adrénergique (voie nerveuse et humorale) ou inhibiteur cholinergique (voie nerveuse).

II.5 Effets des PCB sur les performances cardiaques

Quand un poisson est exposé à des xénobiotiques, ces molécules toxiques s'accumulent progressivement dans ses tissus. Le degré auquel le poisson et ses organes sont

affectés dépend de la nature de la substance, de sa concentration, de l'espèce et de l'organe impliqué (Hoffman 2003). Le cœur est parmi les organes les plus affectés avec les reins, le foie, la peau, les branchies, et les gonades (Hoffman 2003).

Des études faites sur les mammifères ont démontré que l'exposition aux PCB pouvait causer des désordres cardiovasculaires tels que l'augmentation de la taille du cœur (hypertrophie cardiaque) associée à une élévation de la pression sanguine et au déclenchement d'un stress oxydatif (Lyng et Seegal 2008). Helyar et al. (2009) ont montré que la contamination aux PCB causait une diminution de la force de contraction des myocytes du ventricule. Ces auteurs suggèrent que l'effet inotrope négatif serait causé par une inhibition du canal calcique de type L, et donc une diminution de l'entrée du Ca²⁺ nécessaire à la contraction (Figure II.9).

Toujours chez le rat *Rattus rattus*, Pessah et al. (2010) ont étudié les effets des PCB sur la musculature du ventricule et ont mis en évidence que les PCB pouvaient provoquer des mutations au niveau des sous-unités protéiques constituant les récepteurs à la ryanodine du SR. L'effet majeur est alors une amplification des échanges de Ca²⁺ entre le SR et le cytosol des cardiomyocytes (Cherednichenko et Pessah, en préparation, dans Pessah et al. 2010). Le retour à une concentration basale en Ca²⁺ normalement observée est ainsi perturbé, limitant de ce fait la relaxation cardiaque. Les auteurs soulignent que ces altérations peuvent rester inexprimées, jusqu'à ce qu'un ou plusieurs stresseurs comme des variations environnementales déclenchent la mutation du récepteur.

Chez les téléostéens, les études concernant les effets des PCB sur le cœur ont été focalisées sur le développement. Par exemple, Grimes et al. (2008) ont montré que l'exposition au CB 126 causait une malformation cardiaque chez les embryons du poisson zèbre *Danio rerio*. Un développement anormal du cœur a été mis en évidence chez la carpe commune *Cyprinus carpio* exposée au CB 126 (Stouthart et al. 1998).

Si les études concernant les effets des PCB sont limitées, les performances cardiaques ont été étudiées en présence d'autres contaminants comme par exemple les HAP. L'exposition à ces substances provoque des malformations cardiaques associées à un œdème péricardique chez les embryons du hareng du Pacifique *Clupea pallasi* (Middaugh et al. 1998; Marty et al. 1997), de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Walker et Peterson

1991) et du poisson zèbre (Henry et al. 1997). Chez le hareng du Pacifique *Clupea pallasi*, une réduction du rythme cardiaque de routine a été observée (Middaugh et al. 1998; Vines et al. 2000). Incardona et al. (2009) ont démontré chez les embryons de hareng que l'exposition aux HAP causait un œdème, ainsi qu'une arythmie cardiaque. En exposant des soles communes à une contamination aigue aux HAP, Claireaux et Davoodi (2010) ont mis en évidence une altération des performances cardiaques, provoquant une diminution associée de la capacité d'oxygénation du sang. Ces auteurs ont proposé plusieurs hypothèses pour expliquer cette diminution des performances cardiaques, comme un changement de l'activité des cellules pacemaker et/ou du potentiel d'action, une réduction de la sensibilité adrénergique ainsi que de la capacité des cardiomyocytes à mobiliser le Ca²⁺ au cours du processus de couplage « contraction-excitation-contraction » (Hartzell 1988).

L'altération des performances cardiaques a été évaluée chez les juvéniles de sole commune exposés à un stress induit par une contamination chronique aux PCB ; les résultats de cette étude sont exposés au Chapitre IV.

II.6. Le comportement anti-prédateur

II.6.1.Definitions

La nage est utilisée par les téléostéens pour accomplir un grand nombre de leurs activités comme la recherche de nourriture, la chasse, l'accouplement ou encore la fuite en présence d'un prédateur. Dans ce travail de thèse, le comportement anti-prédateur nous a intéressés, de par son rôle fondamental dans la probabilité de survie d'un individu, et donc de sa fitness (Lind et Cresswell 2005 ; Domenici et al. 2007).

Le comportement et les performances des poissons au cours de la réponse de fuite ont éveillé l'attention de différents spécialistes qu'ils soient écologues, comportementalistes ou physiologistes, de par leurs rôles dans les relations proie-prédateur (Godin et Valdron Clark 1997). En effet, si la proie présente des performances ainsi qu'un comportement favorisant sa fuite face à un prédateur, ses chances de survie augmentent en conséquence. Ainsi, l'issu des interactions proie-prédateur est déterminée par de nombreux facteurs relatifs aux performances locomotrices ou sensorielles, comme la vitesse, l'accélération, la

distance de réaction (i.e. la distance entre le prédateur et la proie au moment de la réponse de fuite) ou la latence (i.e. l'intervalle de temps entre le stimulus de danger et l'initiation de la réponse de fuite; Webb 1986; Domenici et Blake 1997, Domenici 2002; Blake 2004; Walker et al. 2005).

De façon générale, la réponse de fuite est la réponse la plus commune face à un prédateur. Cette réponse est caractérisée par une rapide accélération du poisson provoquant un déplacement défini comme un **départ rapide** ou «fast start» (Bullock 1984; Domenici et Blake 1997). Le déclenchement de la réponse de fuite commence avec une contraction unilatérale de la musculature axiale, qui est initiée par une paire de neurones géants positionnés dans le cerveau nommés cellules de Mauthner (Eaton et Hackett 1984). Le départ rapide peut être divisé en deux étapes. La première étape est généralement caractérisée par une première contraction de la musculature controlatérale au stimulus de danger, provoquant un mouvement en direction opposée au stimulus, suivie par une seconde étape au cours de laquelle un mouvement en sens opposé est observé en conséquence d'une contraction de la musculature ipsilatérale (Domenici et Blake 1997).

Jusqu'à présent, les études se sont principalement concentrées sur la réponse antiprédateur des « poissons ronds » alors que l'on ne dispose que de peu de connaissances chez les « poissons plats » (e.g. limande tachetée *Citharichthys stigmaeus*, Webb 1981; plie rouge *Pseudopleuronectes americanus* et sole bavoche *Trinectes maculatus*, Brainerd et al. 1997). La réponse de fuite chez les « poissons plats » peut être divisée en deux étapes de la même façon que pour les « poissons ronds » ; la particularité de cette réponse est lié à leur morphologique et leur vie benthique. Le départ rapide commence ainsi avec un soulèvement rapide éloignant le corps du substrat. Ce mouvement est accompagné d'un jet d'eau produit au niveau de l'opercule situé au contact du sédiment ce qui réduit la force d'adhésion, nommé « adhésion de Stefan » (Brainerd et al. 1997). Concernant la sole commune, seul Ellis et al. (1997) s'est intéressé à cette espèce en étudiant les effets de la simulation de la prédation afin d'évaluer si le taux de réponse, c'est-à-dire le pourcentage d'individus qui présentent une réponse de fuite après la perception du stimulus, changeait en fonction du substrat.

Dans ma thèse (§ Chapitre V), j'ai étudié le comportement anti-prédateur de la sole commune en focalisent mon attention sur leur réactivité et leur réponse physiologique suite à l'attaque de la part d'un prédateur aérien simulé

expérimentalement. Des expérimentations visant à évaluer les effets de la contamination chronique aux PCB sur le comportement anti prédateur chez la sole commune ont été conduites durant ma thèse mais ne seront pas présentées dans ce manuscrit.

La réactivité peut être évaluée à travers le **taux de réponse**. Bien que cette variable ne soit pas toujours quantifiée, elle est considérée comme clé dans le succès de la réponse de fuite (Domenici 2002 ; Fuiman et al. 2006).

Ellis et al. (1997) ont montré que la réactivité chez la sole était de 70,4 %, ce qui reste relativement faible comparé aux « poissons ronds » (e.g. ~ 100 % chez le hareng Clupea harengus, Domenici et Batty 1997; ~ 90 % chez le bar européen Dicentrarchus labrax, Lefrançois et Domenici, 2006), bien que la comparaison entre différentes études doive être faite avec prudence à cause notamment des dissimilitudes de méthodologies utilisées (e.g. type et intensité de stimulus; Domenici et Batty, 1997). Chez les « poissons plats », ce faible niveau de taux de réponse suggère une plasticité comportementale plus marquée quant à leur réponse anti prédateur. On peut observer que les poissons plats peuvent en effet, au lieu de fuir, rester immobiles sur le fond en étant plus ou moins enfouis dans le substrat. Ce comportement, nommé comportement d'immobilisation ou « freezing behaviour » (Brown et al. 1998; Johnsson et al. 2001; Cooke et al. 2003; Pollock et al. 2003 ; Shingles et al. 2005) est souvent associé à certaines caractéristiques physiologiques, comme la diminution de la fréquence de ventilation ainsi que la diminution du rythme cardiaque (Cooke et al. 2003; Johnsson et al. 2001). De ce fait, le comportement d'immobilisation peut être considéré comme un « état de vigilance physiologique » de courte durée pendant lequel l'activité du poisson est réduite (notamment la ventilation et la locomotion), de façon à optimiser le comportement cryptique de l'individu (Cooke et al. 2003).

Il est intéressant de noter que la détection d'un prédateur est généralement associé à une augmentation de la fréquence de ventilation (Metcalfe et al. 1987; Barreto et al. 2003; Hawkins et al. 2004; Queiroz et Magurran 2005). Cette augmentation est interprétée comme une façon d'assurer un apport suffisant en oxygène pour « reconstituer » le déficit d'oxygène suite à la fuite et/ou de se préparer à se défendre. Ainsi, en complément des indicateurs physiologiques utilisés pour déterminer un état de stress chez les poissons, i.e. changements de niveau catécholamines, corticoïdes et glucose dans le sang (Wendelaar-Bonga 1997; Barton 2002), la fréquence de ventilation peut être considérée comme un

indicateur physiologique qui permet d'identifier une condition de stress chez les poissons. Par exemple, Barretto et al. (2003) ont utilisé la fréquence de ventilation comme outil comportemental pour indiquer la reconnaissance visuelle de la menace d'un prédateur, utilisent un stimulus visuel, chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). L'évaluation de la fréquence de ventilation est par conséquent une méthode simple et non invasive, permettant d'évaluer l'état de stress du poisson à travers une observation directe.

II.6.2.Les effets de l'hypoxie sur le comportement anti-prédateur

Les performances locomotrices et sensorielles qui sont impliquées dans le succès de la réponse de fuite chez les poissons dépendent de facteurs internes à l'organisme, comme sa morphologie et sa taille, mais aussi de facteurs externes, comme les facteurs environnementaux (e.g. température, hypoxie; Domenici et al. 2000; Wilson et al. 2010). Par exemple, des études précédentes ont montré comment la réactivité chez le mulet à grosse tête, *Mugil cephalus* et le bar *Dicentrarchus labrax*, étaient diminuées en condition d'hypoxie (Lefrançois et al. 2005; Lefrançois et Domenici 2006). Ces auteurs ont proposé que cette diminution de réactivité serait due à une diminution de la motivation (Webb 1986), une réduction de la perception du danger causée par un éventuel dysfonctionnement des organes de perception (i.e. ligne latérale), mais aussi une modification de la stratégie anti-prédateur, qui participerait à une réduction de la dépense énergétique.

En raison de sa vie benthique et de la baisse de sa capacité de nage, la sole utilise le mimétisme pour échapper à l'attention d'un potentiel prédateur. A l'approche d'un prédateur, la sole utilise le comportement de « freezing behaviour » pour améliorer son mimétisme. Le but de ce cinquième chapitre est d'évaluer le comportement antiprédateur de la sole en condition de normoxie et de sévère hypoxie (15%), en considérant la réaction des poissons d'un point de vue physiologique, c'est-à-dire à travers l'analyse de la fréquence de ventilation. En fait, on suppose qu'en condition d'hypoxie, la sole augmente la fréquence de ventilation pour améliorer l'oxygénation du sang. On suppose, donc qu'en condition d'hypoxie, la capacité cryptique de la sole est diminuée à cause de l'augmentation de la fréquence de ventilation et qu'elle devient alors plus visible pour le prédateur.

CHAPITRE III - Métabolisme aérobie et tolérance à l'hypoxie chez les juvéniles de sole commune (Solea solea L. 1758) contaminés aux PCB

III.1. Introduction générale

Dans ce chapitre je me suis intéressée à évaluer comment les juvéniles de sole commune répondaient à l'hypoxie et à la contamination aux PCB, contraintes environnementales auxquelles ils sont susceptibles d'être exposés en milieu côtier. Ce premier chapitre est composé d'un article actuellement soumis dans la revue « Aquatic Toxicology ». Le manuscrit est précédé d'une introduction en français et est suivi d'une synthèse qui résume les principaux résultats obtenus.

Les zones côtières sont utilisées par la plupart des juvéniles comme nourricerie (Gibson 1994; Amara et al. 2001). Cependant, ces zones sont caractérisées par une haute variabilité des facteurs environnementaux d'origine naturelle (i.e. salinité, température, oxygénation de l'eau) ou anthropiques comme les xénobiotiques (e.g. métaux lourds, polluants organiques persistants).

Parmi les polluants organiques présents dans la nature, j'ai utilisé dans ma thèse les PCB pour évaluer les effets de la contamination sur le métabolisme énergétique des juvéniles de soles. Le choix d'utiliser les PCB comme contaminants est lié à leur haute toxicité, leur concentration élevée en zone côtière, le fait qu'ils soient facilement bioaccumulables et bioamplifiables (Abarnou 2010).

Selon le nombre et la position de leurs atomes de chlore, les PCB provoquent différents types de réponses toxicologiques comme une diminution de l'activité du système nerveux (i.e. rat Long-Evans *Rattus norvegicus*, Lehmler et al. 2005); un dysfonctionnement du système endocrinien (i.e. perche jaune *Perca flavescens* et brochet *Exos lucius*, Hontela et al. 1992); une diminution de la progéniture (i.e. souris à pattes blanche *Peromyscus leucopus*, Voltura et French 2007); ou encore des perturbations du comportement natatoire (i.e. carpe commune, *Cyprinus carpio*, Schmidt et al. 2005). Néanmoins, jusqu'à présent, seules quelques études se sont concentrées sur les effets sub-létaux des PCB sur le métabolisme aérobie des poissons (i.e. anguille européenne *Anguilla anguilla*, Van den Ginneken et al. 2009) et sur les interactions avec d'autres stress environnementaux comme l'hypoxie (i.e. choquemort *Fundulus heteroclitus*, Kramer et Schulte 2004). Or, les études bioénergétiques donnent un point de vue essentiel sur les interactions entre les poissons et leur environnement en s'intéressant notamment à la variabilité des flux d'énergie vers leurs différentes activités (i.e. Fry 1971; Claireaux et Lefrançois 2007). Chez la sole, l'effet de

l'hypoxie a été étudié par Lefrançois et Claireaux (2003) qui ont mis en évidence chez des poissons sains un effet limitant à partir de 50-75 % de saturation en air à travers une diminution significative de la capacité métabolique aérobie. Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'effet d'une exposition chronique aux PCB sur le métabolisme aérobie de *S. solea* dans des conditions variables d'oxygénation, ainsi que sur la tolérance à l'hypoxie. Deux hypothèses ont été testées au cours de ce travail :

- (i) la capacité métabolique aérobie est réduite en conséquence d'une diminution du métabolisme actif (AMR) et/ou d'une élévation du métabolisme de maintenance (SMR),
- (ii) la tolérance à l'hypoxie est altérée en réponse aux variations métaboliques.

On peut en effet s'attendre à ce que les processus de défense et de détoxication déclenchés par l'exposition aux polluants induisent des coûts énergétiques supplémentaires (Sokolova et Lannig 2008). Par exemple, Wilson et al. (1994) ont montré que l'exposition à une concentration sub-létale d'aluminium produisait une augmentation significative du taux métabolique de maintenance chez les juvéniles de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*.

Dans ce contexte, à travers des techniques de respirométrie, les taux métaboliques de maintenance et maximaux ont été déterminés chez des soles respectivement au repos et soumises à un effort natatoire intense. Les individus testés ont été contaminés au préalable par un mélange de quatre congénères de PCB. La contamination a été effectuée expérimentalement par voie trophique sur une période de 30 ou 60 jours.

Nous avons également tenté de déterminer les conséquences de la contamination aux PCB sur la tolérance à l'hypoxie en mesurant la consommation d'oxygène maximale (MO_{2max}) des soles au cours d'une hypoxie progressive, et en determinant la concentration critique en oxygène relative au SMR.

PCB contamination does not alter the aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea* L. 1758) even in the most polluted sites of France

Cannas M.¹, Atzori F.², Rupsard F.³, Bustamante P.¹, Loizeau V³., Lefrancois C.^{1*}

- 1- Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000, La Rochelle, France;
- 2- Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (FR-EDD), FR 3097, CNRS-Université de La Rochelle- Ifremer, 2 rue Olympe de Gouges, 17000, La Rochelle, France;
- 3- IFREMER, Département Dynamiques de l'Environnement Côtier, Technopole Brest-Iroise, Point du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

Chapitre III

Abstract

Whereas coastal habitats have major role as nursery for many fish species, they are

also submitted to pollutant and oxygen fluctuations. The Fry's concept of metabolic scope

for activity was used to evaluate the effect of PCB on the aerobic metabolism in juvenile

common sole (0-1 year old). Aerobic Metabolic Scope (AMS) in control and PCB-

contaminated fish via food pathway was determined using respirometry techniques.

Furthermore, the hypoxia tolerance in control and PCB-contaminated fish was evaluated by

assessing their critical oxygen concentration (O_{2crit}). Our results showed that while PCB-

contaminated fish were able to maintain constant the AMS, PCB tend to affect their aerobic

metabolism by acting on standard metabolic rate, maximal oxygen consumption (MO_{2max}) in

hypoxia and O_{2crit}. In conclusion, we can hypothesize that a long-term exposure to PCB may

decrease their tolerance to hypoxia and consequently impair the survival and/or development

of soles in their natural environment.

Keywords: bioenergetics; aerobic metabolic scope; persistent organic pollutant; flatfish

68

III.2. Introduction

Coastal areas play a key role as nursery for juvenile in many species of teleosts. Such ecosystems are indeed characterized by a high productivity and offer food sources necessary to the development of growing juveniles (Gibson, 1994; Amara, 2001). Because of their geographical status, coastal areas are under the influence of aquatic and terrestrial inputs, and are thereby particularly exposed to fluctuations in physico-chemical factors, such as salinity, temperature, oxygen and pH. During the last decades, human activity brought about changes in water quality principally through the land-associated run-off and waste waters. The excessive inflows of nutrients (i.e., phosphorus and nitrogen) induce for instance eutrophication episodes often associated to hypoxia phenomenon. Furthermore, together with the nutrients, waste waters cause the inlet of various xenobiotic such as heavy metals and persistent organic pollutants (POPs).

Amongst the POPs released in the marine environment, polychlorinated biphenyls (PCB) are considered as the most toxic and widely distributed class (Abarnou, 2010). Both invertebrate and vertebrates accumulate PCB mainly by the trophic pathways (e.g., Boon, 1984; Danis et al., 2005 a, b). Because of their high liposolubility, PCB easily bioaccumulated in marine organisms and they biomagnified all along the food chain (Borga et al., 2001; Hoekstra et al., 2003; Nfon et al., 2008). Although their use as a raw material or chemical intermediate has been banned in the EC since 1985 (85/467/EEC, 6th amendment to Directive 76/769/EEC), it is estimated that over 30% of the one million tons of PCB produced are still present in aquatic and terrestrial ecosystems (Borlakoglu et al., 1991). PCB provoke several toxicological responses, depending on the number and the position of their chlorine atoms (Ahlborg et al., 1994). For instance, previous studies showed that sublethal effects of PCB include: impairment of the neurosystem activity (e.g., in the Long-Evans rat, Rattus norvegicus, Lehmler et al., 2005); impairment of the endocrine system, as shown by the decrease in the level of cortisol circulating in response to stress (e.g., in yellow perch, Perca flavescens and northern pike, Exos lucius, Hontela et al., 1992; in women, Mendola et al., 1997); diminution of the offspring number (e.g., in white-footed mouse, Peromyscus leucopus, Voltura et al., 2007); and also impairment in swimming behavior (e.g., in young carp, Cyprinus carpio, Schmidt et al., 2005). Nevertheless, to the best of our knowledge, only few studies to date have focused on the sub-lethal effects of PCB on fish aerobic metabolism (i.e., in European eel, Anguilla anguilla, van Ginneken et al., 2009) and

on the interactions with other environmental stressors such as hypoxia (i.e., killifish, *Fundulus heteroclitus*, Kramer and Schulte, 2004).

Bioenergetics studies give an essential point of view on the interactions between fish and their environment (e.g. Fry, 1971; Claireaux and Lefrançois, 2007). Fish activities (e.g., swimming, search for food, digestion, reproduction) are all related to energy-demanding processes that have to be accommodated within the animal aerobic metabolic scope (AMS). AMS was defined by Fry (1971) as the energy potential of an organism and is so considered as a proxy to assess physiological performance and fitness in fish when facing environmental constraints (e.g., Priede, 1985; Claireaux et al., 2000; Mallekh and Lagardere, 2002; Claireaux and Lefrancois, 2007, Pörtner and Farrel, 2008; Guderley and Pörtner, 2010). AMS is partly driven by the environmental factors that were divided by Fry (1947, 1971) into five classes (i.e., controlling, masking, limiting, lethal and directive) depending on their effects on the metabolism. In this classification, oxygen and pollutants are considered as limiting factors as they interfere with metabolic processes and can therefore reduce the maximal metabolic rate sustainable by the organism (defined by Fry as the active metabolic rate, AMR)), which is definite as the finite capacity of the cardio-respiratory system to provide for nutrient and oxygen demands. In addition, pollutants are classified as masking factors, since pollutant-related processes of defense and detoxification are likely to induce supplementary energy costs (Sokolova and Lannig, 2008, Nivogi et al., 2006) and thereby an elevation of the standard metabolic rate measured in a resting fish (i.e., SMR; Fry, 1971). For instance, Wilson et al. (1994) showed that the exposure to a sub-lethal concentration of aluminum induced an increase in the resting metabolic rate in juvenile of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).

In this context, the aim of our study was to investigate the sub-lethal effects of hypoxia and the sub-lethal concentration of PCB on the aerobic metabolism of common sole chronically exposed through the food pathway. Our main hypothesis was that chronic exposure to PCB may 1) constrain aerobic metabolic scope by reducing AMR and/or increasing SMR and 2) induce thereby a decrease in their tolerance to stressful environment such as hypoxia. Specifically this study focus on juvenile sole because 1) common sole is a bottom-dwelling species, which occupies the coastal zone during its juvenile phase; 2) during this period, soles feed on the invertebrates living in the sediments which are expected to be highly contaminated by PCB (Cicero, 2000; Chau, 2006) and 3) due to their reduced

swimming capacity, soles have to cope with a set of interacting environmental stressors, such as hypoxia.

III.3. Materials & methods

III.3.1 Experimental animals

Juveniles (~1 year old) of common sole *Solea solea* (mean \pm S.D.; length: 11.4 \pm 1.0 cm; mass: 16.0 \pm 3.6 g) were obtained from an aquaculture (Solea BV, Ijmuiden, Netherlands). Upon arrival at the laboratory, fish were transferred to 500 l indoor rearing tanks with recirculated and filtered seawater (temperature: 20°C; salinity: 31psu; fixed photoperiod: 12h/12h). Fish were then maintained for a three-week period of acclimation in the laboratory before being transferred in 60 l glass-aquaria for the experiments. Soles were fed daily with commercial pellets. Feeding was discontinued 24h before any manipulation of the fish.

III.3.2 Protocol of food contamination

Sole contamination occurred through the food pathway. Food consisted of commercial pellets (DAN-EX 1362, Danafree ® Horsens, Denmark) contaminated with a mixture of PCB prepared by a specialized laboratory (IFREMER, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Brest, France) following the protocol described in Eichinger et al. (2010). Two concentrations of PCB were used. The lowest concentration (i.e., [PCB] low = 670 ng PCB g⁻¹ of food) was adjusted in order to attain in experimentally-contaminated soles during 60 days, the PCB concentrations similar to that measured in juvenile soles from the Seine estuary (i.e., average PCB concentration of 400 ng g⁻¹ dry weight in the liver, Loizeau, personal communication). This estuary is considered as the most heavily contaminated by PCB along the entire French coast (Abarnou and Simon, 1986). On the other hand, the highest concentration of PCB (i.e., [PCB]high= 2239 ng PCB g⁻¹ of food) was ~3.5 times higher than [PCB]low and was used as a positive control, which aimed at inducing PCB-related physiological effects. The PCB mixture employed for contamination contained four congeners selected because of their widespread presence in the environment: CB105, CB118, CB149, and CB153. The CB153 (2,2',4,4',5,5'-

Chapitre III

Hexachlorobiphenyl), a di-ortho-substituted compound, is one of the most abundant congener in marine organism. Albeit CB153 has a low cytotoxicity, it is considered as the most recalcitrant congener with respect to the biotransformation and therefore the most persistent in the food web (Kannan et al., 1995). On the other hand, the CB149 (2,2',3,4',5',6-Hexachlorobiphenyl), a di-ortho-substituted compound, can be partially metabolized (Andersson and Förlin, 1992). The CB105 (2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl) and CB118 (2,3',4,4'5-Pentachlorobiphenyl) are mono-ortho-substituted which makes them more toxic than the other congeners. The congener 118 and 153 are also considered amongst the congener named "indicator PCB" as suggested by the International Committee for the Exploration of the Sea (ICES), i.e., these congeners are considered as a representative index of PCB contamination (MacGregor et al., 2010). For each congener, the concentration measured in the experimentally-contaminated pellets is presented in Table III.1. Because of the very low solubility of PCB, iso-octane was used as solvent coating to facilitate their incorporation into the food. The concentration of the employed iso-octane was 40 ml kg⁻¹ of pellets. After the incorporation of PCB, pellets were evaporated with a nitrogen jet in order to remove the solvent.

Table III.1. Concentration (ng g⁻¹) of the four PCB congeners used for the contamination of commercial pellets. PCB_{low} and PCB_{high} correspond to a total concentration of 670 and 2239 ng PCB g⁻¹ of food respectively.

CB composition	PCB_{low}	PCB_{high}	
CB 153	314	1019	
CB 149	134	456	
CB 118	150	503	
CB 105	72	261	

III.3.3 Protocol of sole contamination

Ten days before the beginning of contamination, 75 soles were anaesthetized with clove oil (0.04 ml L^{-1}), weighed, measured and then transferred into 60 L glass-aquaria, and

a total biomass of ~ 100 g was respected per aquarium (i.e., 6 to 9 fish were held per aquarium). All the aquaria were placed in a thermo-regulated room where temperature was maintained constant (20 °C) all along the experiment. Ten days after their transfer into the aquaria, fish were exposed to one of the 4 following treatments: a group was fed with food containing the lowest concentration of PCB and a group with the highest one (i.e., group PCB_{low} , n= 21 and group PCB_{high} , n=19, respectively); a group was fed with food which contained the iso-octane solvent (i.e., group *Solvent*, n=21); and a group control was fed with uncontaminated food which contained no solvent (i.e., group *Control*, n=14). The group *Solvent* was used as a control to assess the effects of the solvent itself. Fish were daily fed with 1% of their total body mass. After the feeding period (\sim 6 hours), the remained pellets (i.e., not-eaten by the fish) were removed every day.

III.3.4. PCB analysis.

After being tested, soles were killed by an overdose of anesthetic (Clove oil: 0.2 ml L⁻¹), and the liver was removed and frozen at -80°C for further analysis of their PCB contents. Concentration of CB153 was measured in the liver according to the protocol described in Jaouen-Madoulet et al. (2000). Briefly, frozen livers were freeze-dried and then grounded to obtain a fine homogeneous powder. Water content was estimated by the determination of the weight lost after freeze-drying. To quantify the PCB contained in the powdered materials, a weighed amount was solvent-extracted (by a hexane:acetone mixture in the proportion of 80:20, respectively) using a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec). Subsequently, the solvent was carefully and completely evaporated using a rotavapor. The extracts were cleaned-up appropriately before the final instrumental analysis by gas chromatography, with an electron capture detector on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet et al. (2000) and Bodiguel et al. (2008). Contamination by the congener CB153 was quantified using a standard solution. Hepatic concentration of CB153 (ng g⁻¹ of dry weight, hereafter d.w.) was measured after 30 and 60 days of contamination (i.e., n=6 and n=7 for PCB_{low} and n=7 and n=7 for PCB_{high} at 30 and 60 days, respectively).

III.3.5. Respirometry

The experimental set up consisted of 4 respirometers (4.5 l) placed into the same thermo-regulated room than the aquaria. Inside of each respirometer, a flat propeller was set on a central axis and lay on the bottom in order to force the sole to swim when necessary. The axis was connected to a motor, whose speed (e.g., 67 turn min⁻¹) was regulated by the experimenter. Respirometers were positioned in buffer tanks (100 cm x 80 cm x 60 cm). Water supply in each respirometer was allowed thanks to flushing pumps placed in the buffer tanks. Each flushing pump was connected to a timer which regulated the flushing period. Each respirometer was also equipped with a recirculated pump to ensure homogenization of the water inside. Oxygen concentration inside of the respirometer was measured with a polymer optical fiber (Presens, Germany) positioned on the wall of the respirometer and connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, PreSens, Germany). Oxygen data were sampled each 30 seconds and recorded in a computer. Each buffer tank was equipped with a U.V filter and a counter-current gasequilibration column to control oxygen level. A pump supplied the column with the water coming from the buffer tank. An air stone positioned down in the water column bubbled air or nitrogen to set normoxia or hypoxia, respectively.

III.3.6. Experimental protocol

After 30 days of contamination, aerobic metabolism was assessed in individuals of each of the 4 groups ($Control_{-30}$, n=8; $Solvent_{-30}$, n=8; PCB_{low-30} , n=7 and $PCB_{high-30}$, n=8). The other soles were maintained in the aquaria for a longer contamination lasting 60 days and constituted the groups $Control_{-60}$ (n=6), $Solvent_{-60}$ (n=13), PCB_{low-60} (n=14) and $PCB_{high-60}$ (n=11). Fish were tested once and individually. An experiment lasted 3 days, during which one fish of each treatment (i.e., a total of 4 fish) were concomitantly tested in the 4 respirometers. An experiment consisted in exposing each fish to 3 consecutive steps. First, as soon as transferred into the respirometer, each fish was chased in order to increase its energy-demanding activities and assess Active Metabolic Rate (AMR). To oblige fish to swim, the propeller connected to the motor was switched on until the fish exhaustion (i.e., until when the fish was not able to swim anymore, which occurred within \approx 10 min). Then, fish oxygen consumption (MO₂) was measured during 30 min. The second step consisted in

exposing sole to a progressive hypoxia in order to determine the maximal MO_2 (MO_{2max}) as a function of the oxygen water content and the critical oxygen saturation (O_{2crit}). Fish were successively exposed to four level of water oxygenation: 60%, 40%, 20% and 10%. At each of these levels, fish were chased until exhaustion by activation of the propeller and the MO_{2max} was measured. After the last measurement, normoxia was restored (within ~ 15 min) by bubbling oxygen into the counter-current gas-equilibration column. Thirdly, MO_2 was measured in resting animals to estimate Standard Metabolic Rate (SMR). In order to do so, fish were left undisturbed during the following 48h and measurements of oxygen consumption were carried out automatically. Each measure of MO_2 lasted 30 minutes and a flushing period of 25 minutes was respected between consecutive measurements. Blank respiration was routinely assessed before and after each experiment by assessing MO_2 in empty respirometers. If present, MO_2 of micro-organisms was subtracted to the total measure of MO_2 .

III.3.7. Calculation of the oxygen consumption and O_{2crit}

Only the last 20 min of the 30 min-period of measurement was used to calculate the fish MO_2 (mg O_2 kg⁻¹ h⁻¹) with the equation described in Lefrançois and Claireaux (2003):

$$MO_2 = \Delta [O_2] \cdot \Delta t^{-1} \cdot VOL_{\text{resp}} \cdot m^{-1}$$
 Eq. III. (1)

where Δ [O₂] is the decrease in water oxygen concentration (mgO₂ 1⁻¹) during the measuring period (Δt). For each MO₂ measurement, [O₂] was plotted as a function of time and a linear regression was adjusted in order to determine Δ [O₂]. Δt ⁻¹. The regression coefficient (i.e., R²) which illustrates the accuracy of the regression was > 0.98 in all cases. VOL_{resp} is the volume of the respirometer (4.5 1) minus the volume of the fish and m is the mass of the fish.

Since the respiratory metabolism depends on the animal mass, MO₂ was standardized for a 100 g fish using the following relationship (Lefrançois and Claireaux, 2003):

$$MO_{2 \text{ cor}} = MO_{2} \cdot (m \cdot m_{\text{cor}}^{-1})^{1-A}$$
 Eq. III (2)

where $MO_{2 \text{ cor}}$ (mg O_2 kg⁻¹ h⁻¹) is the oxygen consumption of a fish with a corrected mass (i.e., $m_{cor} = 0.1$ kg), MO_2 is the measured oxygen consumption (mg O_2 kg⁻¹ h⁻¹) and m (kg) is the mass of the fish experimentally tested. The coefficient A is the allometric exponent describing the relationship between the metabolic rate (mg O_2 kg⁻¹ h⁻¹) and the body mass. A value of 0.8 was used as in other teleosts (e.g., Steffensen et al., 1994).

III.3.8. Assessment of Active Metabolic Rate (AMR), Standard Metabolic Rate (SMR), Aerobic Metabolic Scope (AMS) and critical oxygen saturation (O_{2 crit.})

Active metabolic rate (AMR) was assessed as the MO₂ measured in exhausted fish after being chased. In order to assess SMR, a frequency distribution of the MO₂ values measured during the last 48 hours was plotted, as recommended by Steffensen et al. (1994). In general, it is possible to observe a bimodal frequency distribution, due to the fact that fish may present routine activity. The first peak is considered to reflect the value of the SMR, and the second is considered to be the consequence of the routine activity (Steffensen et al., 1994). Since we did not notice such a difference in the frequency distribution of MO₂, only the data measured during the last day were used. During this period, the fish was supposed to recover from the stress derived from experimental manipulation and from hypoxia exposure (Steffensen et al., 1994). Aerobic metabolic scope (AMS) was calculated as the difference between AMR and SMR.

 MO_{2max} , and as consequence AMS, decrease with water oxygen content (van den Thillart et al., 1994; Claireaux and Lagardère, 1999; Lefrançois and Claireaux, 2003; Dutil et al., 2007; Chabot and Claireaux, 2008). Critical oxygen saturation (i.e., O_{2crit}) was assessed as the water oxygen content at which the maximal sustainable MO_{2max} was equal to SMR, i.e., when the AMS was nill (Fry, 1947; Steffensen et al., 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann and Steffensen, 1997; Iversen and McKenzie, 2010). O_{2crit} was evaluated according to the method proposed by Bilberg et al. (2010). Briefly, MO_{2max} was plotted as a function of oxygen water saturation. Hereafter, a curve was fitted using the "exponential rise to maximum" function [y=a (1-exp^{-bx})] (SigmaPlot, Systat Software 11.0). For each fish,

 O_{2crit} was defined as the intersection between the curve obtained, and its SMR and according to the following equation:

$$O_{2crit} = \left(\frac{-\ln (1-(SMR/a))}{b}\right)$$
Eq. III (3)

where a and b are the constants provided by the curve fittings software.

AMR, SMR, AMS, as well as O_{2crit} were assessed for each fish.

III.3.9. Statistical analysis

Two-way ANOVA was used to determine the effect of PCB-exposure on the variables AMR, SMR, AMS and O_{2crit}. ANOVAs were set with the different treatments (i.e., PCB_{low}, PCB_{high}, and Solvent vs. Control) and both contamination periods (i.e., 30 vs. 60 days) as main factors. When a significant interaction between the factors tested was found, planned comparisons were employed to assess the statistical significance of specific differences in the statistical analysis design (Underwood, 1981). Two-way ANOVA with treatments (PCB_{low} , PCB_{high}) and periods of contamination (30 and 60 days) as main factors was used to compare the hepatic concentration of CB153 between the fish from group PCB_{low} and PCB_{high} , after 30 and 60 days of contamination. In addition, a Pearson test was employed to evaluate the correlation between the hepatic concentration of CB 153 of the PCB-contaminated groups and the variables AMR, SMR and O_{2crit}. Because it has been already showed that in sole and in many others teleosts species MO_{2max} declines as oxygen availability decreases (e.g., van den Thillart et al., 1994; Claireaux and Lagardère, 1999; Lefrançois and Claireaux, 2003; Dutil et al., 2007; Chabot and Claireaux, 2008), statistical analysis were focused on the effects of PCB on MO_{2max}. To do that, at each levels of water air saturation (i.e., at 100%, 60%, 40%, 20% and 10% in air saturation, hereafter a.s.) a Two-way ANOVA was employed with exposure period (30 versus 60 days) and treatment (Solvent, PCB_{low}, PCB_{high} vs. Control) as main factors. The level of statistical significance was set to P<0.05. Statistical analyses were conducted using STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., USA). Data are presented as mean \pm S.D.

III.4. Results

Hepatic concentrations of CB 153 in contaminated soles are presented in Table III.2. CB153 concentrations showed a significant effect of the treatments ($F_{1:24}$ =13, P_{ANOVA} <0.01) which differed with the exposure period to the pollutant ($F_{1:24}$ =7.6, P_{ANOVA} <0.05 for the interaction term). Planned comparison showed that CB153 concentration between the groups PCB_{low-30} and $PCB_{high-30}$ was not significantly different ($P_{PLANNED COMPARISON}$ >0.05). On the contrary in soles belonging to the group $PCB_{high-60}$, the CB153 concentration was ~two-fold higher than those of the other groups (PCB_{low-60} , PCB_{low-30} , $PCB_{high-30}$; $P_{PLANNED COMPARISON}$ <0.05 in all cases). Hepatic CB153 concentrations in individuals from the groups Control and Solvent were below the detection limit.

Table III.2. Concentration (Mean \pm SD, ng g⁻¹ dw) of the congener CB153 in the liver of PCB-contaminated soles after 30 and 60 days of contamination. Soles from the group PCBlow and PCBhigh were exposed to a total of PCB concentration of 670 and 2239 ng PCB g⁻¹ of food, respectively. Values not sharing a common superscript were significantly different (PANOVA<0.05).

Exposure period	PCB_{low}	PCB_{high}
30 days	$584 \pm 567^{\mathrm{a}}$	763 ± 386^{a}
60 days	401 ± 172^{a}	1783 ± 934^{b}

Independently of the exposure period and PCB treatments, no significant correlation was observed between the hepatic CB153 concentration and AMR, AMS or O_{2crit} (Pearson correlation, $P_{PEARSON}>0.05$ in all cases). For SMR, a similar pattern was observed except for the individuals exposed to $PCB_{high-60}$, for which a positive correlation was found ($r_{PEARSON}=0.85$; $P_{PEARSON}<0.001$, Fig. III.1).

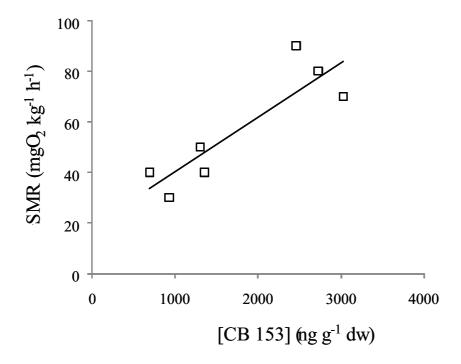


Figure III.1. Correlation between the concentrations of CB 153 (ng g^{-1} dw) and standard metabolic rate (SMR) in the high PCB-contaminated group during 60 days (PCB_{high-60}: SMR=18.83 + 0.022 [CB153], R²= 0.77; Pearson correlation: $r_{PEARSON}$ = 0.85, $P_{PEARSON}$ <0.001).

No significant effect of treatments was found on the SMR, AMR, AMS and O_{2crit} , (treatment $P_{ANOVA}>0.05$ in all cases; Table III.3). The period of contamination had a significant effect exclusively on O_{2crit} ($F_{1:41}=5.4$, $P_{ANOVA}<0.05$) and a significant interaction was observed only on SMR ($F_{3:67}=2.8$, $P_{ANOVA}<0.05$). A posteriori planned comparison showed that this pattern was due to the soles exposed to the highest PCB concentration during 60 days. Individuals of these group showed a significantly higher SMR ($P_{PLANNED}$ COMPARISON<0.05) associated with a significant increase in O_{2crit} ($P_{PLANNED}$ COMPARISON<0.05).

Table III.3. Average (\pm SD) of the Active Metabolic Rate (AMR), Standard Metabolic Rate (SMR), Aerobic Metabolic Scope (AMS) and critical oxygen saturation (O_{2crit}) in the four experimental groups of sole: the PCB-exposed individuals (PCB_{low} and PCB_{high}) and the uncontaminated individuals (Control and Solvent). For each treatment, * indicates values that are significantly different between 60 and 30 days ($P_{PLANNED\ COMPARISON}$ <0.05).

	Control		Solvent		PCB_{low}		PCB_{high}	
	30 days (n=8)	60 days (n=6)	30 days (n=8)	60 days (n=13)	30 days (n=7)	60 days (n=14)	30 days (n=8)	60 days (n=11)
AMR (mgO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)	151.9±41.2	155.8±24.7	129.5±22.2	143.9±43.3	159.7±28.3	137.1±23.5	153.7±59.2	173.2±73.9
$\frac{SMR}{(mgO_2 kg^{-1} h^{-1})}$	46.9±9.6	45.8±18	42.3±10.2	53.8±12.1	52.9±14.7	44.3±16.5	38.7±8.4	52.7±18.4*
$\begin{array}{c} AMS \\ (mgO_2 kg^{-1} h^{-1}) \end{array}$	105±39.6	110±27.4	87.2±24.8	90.1±37.6	106.9±21.7	92.8±31.3	114.9±60.7	120.5±71
O _{2crit} (% a.s.)	15.5±6.4	20.9±12.4	22.5±2.3	30.5±12.2	16.5±4.3	25.7±14.4	16.1±5.1	30.2±18.8*

Whatever the treatment and the exposure period to PCB, a similar decrease in MO_{2max} with hypoxia was observed (Fig. III.2). In normoxia and severe hypoxia (i.e., at 20 and 10% a.s.), MO_{2max} did not show any significant difference among the four treatments (P_{ANOVA}>0.05) neither between the 30 and 60 days of exposure (P_{ANOVA}>0.05, for both exposure period and interaction terms in all cases). Only few isolated significant differences were observed at 60 and 40% a.s. At 60% a.s., a significant effect of both treatments (F_{3:67}=3.9, P_{ANOVA}<0.05) and duration of contamination (F_{1:67}=6.2, P_{ANOVA}<0.05) was found. At 60% a.s. a posteriori planned comparison showed that this pattern was mainly due to a significantly lower MO_{2max} in the group *Solvent* when compared to the group *Control* at 30 days of contamination (P_{PLANNED COMPARISON}<0.05; Fig. III.2). In addition, a significant reduction in MO_{2max} was observed in the group *PCB_{high-60}* when compared to *PCB_{high-30}* (P_{PLANNED COMPARISON}<0.05). At 40% a.s., only a significant effect of duration of contamination was found (F_{1:67}=9.1, P_{ANOVA}<0.01), and was related to the group *PCB_{low}* for which MO_{2max} decreased significantly in individuals contaminated during 60 days (P_{PLANNED COMPARISON}<0.05).

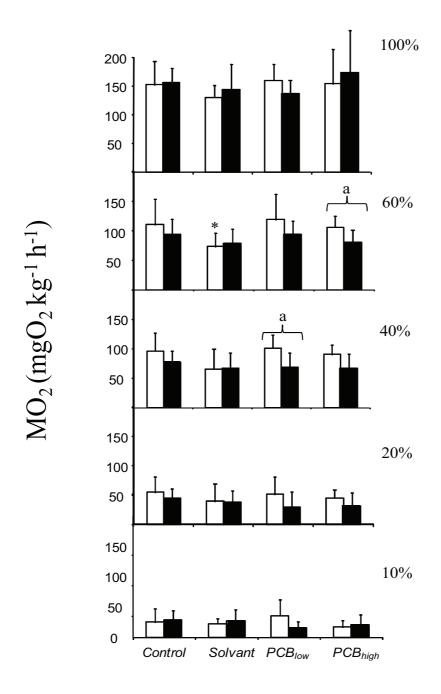


Figure III.2. Average maximum metabolic rate (MO_{2max}) measured in tested groups after 30 (Control, n= 8; Solvent, n=8; PCB_{low} , n=7; PCB_{high} , n=8) and 60 days of contamination (Control, n= 6; Solvent, n=13; PCB_{low} , n=14; PCB_{high} , n=11). For a given level of O_2 saturation and a given period of contamination, * indicates a significant difference with the control group ($P_{ANOVA} < 0.05$); for a given level of O_2 saturation and a given treatment, a indicates a significant difference between 30 and 60 days of contamination ($P_{PLANNED} < 0.05$). All the values are means \pm S.D.

III.5. Discussion

The aim of this study was to evaluate the effect of PCB on the aerobic metabolism and the tolerance to hypoxia in juveniles of the common sole *Solea solea*. Our results suggested that whatever the duration and the level of contamination, the PCB exposure did not affect neither AMR nor AMS. On the other hand, after 60 days period of contamination, the highest PCB concentration (Table III.2) raised sole SMR and induced an associated elevation in O_{2crit} .

In the current study, the average AMR measured in sole ranged between 129.5±22.2 and 173.2±73.9 mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹. These data are in agreement with previous studies carried out on the same species at 20°C (i.e., 152.2 mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹ in van den Thillart et al., 1994 and 159.2 mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹ in Lefrançois and Claireaux, 2003). Neither AMR nor AMS were influenced by the PCB contamination experimentally-induced in the present study (Tables III.2 and III.3). This suggests that the sub-lethal concentrations of PCB we tested did not prevent the soles from meeting their maximal oxygen requirements. AMS is an integrated measurement which traduces the energy a fish is able to mobilize for its activities (Fry, 1971). If soles presented the same level of AMS even after exposure to PCB, it suggests that allocation in energy among the physiological processes tends to be constant. Therefore PCBexposed soles should not present any reduction in energy-demanding activities such as locomotion, digestion or growth. The growth rate was not assessed in the tested sole. However, a previous study on juvenile of common soles exposed to the same protocol of contamination was conducted by Eichinger et al. (2010) and showed that PCB-exposure did not affect their growth. This pattern is consistent with the absence of variation in energetic performance we observed in the present study, that is likely to illustrate a constancy in sole's energetic flexibility, scope for growth and probability of survival (Priede, 1985; Evans, 1990) in PCB-contaminated environment.

Energy balance in an organism also depends on the part of energy obligatory allocated to its maintenance activities. SMR measured in the uncontaminated soles (Table III.3) are in agreement with the SMR assessed in 20° C-acclimated sole by van den Thillart et al. (1994; 41 mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹) and Lefrançois and Claireaux (2003; 49 mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹). On

the contrary, SMR in soles exposed to the highest concentration of PCB during 60 days (i.e., PCB_{high-60}; Table III.3) was increased suggesting that maintenance activities tend to be influenced by this pollutant. This hypothesis was strengthening by the positive correlation found between SMR and hepatic CB153 concentrations (Fig. III.1). It is likely that variation in SMR was the result of supplementary energy requested for the activation of proteins that are implicated in the detoxification process as initially hypothesized. For instance, Lannig et al., (2006) showed a 40-86% increase of SMR in cadmium-exposed oyster, Crassostrea virginica. They concluded that this pattern was mostly due to the elevated costs of protein synthesis involved in detoxification or protective mechanism such as glutathione expression, antioxidant enzyme, cellular repair mechanism, as well as expression of stress protein. It is worth noticing that SMR measured in sole exposed to PCBhigh during 30 days of contamination was particularly low (Table III.3). It cannot be excluded that such a low value may participate to the observed statistical difference between PCB-contaminated soles during 30 and 60 days. The general pattern was therefore not clear which limits further discussion. Even if we used a satisfactory number of fish for each condition to assess AMR, AMS and O_{2crit} (Fig. 2), assessment of SMR may have suffered a limited number of replicates. In addition, even if hepatic CB153 concentrations were significantly higher in soles exposed to the highest concentration of PCB during 60 days (PCB_{high-60}, Table III.2), it subsisted a quite large variability among the individuals of this group (Fig. III.1).

Comparisons with other studies suffer from a lack of available data, mainly because of differences in the type of pollutants tested and/or in the experimental approach employed for contamination. For instance, effect of PCB was investigated in the European eel (*Anguilla anguilla*) by van Ginneken et al. (2009) who showed that PCB-contaminated eels were characterized by lower aerobic metabolism than healthy individuals. However, adult eels were injected intraperitoneally with a mixture of PCB consisting of CB 153, 126 and 77 at very high concentrations (i.e., 5mg kg⁻¹, 7µg kg⁻¹ and 50µg kg⁻¹ of body weight, respectively). Furthermore, aerobic metabolism was measured in individuals swimming at a low speed (i.e. 0.5 body length.s⁻¹ or 0.4 m.s⁻¹) and was therefore representative of the eel routine metabolic rate rather than the maximal, or active, level. Another study (Voltura et al., 2007) carried out on the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) showed no effect of PCB neither on energy metabolism nor on growth. The authors suggested that this finding may be due to a large dose-dependent decrease in thyroid hormone concentrations. To date, it appears that comparative assessment of the effects of PCB exposure on aerobic

metabolism is limited and that scattered information prevents a general pattern from emerging. Effects of metal pollution were on the contrary extensively studied (e.g., Sibly and Calow, 1989; Calow and Forbes, 1998; Sherwood et al., 2000). Despite these numerous studies, effects of metals on aerobic metabolism are still confuse and controversial (see the review of Sokolova and Lanning, 2008). Effects appear to be dependent of a large set of factors such as the metal studied, its concentration, the pathway of metal uptake, as well as other natural factors such as temperature. It is likely that the effects of PCB, and those of POPs in general, follow the same pattern.

When exposed to hypoxia, the maximal metabolic rate the sole can sustained (MO_{2max}) declined with the oxygen as observed in the same species by Lefrançois and Claireaux (2003) and in other fish species by various authors (e.g., Fry, 1974; Priede, 1985; Schurmann and Steffensen, 1997; Claireaux and Lagardère, 1999; Dutil et al., 2007; Chabot and Claireaux, 2008; Iversen et al. 2010). In addition, in some sparse cases, oxygen-related decrease in $MO_{2\text{max}}$ was influenced by the PCB-treatment the soles were exposed to. For instance, at both 60% and 40% a.s., a longer exposure to PCB induced an enhanced reduction in MO_{2max}. This decrease may be related to any impairment of the organs and cellular mechanisms involved in the oxygen transport. Such impairments were observed in various fish species following contamination to different types of pollutants. For instance, tributyltin chloride contained in the antifouling paints for boats, was found to affect red cell function in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Virkki and Nikinmaa, 1993). Oil-exposed soles showed reduced MO_{2max} while exposed to normoxic and hypoxic conditions (Davoodi and Claireaux, 2007). Further investigations carried out by these authors suggested that MO_{2max} reduction was likely to be a consequence of weakened cardiovascular performance due to the impairment of cardiac output, heart rate and stroke volume (Claireaux and Davoodi, 2010). Regarding PCB, they were found to limit anaerobic metabolism in killifish, Fundulus heteroclitus, by interfering with glycolytic enzymes (Kraemer and Schulte, 2004). A similar effect on the enzymes involved in the aerobic metabolism cannot be excluded, however, the lack of information regarding the specific effects of PCB on such functions limits further discussion. Moreover, it cannot be excluded that the solvent employed to fix PCB on the experimental-contaminated pellets (i.e., iso-octane) participated to the reduction in MO_{2max} of sole while coping with mild hypoxia (Fig III.2).

In severe hypoxia (i.e., 20% and 10% a.s., Fig. III.2), the oxygen-related diminution in MO_{2max} was not significantly influenced by the type of contamination nor by its length. It is worth noticing that, even if not significant, the reduction in MO_{2max} was enhanced in PCB-contaminated soles during 60 days (Fig. III.2). Associated with the increase in SMR, it may participate to raise the level of critical oxygen saturation (O_{2crit}). This is consistent with the significant increase in O_{2crit} observed in soles exposed to the highest PCB concentration during 60 days when compared to those contaminated during 30 days (Table III.3). Critical oxygen saturation was assessed as the minimal level in water oxygen content needed to sustain SMR (Fry, 1948; Steffensen et al., 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann and Steffensen, 1997; Iversen et al. 2010). Facing a progressive hypoxia, individuals with an elevated O_{2crit} would be sooner unable to extract enough oxygen to meet their SMR, and have thus to cope with physiological distress. In regard of the present results, it can thus be hypothesized that an elevated PCB concentration (i.e., 1783± 934 ng g⁻¹ d.w., Table III.2) would reduce the tolerance to hypoxia in soles. It is worth noting that PCB may limit tolerance to hypoxia also through their effects on the anaerobic metabolism. In oxygenlimited environment, shifting to anaerobic metabolism allows the organism to 1) compensate the hypoxia-related reduced supply in ATP and 2) maintain its energy-demanding activities. In killifish Fundulus heteroclitus exposed to hypoxia, glycolytic enzymes were downregulated in presence of PCB and limit thereby compensation through anaerobic pathway (Kraemer and Schulte, 2004). As consequence, by limiting the energy obtained by the anaerobic pathways, PCB are likely to reduce the fish survival to sub-lethal hypoxic conditions.

III.6. Conclusion

Sparse effects of PCB on SMR, MO_{2max} and O_{2crit} suggest that aerobic metabolism may be affected in contaminated juvenile of sole. However, consequences of PCB exposure have to be clarified by further studies, since no general pattern emerged. Furthermore, the most emphasized effect was observed for the highest level of PCB-contamination tested, which resulted in four-fold higher concentrations than the levels measured in wild juvenile soles from the Bay of Seine (Loizeau, personal communication). It would be therefore relevant to carry out investigations in adults, which are supposed to have higher levels of

concentration than juveniles, as consequence of the bioaccumulation process. On the other hand, our results suggest that negative effects of the PCB-contamination occur especially when soles are concomitantly exposed to hypoxia. Other studies suggest that the combined exposure to pollutants and hypoxia are more harmful than the exposure to the pollutant alone. Mortality of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, and coho salmon, *Oncorhyncus kisutch*, was for instance enhanced when exposed to both bleached kraft mill effluent and hypoxia (Alderdice and Brett, 1957; Hicks and DeWitt, 1971). Tolerance to hypoxia is reduced in PCB-contaminated fish (*Fundulus hetheroclitus*, Kraemer and Schulte, 2004). Since aquatic organisms are expected to cope with a large set of environmental stressors, investigations are necessary to assess effects of PCB together with other pollutants or environmental stressors. In addition, since metabolism is an integrative function at the individual level, it would be relevant to look at the processes involved in metabolic regulation at the cellular level (i.e., enzyme and hormone activity) and at the organ level. For instance, due to the importance of the cardiovascular system for the aerobic metabolism, it would be also interesting to assess heart performance in PCB-contaminated soles.

Acknowledgments

This research was supported by the Autonomous Sardinia Region through a PhD grant for Cannas M. This study also benefited financial support of the ANR funded SoleBeMol project (project no.: ANR-06-PVULN-O13-IFREMER No.07/2.210/F) and from the Contrat de Projet Etat-Région (CPER) "Littoral et Environnement". The authors are indebted to D. Chabot to have furnished the program R Development Core Team 2011 (Version: 2.13.2) necessary to the analyses data; with M. Prineau (FR-EDD 3097 CNRS-ULR-IFREMER) for its technical help. We are grateful to the IFREMER, Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer, Houmeau, and particularly to ML Begout for the facilities and for the biological material furnished. All experimental procedures in this work comply with the current laws in France.

III.7. Synthèse

Le troisième chapitre de ma thèse je me suis intéressé à l'effet des PCB sur le métabolisme aérobie et sur la tolérance à l'hypoxie des juvéniles de sole commune Nos résultats ont suggéré que, indépendamment de la durée et du niveau de contamination, l'exposition aux PCB n'affectait ni le métabolisme actif (AMR), ni la capacité métabolique (AMS). Par contre, après une période de contamination de 60 jours, nous avons observé une augmentation du taux de maintenance (SMR) chez les soles contaminées avec la concentration en PCB la plus élevée, associée à une augmentation de la concentration critique en oxygène (O_{2crit}). La concentration critique en oxygène a été définie comme le niveau d'oxygène minimal nécessaire au maintien du SMR (Fry et Hart 1948; Steffensen et al. 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann et Steffensen 1997; Iversen et al. 2010). Face à une hypoxie progressive, les individus ayant une concentration critique en oxygène élevée seraient plus limités quant au maintien de leur SMR. On peut alors supposer que dans certaines conditions, l'exposition aux PCB pourrait réduire la tolérance à l'hypoxie chez les juvéniles de soles. Toutefois, l'augmentation PCB-dépendante du SMR reste peu marquée. La tolérance à l'hypoxie chez des individus contaminés aux PCB sur du long terme (24 mois) a été évaluée dans une étude successive constituant le Chapitre VI de ce manuscrit

La contamination avec les PCB ne semble apparemment affecter ni l'AMR ni la capacité métabolique. Cependant, vu que la capacité métabolique dépend du bon fonctionnement du cœur, nous supposons que l'absence d'effets pourrait être expliquée par des mécanismes compensatoires à l'échelle organisationnelle inférieure, c'est-à-dire au niveau de l'organe. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés dans le prochain chapitre à l'évaluation des performances cardiaques *in vitro* chez les juvéniles de soles ayant subi le même type de contamination aux PCB durant 60 jours. Le système cardiaque est très sensible aux variations des facteurs environnementaux. De plus, de précédentes études ont montré que l'exposition chronique aux contaminants, pouvait induire une situation de stress généralisée (Wendelaar Bonga 1997). Par conséquent, l'hypothèse (i)

Chapitre III

d'une modification de la physiologie cardiaque, conséquence de la plasticité phénotypique de cet organe, voire (ii) d'une altération des capacités cardiaques, a été posée.

CHAPITRE IV - Performances cardiaques chez les juvéniles de sole commune (Solea solea L. 1758) contaminés aux PCB

IV.1. Introduction générale

Dans le chapitre précédent (Chapitre III) en utilisant des approches de respirométrie, j'ai pu étudier l'effet de la contamination par les PCB et de l'hypoxie sur le métabolisme aérobie et sur la tolérance à l'hypoxie des juvéniles de sole commune *Solea solea*. Nos résultats ont suggéré que les PCB n'affectaient ni le métabolisme actif (AMR), ni la capacité métabolique (AMS). Au contraire on a pu noter une augmentation du taux de maintenance (SMR) chez les soles contaminées à la concentration en PCB la plus élevée, associée à une augmentation de la concentration critique en oxygène (O_{2crit}). On peut donc supposer que dans un milieu contaminé et hypoxique, les soles, auraient plus de difficultés à maintenir leur métabolisme de maintenance. L'exposition aux PCB pourrait ainsi réduire leur tolérance à l'hypoxie. Cependant, les effets que nous avons observés sont de faible amplitude.

Dans le quatrième chapitre, nous nous sommes demandé si le stress induit par une contamination critique par les PCB pouvait avoir des effets sur la performance cardiaque. Nous avons donc évalué *in vitro* les performances cardiaques des cœurs de soles exposées à la même contamination que les soles testées pour le métabolisme aérobie.

Puisque le métabolisme est une fonction intégratrice au niveau individuel, la question posée était : les effets de la contamination par les PCB observés précédemment peuvent-ils s'expliquer partiellement par ceux observés à un niveau d'organisation inferieure, c'est-à-dire au niveau du cœur ?

Trois hypothèses ont été testées au cours de ce travail :

- (i) la diminution de la performance cardiaque est le résultat d'une diminution de la force de contraction,
- (ii) la diminution de la force cardiaque est le résultat d'une désensibilisation du tissu ventriculaire à la régulation adrénergique dans une situation de stress,
- (iii) la diminution de la force cardiaque est le résultat d'une diminution de la plasticité cellulaire des cardiomyocytes dans une situation de stress.

Les organismes exposés à la variation des facteurs environnementaux sont considérés être dans un état de stress, défini comme une remise en question de l'homéostasie (Cannon 1929). Les téléostéens répondent au stress en mettant en jeu un ensemble coordonné de réponses adaptatives ou « réponse intégrée au stress » impliquant 2 voies hormonales : la voie des corticoïdes (cortisol) et la voie des catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Cette mobilisation hormonale permet aux animaux de faire face au stress et de maintenir dans la mesure du possible l'homéostasie générale nécessaire à la survie. La revue de Wendelaar Bonga (1997) expose les modifications importantes se produisant au niveau de l'organisme téléostéen lors d'un stress chronique et en particulier, il peut se produire une augmentation de la perméabilité à l'eau et aux ions des épithéliums superficiels, y compris les branchies. Il est possible d'envisager qu'une des conséquences de ces perturbations hydrominérales systémiques soit la formation d'un œdème généralisé avec possiblement une augmentation de la pression artérielle pouvant conduire à une augmentation du travail du cœur. D'autre part, le cœur est la cible privilégiée de la noradrénaline et de l'adrénaline (§ II.4.4.1). Conformément à ce qui est observé chez la truite arc-en-ciel, Oncorhynchus mykiss (Gamperl et al. 1994), on peut s'interroger sur les conséquences au niveau cardiaque d'une exposition prolongée du cœur de téléostéen à ces hormones en situation de stress chronique.

Dans ces conditions, une exposition prolongée aux PCB pourrait induire des modifications des performances cardiaques, résultats des modifications du milieu environnant l'organe (augmentation de la tension artérielle, augmentation de la sécrétion des catécholamines,...) et comme conséquence une diminution de la force de contraction. Claireaux et Davoodi (2010) en exposant la sole commune à une contamination par les HAP ont observé des altérations des performances cardiaques (i.e. débit cardiaque, rythme cardiaque et volume d'éjection systolique plus faibles). Ces auteurs ont suggéré une réduction de la sensibilité adrénergique aussi qu'une capacité réduite des myocytes à mobiliser le Ca²⁺ pendant le couplage excitation-contraction (Hartzell 1988).

Cardiac performance in PCB-contaminated juveniles of common sole (*Solea solea* L. 1758)

Cannas M¹., Lefrançois C. ¹, Huet V. ¹, Bustamante P. ¹, Imbert N. ¹

1- Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000, La Rochelle, France;

Abstract

Increase of anthropogenic activities in the coastal zones obliges the fish to cope with some new environmental constraints such as organic pollutants (e.g. Polychlorinated biphenyls, PCB). The aim of our study was to investigate the effects of PCB on cardiac performance in juveniles of common sole (<1 year old). In particular, we measured in PCB-contaminated soles the force of contraction and the pumping capacity of the heart. Fish were contaminated via food and tested after 60 days of contamination. Preliminary results showed that PCB did not affect significantly the cardiac performance in this species, even if performance tended to decrease in the individuals exposed during 60 days to high PCB concentration. We supposed that this pattern would be reinforced with a longer period of contamination and/or if soles were exposed to additional environmental stress.

IV.2. Introduction

The coastal zone is naturally submitted to the variation of various environmental factors (e.g. temperature, oxygen, salinity and pH). As consequence marine organisms have developed physiological adaptations to be able to cope with an environment in continuous fluctuation. Nonetheless, during the last decades, global change due to human activities led to an amplification of this variation both in frequency and intensity. In addition, coastal zones are increasingly exploited by Man which has led to the introduction of xenobiotic substances in the marine environment. As a consequence, marine organisms are exposed continuously to these stressor factors. Stress can be defined as a condition during which the organism homeostasis is threatened or disturbed, as a result of the actions of intrinsic or extrinsic stimuli, commonly defined as stressors (Weedeler Bonga 1997). The responses of teleost fish to stressors encompass the activation a co-ordinated network of adaptive responses, collectively termed the "integrated stress response", which allows animals to maintain homeostasis. Depending on the nature of the stressor, this stress response may be a generalized endocrine response that occurs at the organism level and/or a cellular response involving protein synthesis.

The first response of the fish to a stressor is the activation of brains centre, which lead to the massive release into the circulation of catecholamine and corticosteroid (i.e.

primary response; Barton 2002). Those hormones have an immediate effect at blood and tissue levels (i.e. secondary response; Barton 2002) which lead to the increase in cardiac output, oxygen uptake and mobilization of energy substrate. The tertiary response (Barton 2002) occurs at the organism and population levels and lead to a reduction of growth, a depletion of the immune response and reproduction, and a decrease in the capacity to overcome to additional stressors (Wendelaar Bonga, 1997).

When fish are exposed to PCB, they may show an increase in the permeability of the surface epithelia, including the gills, to water and ions (Weedeler Bonga, 1997). As a consequence of the systemic hydro mineral disturbances, a formation of edema generalized could result, this may induce an increase in the heart work.

In this context, the aim of our study was to evaluate the effects of a chronic stress derived from the PCB-contamination on in *vitro* cardiac performance in juvenile of common sole by assessing (i) the force of contraction; (ii) the adrenergic sensitivity and (iii) the E-C coupling. Common sole is bottom-dwelling species, which use the coastal zone as nursery during the juvenile period. In this respect, the Bay of Biscay (France) is one of the most important nurseries in the Atlantic French coast. Since common soles spent their life living in intimate contact with the sandy and/or muddy bottom substrates, and due to their reduced swimming capacity, they are exposed to PCB which have an elevated affinity for the sediments.

IV.3. Materials & methods

IV.3.1 Animals handling and care

Juveniles of common sole *Solea solea*, (~1 year old; length: 11.4±1.0 cm; mass: 16.0±3.6 g; mean ± SD) were obtained from an aquaculture (Solea BV, Ijmuiden, Netherlands). Upon arrival at the laboratory, fish were transferred to 500 l indoor rearing tanks with recirculated and filtered seawater (temperature: 20°C; salinity: 31%; fixed photoperiod 12h/12h). Fish were then allowed to three-week period of acclimatation to the laboratory conditions before being transferred in 60 l aquaria where contamination was held. Fish were fed daily with commercial pellets (DAN-EX 1362, Danafree ® Horsen, Denmark). Feeding was discontinued 24h before any manipulation of the fish.

IV.3.2 Protocol of food contamination

Sole contamination occurred through the food pathway and followed the protocol already described in Eichinger et al. (2010). Briefly, fish were fed with commercial pellets (DAN-EX 1362, Danafree ® Horsen, Denmark), contaminated with a mixture of four PCB congeners, which were selected because of their widespread presence in the environment: CB105, CB118, CB149, and CB153. Two concentrations of PCB were used. The lowest concentration (*i.e.* PCB _{low} = 670 ng PCB g⁻¹ of food) was adjusted in order to attain in experimentally contaminated sole a final PCB concentration, after 60 days of contamination, comparable to that quantified in individuals sampled in the Seine estuary (i.e. average PCB concentration 400 ng g⁻¹ dry weight in the liver, Loizeau personal communication). On the other hand the highest concentration of PCB (i.e. PCB_{high}= 2240 ng PCB g⁻¹ of food), was ~3.5 times higher than PCB_{low}. The PCB_{high} was used as positive control, in order to estimate the effects of PCB over a short time of contamination.

IV.3.3 Protocol of sole contamination

Ten days before the beginning of contamination, 71 common soles were anaesthetized (Clove oil Sigma-Aldrich, 0.04ml Γ^1), weighed, measured and then transferred from indoor rearing tanks into 60l glass-aquaria, and a total biomass of maximum ~ 80 g was respected (~ 4 soles) per aquarium. All the aquaria were placed in a thermoregulated room where temperature was maintained constant (20 °C). Ten days after their transfer into the aquaria fish were exposed to one of the 4 following treatments: a group was fed with food containing the lowest concentration of PCB and a group with the highest one (i.e. group PCB_{low}, n= 17 and group PCB_{high}, n=21, respectively); a group was fed with food which contained the solvent iso-octane (i.e. Solvent, n=14); and a group was fed with uncontaminated food which contained no solvent (i.e. group Control; n=19). The group Solvent was used as a control to assess the effects of the solvent itself. Fish were daily fed with 1% of their total body mass. After the feeding period (~ 12 hours), not ingested pellets were removed every day.

IV.3.4 Tissue preparation

Sole were anesthetized with 0.5 ml l⁻¹ of clove oil (Sigma-Aldrich) and the heart was excised and placed in physiological saline solution of the following composition (in mmol 1 ¹): NaCl, 124.1; KCl, 3.1; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 0.9; Tes Salt, 6.4; Tes Acid 3.7; Pyruvic Acid 5.0; Glucose, 5.7 at a pH of 7.8, temperature of 22°C¹). After dissection the ventricle was carefully removed, weighed and measured in order to obtain the ventricular mass which was expressed as a percentage of body mass (relative ventricular mass, RVM-% of Wt). The ventricle was isolated and tied at either end by means of a ring to the experimental device, which allowed testing 4 ventricles simultaneously. One end of the ventricle was attached to a fixed post and the other one to a fine filament which connected to an isometric force transducer (ADInstrument). Then the ventricle was placed into a water jacket bath containing 5 ml of the oxygenated physiological saline solution, whose temperature was maintained constant at 20°C. The ventricle was stimulated using a stimulator delivering electric charge via two flattened platinum electrodes positioned at each side of the water jacket bath (0.2-2.0Hz, 10 V, 10 ms duration). Signal from the force transducer was amplified (PowerLab, ADInstrument) and displayed on chart recorder (Chart 4 recorder, ADInstrument). Ventricle was stretched until active tension (developed tension) reached a peak and was then allowed to equilibrate for 30 min at a stimulation rate of 0.2Hz.

IV.3.5 Experimental protocol

The cardiac performance was evaluated *in vitro*, on isolated ventricle. The test was carried out on the entire ventricle, because the heart of the juveniles sole was too small to make the strips (relative weight of heart: 0.1 ± 0.05 g; mean \pm SD). The protocol meant to evaluate the effect of PCB (i) on the contraction force in the presence of tonic adrenaline levels (10 nmol⁻¹), (ii) the adrenergic sensitivity in the presence of maximal adrenaline levels (10 μ mol⁻¹) and to test the effect of ryanodine (i.e. RYA; 10 μ mol⁻¹) in the presence of tonic and maximal levels of adrenaline.

IV.3.6 Experimental design

Each treatment (*Control, Solvent, PCB*_{low} and PCB_{high}) was divided into 2 experimental groups exposed to a different concentration of adrenaline: one group (*Control*: n=9; *Solvent*: n=5; PCB_{low} : n=8; PCB_{high} : n=11) was tested with the tonic concentration of adrenaline (10 n=10), and the other one (*Control*: n=10; *Solvent*: n=9; PCB_{low} : n=9; PCB_{high} : n=11) with the maximal concentration of adrenaline (10 n=10). The group tested with the tonic concentration of adrenaline was used as internal control for the correspondent treatment injected with maximal level of adrenaline (n=10). As a consequence, in each experiment two out of the four treatments were randomly chosen and for each treatment 2 ventricles were tested simultaneously, in order to have 4 ventricles in the experimental device. The recordings which were not analyzable are discounted.

Adrenaline

To evaluate if the chronic PCB-contamination may impair the peak tension in sole, two levels of adrenaline were used: a tonic level (10 nmol⁻¹) and a maximal level (10 □mol⁻¹). The tonic level (10 nmol⁻¹) was chosen since previous experiments proved that this concentration is present in the blood circulation of the resting fish (Milligan et al., 1989); furthermore it was noted that it was able to preserves the cardiac tonus when heart is tested *in vitro* (Shiels and Farrel, 1997). On the contrary, as under stressful condition the concentration of adrenaline circulating increase (Randall and Perry 1992; Gamperl et al., 1994), leading to an increase in the force of contraction (inotropism positive), we utilized a maximal concentration of adrenaline (10 µmol⁻¹) to evaluate if the chronic contamination with PCB decrease the adrenergic sensibility in the contaminated sole.

Adrenaline administration to test adrenergic sensibility

Once the four ventricles were placed in the experimental device, they were allowed to a 30 minutes of equilibration period, after which a tonic concentration of adrenaline (10

nmol⁻¹) was added to each of the four baths (first injection). After 10 min of equilibration period, in order to evaluate the isometric force of contraction, the four ventricles were exposed to the force-frequency trials where the pacing frequency was increased in 0.2 Hz (12 bpm) increment from 0.2 Hz to 2.0Hz (120bpm) (Shiels and Farrel 1997). For each pacing frequency the stimulation of the muscle lasting two minutes. At the end of the force frequency trials the pacing frequency was returned to 0.2Hz. Afterwards in order to evaluate the adrenergic sensitivity, in two out of four ventricles, a maximal concentration of adrenaline (10 µmol⁻¹) was added. In the other 2 ventricles, a tonic concentration of adrenaline (10 nmol⁻¹) was added once again and used as control. After 10 min of equilibration period, the ventricle was exposed to the force-frequency trials where the pacing frequency following the same protocol described above.

Ryanodine administration to test the participation of the sarcoplasmic reticulum

The ryanodine is a natural alkaloid which is able to modify the functioning of some intracellular calcium channels, such as the ones present on the sarcoplasmic reticulum (SR). This substance is a specific and irreversible ligand for the Ca²⁺-release channel. The effect of RYA on the Ca²⁺ release channel depends on the experimental concentration used. The concentration used in our experiment (10 µmol⁻¹) locks the SR-Ca²⁺ release channel in an "open state" rendering ineffective the Ca²⁺ contributing to contraction of the cardiomyocite (Rousseau et al. 1987). On the other hand, the administration of a higher concentration of RYA (>100 µmol⁻¹) provokes the loss of the Ca²⁺ activity providing the SR-Ca²⁺ release channel in a "closed state" (Rousseau et al. 1987).

To test the participation of the RS to the isometric contraction of the cardiomyocite, $10 \mu M$ of ryanodine was added to the four ventricles, two of which were pre-treated with $10 \mu mol^{-1}$ adrenaline and two with $10 \mu mol^{-1}$ adrenaline After 30 minutes period of stabilization, the ventricles were exposed to the force-frequency trials where the pacing frequency was increased of 0.2 Hz increment from 0.2 Hz to 2.0Hz. For each pacing frequency the ventricle was stimulated during two minutes. After the force frequency trials pacing frequency was return to 0.2 Hz During the 30 minutes period, it was supposed that the ryanodine was bond

irreversibly the Ry-Ca²⁺ released channel on the reticulum sarcoplasmic, rendering ineffective in contributing Ca²⁺ to the force development (Shiels and Farrel 2000).

IV. 3.7. Statistics

One-way repeated measure ANOVA (RM ANOVA) followed by Tuckey post-hoc test, having the treatment (Control, *Solvent, PCB_{low}, PCB_{high}*) as factor tested and the pacing frequency as repeated measurement, was used to evaluate the effect of the increasing stimulation frequency on the peak tension for each treatment injected with the different concentration of the adrenaline (10 nmol^{-1} and 10 µmol^{-1} adrenaline).

For each pacing frequency (0.2 Hz, 0.5 Hz, 1.0 Hz, 1.6Hz), two-way ANOVA was used to determine the effect of PCB-exposure on the force of contraction (mNmm⁻²) after adding a tonic concentration (10 nmol⁻¹) or maximal concentration (10 μmol⁻¹) of adrenaline to the ventricle. ANOVAs were set with different treatments (i.e. *Solvent, PCB_{low}, PCB_{high}, vs Control*) and adrenaline concentration (i.e. 10nmol⁻¹ *vs* 10μmol⁻¹ adrenaline) as main factors. When a significant interaction between the factors tested was found a planned comparison was employed to determine the statistical significance of the specific difference in the statistical analyses design (Underwood, 1981).

For each treatment a one-way RM ANOVA was used to assess the effect of ryanodine on peak tension in the ventricle pre-treated with a tonic concentration of adrenaline ($10 \text{ nmol}^{-1} \text{ vs } 10 \text{ nmol}^{-1} + \text{RYA}$) and a maximal concentration of AD ($10 \text{ } \mu \text{mol}^{-1} \text{ vs } 10 \text{ } \mu \text{mol}^{-1} + \text{RYA}$). The ANOVAs had the drugs (adrenaline and adrenaline+ryanodine) as tested factor and pacing frequency as repeated measurements.

To assess the effect of PCB on time to peak tension and the time of half relaxation rate (s) after adding a tonic concentration (10 nmol^{-1}) or a maximal concentration (10 µmol^{-1}) of adrenaline to the ventricle, one-way RM ANOVA, having the treatment as main factor (i.e. *Solvent, PCB_{low} and PCB_{high}* vs *Control*) and pacing frequency as repeated measurement, was used. When a significant interaction between the factor and the repeated measures was found, planned comparisons were employed to assess the significance of specific differences in the statistical analysis design (Underwood 1981). Due to the fact that

the maximal concentration of adrenaline was added to the muscle after a complete pacing frequency trial, the force of contraction in the pretreated ventricle with adrenaline $10 \,\mu\text{mol}^{-1}$ was corrected for the possible tiredness caused by the pacing frequency trials. The individual muscle contraction was analyzed at each pacing frequency using Labview software. The level of statistical significance was set at p<0.05. Statistical analyses were conducted using Statistica 8.0 (Statsoft, Inc). Data are presented as mean \pm SD.

IV.4. Results

IV.4.1 Frequency effect

Independently of the treatment received, and at both the concentration of adrenaline tested, it was noted a significant decrease as the pacing frequency increase (one-way RM ANOVA: $F_{3:84}$ =23.1, P<0.001 and one-way RM ANOVA: $F_{3:102}$ =107, P<0.001 for 10 nmol⁻¹ and 10 µmol⁻¹ respectively). This trend varied depending on the concentration of adrenaline employed. In the ventricle injected with the tonic concentration of adrenaline, the increase in the stimulation frequency cause an initial slight increase in the peak of tension at 0.2Hz, 0.5Hz and 1.0Hz (Table IV.1); this trend was followed by a significant decrease at 1.6Hz (Tuckey post-hoc test, P<0.001).

Tableau IV.1 Peak tension (mN mm⁻²) value in the four tested groups added with the tonic and maximal concentrations of adrenaline (10 nmol⁻¹ and 10 μmol⁻¹ respectively)

Tested groups	Concentrations of	Peak tension (mN mm ⁻²) value				
	adrenaline	0.2 Hz	0.5 Hz	1.0 Hz	1.6 Hz	
Control	10 nmol ⁻¹	0.52 ± 0.21	0.56 ± 0.25	0.60 ± 0.30	0.44 ± 0.21	
	10 μmol ⁻¹	0.59 ± 0.25	0.61 ± 0.28	0.56 ± 0.33	0.32 ± 0.22	
Solvent	10 nmol ⁻¹	0.31 ± 0.12	0.36 ± 0.15	0.40 ± 0.15	0.25 ± 0.11	
	10 μmol ⁻¹	0.68 ± 0.29	0.69 ± 0.32	0.56 ± 0.32	0.30 ± 0.16	
PCB_{low}	10 nmol ⁻¹	0.41 ± 0.24	0.45 ± 0.26	0.46 ± 0.29	0.25 ± 0.16	
	10 μmol ⁻¹	0.63 ± 0.24	0.61 ± 0.26	0.50 ± 0.25	0.22 ± 0.12	
PCB _{high}	10 nmol ⁻¹	0.49 ± 0.26	0.54 ± 0.32	0.48 ± 0.28	0.28 ± 0.15	
	10 μmol ⁻¹	0.58 ± 0.20	0.61 ± 0.24	0.49 ± 0.21	0.18 ± 0.09	

In the ventricle injected with the maximal concentration of adrenaline, a plateau was observed at the lowest pacing frequencies (0.2-0.5Hz). It was followed by a significant decrease in the peak of tension at the frequency of 1.0-1.6Hz (Tuckey post-hoc test, p<0.001 Table IV.1). Amongst the groups injected with the tonic concentration of adrenaline, the percentage of decreasing in the peak tension as a consequence of the increase in the pacing frequency at 1.6Hz compared to 0.2Hz was more pronounced in the PCB-contaminated groups (38.5% and 44.1% in PCB_{low} and PCB_{high} respectively) compared to the no contaminated group (16.0 % and 22.1% in Control and Solvent group, respectively). The same trend was noted in the ventricles added with the maximal concentration of adrenaline (45.6% and 55.1% in Control and Solvent and 64.7% in PCB_{low} and PCB_{high} respectively).

IV.4.2 Peak tension

The peak tension is showed in Fig. IV. 1. At 0.2Hz and 0.5Hz, no effect of the treatment was found amongst the group tested. However, a significant effect of the injected adrenaline (10 μ mol⁻¹ vs 10 nmol⁻¹) was observed (two-way ANOVA: F_{1:63}=10.3; p<0.01 and F_{1:63}=5.3; p<0.05 for 0.2Hz and 0.5 Hz, respectively). A posteriori planned comparison showed that the difference was related to group *Solvent* (planned comparison, p<0.01). Indeed, at both frequencies, the injection of 10 μ mol⁻¹ caused a significant increase in the force of contraction (Fig. IV.1). At 1.0Hz, no significant effect of treatment or adrenalinewas found in the tested groups (P_{ANOVA} >0.05). At 1.6Hz independently of the concentration of adrenaline used, a significant effect of treatment was found (two-way ANOVA; F_{3:62}=3.7 p<0.05). A posteriori planning comparison showed that this pattern was due to the PCB-contaminated soles (PCB_{low} and PCB_{high}) which showed a significant lower peak of tension compared to the Control group (P_{ANOVA}<0.05).

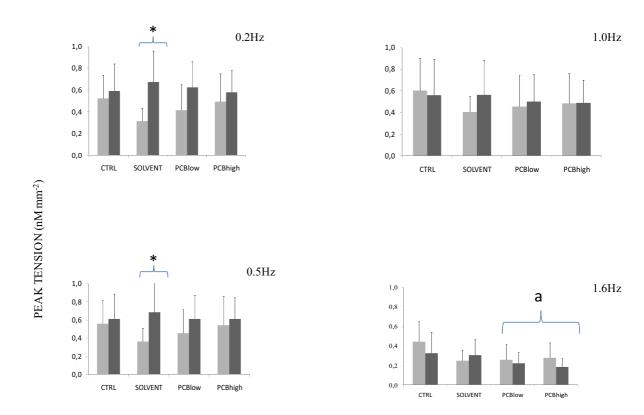


Figure IV.1. PCB-contamination effect evaluated at each pacing frequency (Hz) tested. * indicate a significant effect of the adrenaline (p<0.05); a represents a significant difference from the CTRL group (p<0.05)

No effect of drugs added was found in the group PCB_{low} , however the statistical analyses revealed a significant effect of the increasing pacing frequency (one-way RM ANOVA; $F_{3:66}$ =16.6, p<0.01) and a significant interaction (one-way RM ANOVA; $F_{6:66}$ =4.5, p<0.01) between the factors and the frequency tested. The planned comparison showed that the addition of ryanodine induced a significant decrease in the force of contraction in the ventricle pretreated with the tonic concentration of adrenaline. This effect was significant at the lowest (0.2 and 1.5Hz) but not at the highest (1.0Hz and 1.6) frequency. The presence of the maximal concentration of adrenaline in presence of ryanodine was not able to compensate the negative effect induced by the ryanodine to none of the tested frequency. Independent of the drug administered an effect of pacing frequency (one-way RM ANOVA; $F_{3:81}$ =14.9, p<0.01) and a significant interaction (one-way RM ANOVA; $F_{6:81}$ =3.21, p<0.01). The injection of the ryanodine in presence of both concentration of adrenaline cause a significant decrease in the peak tension at the lowest frequency (0.2Hz) and at 0.5Hz for the ventricle injected with the tonic concentration of

adrenaline. In no case the presence of maximal concentration of adrenalinewas able to compensate the negative effect of the ryanodine.

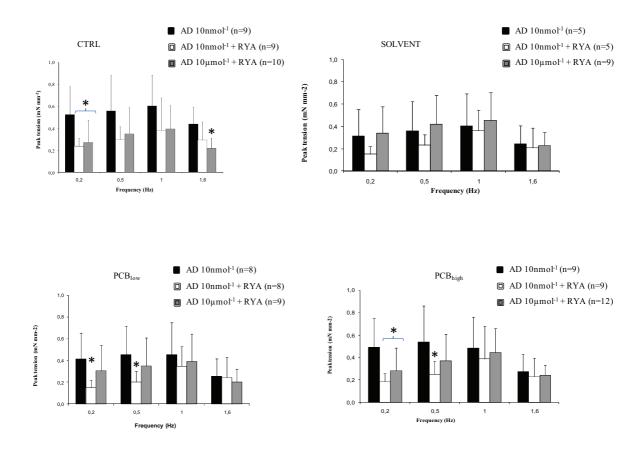


Figure IV.2. Force-frequency response obtained under different treatments, as showed in the legend. * indicate a significant effect of the ryanodine on the ventricle pretreated with different concentrations of adrenaline (10 nmol^{-1} and 10 µmol^{-1}) compared to the ventricle without ryanodine

IV.5. Discussion

The objective of this study was to evaluate if the chronic contamination (60 days) to PCB impaired the *in vitro* cardiac performance of juveniles of common sole. The interest of this study was related to the fundamental rule that heart have in relation to the energetic allocation towards the organs and because it is considered to be extremely sensitive to the

stress condition. Taking into consideration that the temperature is considered amongst the environmental factors which may have the greater effect on the cardiac performance (Farrell 1996; Vornanen et al. 2002), common soles were acclimated and tested at 20°C which has been shown to bethe optimal temperature for this species, i.e. where their scope for activity is highest (Lefrançois and Claireaux, 2003).

To the best of our knowledge, up to now no studies have carried out on the in vitro cardiac performance in sole exposed to PCB-contamination, which make this study worthy of interest, but at the same time limit the potential comparison of with other study.

Our results showed that the PCB contamination did not seem to impair the cardiac performance in the contaminated soles. A lower force of contraction was noted at the lowest frequency compared to the *Control* group; such decrease in the force of contraction was significant in the *Solvent* group. It is difficult to provide a full explication for this result because there is lacking bibliography on the solvent used (Isooctane).

It has been shown that fish exposed to aquatic pollutants through the respiratory surface present hydro balance disequilibrium leading to generalized edema (Wendelaar Bonga 1997). Even the exposure pathway was different, ingested PCB are transferred to the different tissues (Danis et al. 2005). We can hypothesize that the observed decrease in the peak tension could be related to an increase in the work of the heart, and that the heart is not able to contract properly in presence of a tonic concentration of adrenaline.

On the other hand, when to the ventricle was added the maximal concentration of AD, no significant difference was found in the force of contraction amongst the treatments. This result could be explicated by an increase in the adrenergic sensibility to the adrenergic stimulation in the PCB-contaminated sole.

However it is worth to notice that at the higher tested frequency (1.6Hz) independent of the adrenaline concentration used, the peak tension decrease in a significant manner in the PCB-contaminated fish when compared to the *Control* fish. In a study carried out on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* the exposure during 96h to the Neguvon (an herbicide) induced an oxidative stress in the heart, which cause impairment in the force of contraction (Mantovani-Thomaz et al. 2009). We can suppose that at higher frequency the PCB-contaminated ventricle is less able to contract. This hypothesis may be explained by a hypertrophy of the cardiomyocytes, following the stress derived by the contamination. In

physiological condition, the size of fish cardiomyocytes is small compared with other vertebrates. The long and narrow shape of cardiomyocytes creates a large surface-volume ratio. The small distance depths of cardiomyocyte reduce the distance from the sarcolemme to the myofilaments. Most of the studies have evaluated the effect of the temperature of acclimation on the cardiac performance. Perasalmi (1997) reported that the cold induced cardiac enlargement was related to a hypertrophy of cardiomyocytes. Up to now, as long as we know, no study evaluates the cardiac performance in sole exposed to a chronic stress derived by the PCB-contamination. As consequence of the lacking studies on this subject, it is difficult to confirm this hypothesis.

In mammalian cardiomyocytes, a small influx of extracellular Ca²⁺ provokes a massive release of Ca²⁺ from the RS (Fabiato 1983). This mechanism activates the myofilaments and initiates the cardiac contraction. In fish, the role of the RS in the excitation-contraction is less known. Most fish species do not actually utilize the RS during the excitation-contraction coupling (Driezdic and Gesser, 1988; Keen et al. 1994). We added the ryanodine to the ventricle pretreated with adrenaline to assess the participation of the Ca²⁺ deriving from the RS in the force of contraction. Our results showed the independent of the treatments received the administration of ryanodine in the ventricle pretreated with the tonic concentration of adrenaline led to a slight decrease in the peak of tension along all the tested frequencies. With the exception for the Solvent group, in the other groups this decrease in the force of contraction was significant, which suggested an active participation of the RS to the force of contraction. The degree at which the RS is employed in the force of contraction development depends on the species considered, as reported by Shiels et al. (2000). For example in the pacific mackerel Scomber japonicas, these authors found a small but significant reduction in the force of contraction (20%), suggesting an active participation of the RS in setting the maximum rate of excitation-contraction coupling at warm temperature. Other studies carried out on the skipjack tuna Katsuwonus pelamis (Keen et al. 1992) and on the yellowfin tuna Thunnus albacores (Shiels et al. 1999) showed a higher participation of the RS, where the percentage of reduction was assessed to be 30 and 60%. The observed difference in the degree of reduction could be explicated by the fact that on the contrary to the pacific mackerel, the other studies evaluate the sensitivity to the ryanodine in the atrium instead of on the ventricle. Indeed, it has been shown in mammals that the atrium displays greater ryanodine sensitivity as well as a larger RS (Bers, 1991). The same explanation was proposed by Aho and Vornanen (1999) which found a difference in the

sensitivity to ryanodine in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In addition we can suppose that the participation of the RS is more pronounced, in the species which are more active (i.e. tunas), than the sluggish fish, as the flatfish (e.g. common sole).

With the exception of the group *Solvent*, in the other treatments (Control, PCB_{low} and PCB_{high}), the presence of the maximal concentration of adrenaline was not able to compensate the negative effect of the ryanodine. This may suggest the implication of the RS in the development of the force of contraction at all the frequency tested. On the base to the gotten results, we can suppose that in sole exposed to a chronic contamination with PCB did not impair the cardiac performance. Nevertheless, the lack of effect we observed does not imply that the toxicological concerns of PCB are absent. On the contrary, it is becoming more evident the need to assess the cardiac performance in presence of other contaminants in the same matrix.

IV.6. Synthèse

Dans ce quatrième chapitre, nous avons voulu déterminer si le stress induit par la contamination chronique (60 jours) aux PCB pouvait affecter les performances cardiaques *in vitro* des cœurs des soles contaminées. L'intérêt de cette étude a été de rapprocher le rôle fondamental que le cœur a par rapport à l'allocation énergique vers les organes (§ III). Si le cœur est extrêmement sensible aux conditions de stress, un stress chronique peut affecter les performances cardiaques et par conséquent diminuer la capacité du poisson à faire face aux contraintes environnementales (Lannig et al. 2004).

Nos résultats ont montré que la contamination aux PCB semble avoir très peu d'effets sur les performances cardiaques. Des modifications significatives sont cependant visibles avec par exemple une force de contraction plus faible chez les soles contaminées que chez les contrôles à la plus forte fréquence de stimulation testée, qui simule la fréquence cardiaque lors d'une demande énergétique de l'organisme plus élevée. L'administration de RYA, qui a pour but de tester l'importance de la participation du réticulum sarcoplasmique dans la force de contraction générée, montre que les cœurs de soles contaminées utiliseraient cette source de calcium sur une plus large gamme de fréquence que les tissus contrôles. A cette température, comme pour les soles contrôles, cette diminution n'est pas compensée par l'administration de la concentration maximale de AD. Ces résultats montrent qu'il pourrait y avoir entre les cœurs contrôles et contaminés une différence concernant la mise en œuvre du couplage excitation-contraction (plasticité phénotypique ?) visible sur les basses fréquences : le calcium nécessaire à la contraction proviendrait pour une plus forte proportion du réticulum sarcoplasmique pour les cœurs contaminés. Cette adaptation permettrait de maintenir une force de contraction similaire à celle observée chez les soles contrôles. Aux plus fortes fréquences de stimulation, lorsque la participation du réticulum sarcoplasmique est moindre, les cœurs de soles contaminées seraient moins capables de développer une force de contraction suffisante en demande énergétique augmentée. Les résultats obtenus dans le chapitre III ne semblent cependant pas confirmer cette hypothèse.

Il est cependant important de noter que cette étude a aussi ceci d'intéressant qu'elle montre pour la 1ère fois la faible sensibilité des tissus cardiaques des juvéniles de sole à la régulation adrénergique à 20°C. Ces résultats semblent confirmer que la régulation adrénergique serait variable chez les poissons téléostéens et qu'elle serait fonction de la température d'acclimatation (pour revue Shiels et al. 2002) mais également de l'âge (Mercier et al. 2002). Compte tenu de cette constatation, il aurait été intéressant de tester nos hypothèses de départ sur des poissons contaminés et acclimatés à une température plus faible, en supposant une sensibilité adrénergique plus importante des soles juvéniles aux basses températures.

Sur la base des résultats obtenus nous pouvons supposer que l'exposition des soles à une contamination chronique avec PCB n'affecte que très peu leurs performances cardiaques dans la mesure où les paramètres environnementaux d'acclimatation ne semblent pas par ailleurs contraignants (i.e. température optimale, alimentation régulière et normoxie). Ces conditions pourraient limiter le stress induit par les PCB. Il est donc essentiel d'exposer les soles à une contamination à plus long terme en rajoutant des contraintes environnementales.

CHAPITRE V - L'effet de l'hypoxie sur la fréquence de ventilation chez la sole commune (Solea solea L. 1758) exposée à un stimulus de danger

V.1. Introduction générale

Dans le cinquième chapitre j'ai voulu examiner un autre trait biologique qui joue un rôle important pour la fitness de l'individu : la réponse anti-prédateur. Pour caractériser cette réponse, à la fois des aspects comportementaux et physiologiques ont été considérés chez la sole commune exposée à une hypoxie sub-létale. Ce troisième chapitre est composé d'un article actuellement accepté pour publication dans la revue *Journal of Fish Biology*. Le manuscrit est précédé d'une introduction en français et est suivi d'une synthèse qui résume les principaux résultats obtenus.

Face à un danger, tel que l'approche d'un prédateur, le poisson peut présenter différents types de réponse. Souvent la première réaction est la fuite, caractérisée par un reflex locomoteur provoquant de fortes accélérations (Domenici et Blake 1997). En alternative à ce comportement, on peut observer chez certains poissons une réponse d'immobilisation ou 'freezing response' (Godin et Valdron Clark 1997; Ellis et al. 1997). Ce comportement est caractérisé par une absence de mouvement ainsi qu'une diminution de la fréquence de ventilation et cardiaque (e.g. Smith et al. 1974; Mesquita et al. 2007), optimisant ainsi l'efficacité mimétique de la proie et limitant sa détection par le prédateur. L'expression du comportement anti-prédateur sous forme de réponse de fuite ou de 'freezing' dépend d'une série de facteurs extérieurs comme l'adéquation entre la coloration de l'animal et de son environnement (Radabaugh, 1989; Caro et al. 2004) ou l'intensité de la stimulation (Ellard et Byers 2005).

Les 'poissons plats', en raison de leur vie benthique, de leur morphologie et de leur habilité à changer de coloration selon le substrat, sont considérés comme étant des espèces cryptiques très performantes. Cette caractéristique va contribuer à une forte plasticité comportementale face à un danger potentiel. Ellis et al. (1997) ont étudié le taux de réponse (ou 'responsiveness') chez la sole commune, défini comme le pourcentage d'individus présentant une réponse de fuite suite à l'attaque d'un prédateur, réelle ou simulée expérimentalement. Ces auteurs ont observé une réponse de fuite seulement chez 70% des individus testés, alors que chez les espèces de 'poissons ronds' ce pourcentage atteint généralement 100% (Domenici et Batty 1997; Lefrançois et Domenici 2006). Ce résultat met en évidence le fait que chez les 'poissons plats', l'immobilisation est une réponse particulièrement présente en tant que comportement alternatif à la réponse de fuite.

Le taux de réponse est également influencé par les facteurs environnementaux comme la température (Preuss et Faber 2003), la présence de métaux lourds (Faucher et al. 2006) et l'hypoxie (Lefrançois et al. 2005 ; Lefrançois et Domenici 2006). L'effet de l'hypoxie n'a été testé que récemment et seulement chez deux espèces, le bar européen *Dicentrarchus labrax* et le mulet doré *Liza aurata*, chez lesquels une diminution significative du taux de réponse a été observée. Un des objectifs de notre étude était donc de tester chez une espèce benthique comme *S. solea*, si l'hypoxie engendrait une réponse similaire accompagnée d'une augmentation de la réponse d'immobilisation. Par ailleurs, en hypoxie, les poissons ont tendance à augmenter la fréquence et/ou l'amplitude de ventilation pour améliorer l'assimilation d'oxygène. La réponse d'immobilisation étant accompagnée d'une chute de la ventilation, nous nous sommes alors posé la question de savoir comment évoluait la fréquence de ventilation chez *S. solea* exposée à la fois à un prédateur et à l'hypoxie. On a ainsi voulu tester l'hypothèse que, suite à la simulation d'une attaque de prédateur, la fréquence de ventilation serait plus élevée chez un individu testé en hypoxie plutôt qu'en normoxie, limitant ainsi l'efficacité de mimétisme des individus.

Les objectifs de notre étude étaient donc d'évaluer l'effet d'une exposition à un niveau sub létal d'hypoxie sur la réponse anti-prédateur, en termes de taux de réponse et de réponse physiologique à travers l'observation de la fréquence de ventilation. Dans ce contexte, nous avons évalué le taux de réponse des soles suite à l'attaque d'un prédateur aérien simulé expérimentalement. Une caméra vidéo haute-vitesse a été utilisée pour enregistrer les réponses des différents individus testés. En parallèle, la fréquence de ventilation a été mesurée avant, pendant et après la stimulation. Le taux de réponse et la variation de la fréquence de ventilation a été évalué chez des soles exposées à une concentration sub létale d'oxygène (15% de saturation en air).

The effect of hypoxia on ventilation frequency in startled common sole (*Solea solea* L. 1758)

Cannas M.¹, Domenici P.², Lefrançois C.¹

1 LIENSs (UMR 6250, CNRS-University of La Rochelle), 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France;

2 CNR, IAMC, Loc Sa Mardini, 09072 Torregrande (Oristano), Italy

Key words: escape response, freezing behaviour, dissolved oxygen, respiration, flatfish

 $^{\rm 1}$ Author to whom correspondence should be addressed. Tel + 33 (5) 46 50 76 39; fax + 33

(5) 46 49 67 11; email: marcella.cannas@univ-lr.fr

Abstract

Ventilation frequency (F_V) in motionless common sole *Solea sol*ea was measured before and after a startling stimulus in normoxia and in hypoxia (15% air saturation). Startling reduced F_V in normoxia (from 41 \pm 3.3 beats min⁻¹ to near zero, *i.e.* 2.0 \pm 1.8 beats min⁻¹) and in hypoxia (from 80 \pm 4.4 to 58.8 \pm 12.9 beats min⁻¹). It is suggested that maintenance of high F_V in hypoxia may increase the probability to be detected by predators compared to normoxia.

V.2. Introduction

When exposed to a threatening stimulus animals may show various types of reactions. One of the most common reactions observed in startled fishes is the escape response, defined as a type of fast start characterized by a brief and sudden acceleration (Domenici & Blake, 1997). Alternatively, fishes may show freezing behaviour by adopting a fixed and immobile posture through which they become less susceptible to detection by predators (Godin, 1997). This behaviour is often accompanied by bradycardia and hypoventilation to decrease visibility (Ide & Hoffmann, 2002; Shingles et al., 2005). In animals belonging to different taxonomic groups (mammals: Caro et al., 2004; fishes: Hawkins et al., 2004) the decision to flee or freeze depends on a set of intrinsic and extrinsic factors, such as coloration (Caro et al., 2004) and stimulus intensity (Brown et al., 2006). The flattened shape of Soleidae, combined with their abilities to match the background, contributes to their crypsis (Kruuk, 1963). Ellis et al. (1997) found that their responsiveness (i.e. the percentage of individuals that showed an escape response following a threatening stimulus) was 70.4%, which is relatively low compared with pelagic fishes (e.g. $\sim 100\%$ in Atlantic herring Clupea harengus Linnaeus 1758, Domenici & Batty, 1997), although a comparison of responsiveness between studies should be made with caution because of the different stimuli used. Responsiveness also depends on environmental factors such as temperature (Preuss & Faber, 2003), hypoxia (Lefrançois et al., 2005; Lefrançois & Domenici, 2006), the presence of heavy metals in the water (Faucher et al., 2006) and social context (Queiroz & Magurran, 2005). For instance, Lefrançois et al., (2005) and Lefrançois & Domenici (2006) found that two species of pelagic fishes, flathead grey mullet Mugil cephalus Linneaus 1758 and european seabass Dicentrarchus labrax Linneaus 1758 exhibited a decrease in responsiveness when exposed to hypoxia.

The aim of the present experiment was to investigate the effect of hypoxia on ventilation frequency in startled common sole (*Solea solea*). With their benthic lifestyle and poor swimming capability, sole are exposed to environmental hypoxic conditions more than other species which swim in the water column. Furthermore, hypoxia is known to increase ventilation rate in fish (Burleson & Smatresk, 1990a, 1990b; Burleson *et al.*, 1992). Ventilation rate in normoxia is known to approach values around zero in startled flatfish, as a strategy aimed at maximizing crypsis (Peyraud & Labat, 1962; Ellis *et al.*, 1997). If ventilation rate in startled sole exhibiting a freezing response is higher in hypoxia than in normoxia, this would suggest that hypoxia has a negative effect on crypsis. The following hypotheses were tested in startled sole: a) hypoxia increases the proportion of freezing responses at the expense of escape responses, as found in other species (Lefrançois *et al.*, 2005) and b) in fish exhibiting a freezing response, hypoxia causes a ventilation frequency at the time of stimulation that is higher than that of fish startled in normoxia.

V.3. Materials & methods

Solea solea were collected in spring in the Pertuis Breton (La Rochelle,France, latitude 46°10' N; longitude 1° 9'O). Upon arrival at the laboratory, *S. solea* were transferred into rearing tanks (1m³, water depth: 50 cm) provided with a sandy bottom. Tanks were supplied with re-circulated, filtered and aerated sea water (range temperature: 19.5 - 21.6 °C). At least two weeks before experiments, the *S. solea* were transferred into holding tanks in a thermo regulated room (temperature range: 19.3 - 20.4 °C) which also contained the experimental tank. The *S. solea* were exposed to artificial light at a fixed photoperiod (12h light: 12h dark) and were fed daily at dusk with worms, oysters or commercial pellets.

The experimental tank was square (1m³, water depth 20 cm) with a layer of sand on the bottom. One side of the tank was transparent to film the fish from a lateral viewpoint. A digital camera (JVC Digital Video Camera GR-D73E, 25 frames s⁻¹, www.jvc.com) connected to a video recorder was used to record FV in a motionless individual from the lateral aspect. Four spot lights (125W each) positioned in each corner of the tank were successively switched on and were then left on for 1 h before the experiment started. The experimental tank was equipped with a counter-current gas-equilibration column to control

dissolved oxygen level. An air stone, positioned at the bottom of the column, bubbled air during normoxia and nitrogen during hypoxia to progressively reduce oxygen saturation to 15% of air saturation. The escape response was triggered by manually dropping a stick (90 cm long), that mimicked aerial predation, perpendicularly to the water surface into the experimental tank. To prevent S. solea from seeing the experimenter during the stimulation event, a wooden board, provided with a series of holes drilled at 10 cm distance from each other, was placed above the tank. These holes allowed the experimenter to drop the stimulus caudal to the fish, between 4 to 8 cm from the tail, once the position of S. solea in the tank was suitable. A total of 34 S. solea (total length, 18.0 cm \pm 0.2; mass, 41.1 g \pm 2.4; mean \pm S.E.) were used. Fish were divided into two groups, one comprising individuals tested in normoxia (i.e. oxygen was > 85% air saturation; treatment normoxia: TN; n = 21), the other comprising fish tested in hypoxia (i.e. oxygen was \sim 15% air saturation; treatment hypoxia: $T_{\rm H}$; n = 13).

The evening before an experiment, a *S. solea* was introduced into the experimental tank and left to recover overnight. The following day, *S. solea* belonging to the T_H group were exposed to a progressive decrease in oxygen down to 15 % air saturation, over approximately 1 h 30 min. Once the target oxygen saturation was reached, it was maintained for 30 min and then the stimulation was performed. After stimulation, each fish was left to recover for 30 min, maintaining the level of hypoxia at 15% air saturation. Before removing *S. solea* from the experimental tank, the level of oxygen was raised progressively back to normoxia. For experiments carried out in normoxia, the protocol followed was the same as in hypoxia, except that the oxygen level was maintained at > 85% air saturation. In *S. solea* that did not show an escape response, ventilation frequency (in groups T_N and T_H) was continuously recorded for 5 min before and after the stimulation. After each experiment *S. solea* was anesthetized (40 ppm of clove oil), weighed, measured and replaced in their rearing tank. Each fish was only tested once.

Responsiveness was calculated for each group (T_N and T_H) as the percentage of individuals that responded with an escape response to the threatening stimulus. F_V was analyzed only in individuals that did not escape (*i.e.* freezers). For each fish, F_V was estimated over the total duration of monitoring (*i.e.* 10 min.) calculated by counting

opercular movements over 15 s intervals, every 30 s. For each fish, a total of 21 $F_{\rm V}$ estimates were therefore obtained, 10 counts before stimulation (5 min), which were averaged to estimate a pre-stimulation value (*i.e.* the $F_{\rm V}$ in a resting fish or $F_{\rm V}$ control), one count of $F_{\rm V}$ calculated during the 15 second sampling period, which started as soon as the stimulus touched the bottom ($F_{\rm V 0s}$) and 10 estimates of $F_{\rm V}$ after the stimulation (5 min; $F_{\rm V 30s}$, $F_{\rm V 60s}$, $F_{\rm V 90s}$,, $F_{\rm V 300s}$).

V.4. Results

Comparison between the T_N group (n = 21) and the T_H group (n = 13) revealed a significant difference in responsiveness (Chi-square: $\chi^2_{(1)} = 4.52$, P < 0.05), i.e. the percentage of escaping individuals decreased from 57.1% in normoxia to 15.4% in hypoxia. A significant effect of the oxygen treatment on F_V was also found (repeated measures ANOVA: $F_{(1,19)} =$ 20.25, P < 0.001; Fig. V. 1), as well as a significant effect of time and a significant interaction (repeated measures ANOVA: $F_{(11, 209)} = 21.01$, P < 0.001 and $F_{(11, 209)} = 2.53$, P< 0.05, respectively). Mean $F_{\rm V~control}$ in the S. solea exposed to hypoxia was almost two-fold higher than in normoxia. Both groups (T_N and T_H) showed a significant decrease in F_V upon stimulation (planned comparison, $F_{V \text{ 0s}}$ vs $F_{V \text{ control}}$: for T_N , n = 8, p < 0.001; for T_H , n = 10, p< 0.01; Fig. V. 1). At the time of stimulation, F_V was similar in S. solea exposed to normoxia and hypoxia. However, the former showed a F_V close to zero (6 fish out of 8 showed $F_{\rm V~0s}=0$ beats min⁻¹, mean $F_{\rm V~0s}=2.0\pm1.8$ beats min⁻¹), while mean $F_{\rm V~0s}$ in hypoxic fish was 58.8 ± 12.9 beats min⁻¹, which corresponds to a decrease of only about 31% (Fig. V. 1). In addition, individuals in the T_N group then exhibited a significant increase in F_V relative to pre stimulation (planned comparison, for $F_{V \text{ control}}$ versus $F_{V \text{ 60s}}$, $F_{V \text{ 90s}}$,...., $F_{\rm V~300s}$, p < 0.05; Fig. V. 1), whereas individuals of the $T_{\rm H}$ group did not (planned comparison, for $F_{V \text{ control}}$ versus $F_{V 30s}$, $F_{V 60s}$, $F_{V 90s}$,..., $F_{V 240s}$ p > 0.05; Fig. V.1).

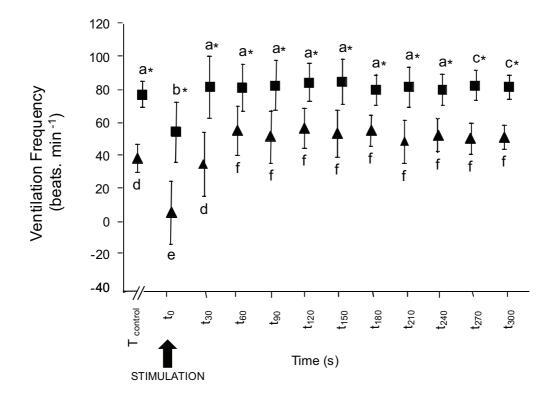


Fig V.1: Average ventilation frequency $(F_{\rm V})$ vs time in freezing S. solea in normoxia TN, \blacktriangle and hypoxia: TH, \blacksquare . Relative experimental time is indicated as t control, the time period used for calculating $F_{\rm V}$ control (i.e. $F_{\rm V}$ during the 5 min prior to stimulation); t $_{08}$, the time period used for calculating $F_{\rm V}$ $_{08}$, (i.e. $F_{\rm V}$ during the 15 s that followed stimulation); t $_{308}$, t $_{608}$,, t $_{3008}$, the time periods during which the post-stimulus $F_{\rm V}$ measurements were taken. For each level of oxygen tested, values with different superscripts are significantly different from their $F_{\rm V}$ control (P < 0.05). For each time period, an asterisk (*) indicates a significant difference between TN and TH (P < 0.05). All values are means \pm S.E.

V.5. Discussion

The results reveal that responsiveness in *S. solea* in normoxia is relatively low when compared to species of pelagic fishes (Lefrançois *et al.*, 2005; Lefrançois & Domenici, 2006) and that it is further reduced by hypoxia. The hypoxia related reduction in responsiveness is consistent with previous studies on pelagic fishes (Lefrançois *et al.*, 2005, Lefrançois & Domenici, 2006). These authors suggested that hypoxia-related reduction in responsiveness may result from an increase in response threshold, motivation to escape and energy saving. In *Pleuronectiformes*, the energetic costs of escaping may be even higher compared to pelagic fishes, because of the additional energetic costs of contrasting Stefan adhesion during the take-off from the bottom (Brainerd *et al.*, 1997). The current results show that *S. solea* respond to a threatening stimulus with hypoventilation, in line with previous work (Kruuk, 1963). This is in contrast with work on other teleost species, for which hyperventilation is a physiological indicator of perception of predation risk (Metcalfe *et al.*, 1987; Barreto *et al.*, 2003; Hawkins *et al.*, 2004; Queiroz & Magurran, 2005). Therefore, the

occurrence of hypo- or hyperventilation depends on the characteristics of the species; cryptic species like S. solea may favour hypoventilation to decrease visibility, while non-cryptic species may favour hyperventilation in order to increase the uptake of oxygen and prepare the fish for escape (Barreto et al., 2003). In this experiment, the freezing S. solea in normoxia show an increase in F_V after stimulation. This may help the fish to recover from the hypoventilation observed at the stimulation and prepare them to respond to any further threats (Barreto et al., 2003, Hawkins et al., 2004). Fishes may indeed change priority in response to a fearful stimulus, such as territorial intrusion (Barreto et al., 2010). Thus the prey can respond in different ways depending on the type of danger that they are facing. Once this danger is identified and classified, the prey will adapt the type of response to the specific type of danger, in order to increase their survival. In freezing S. solea in hypoxia, the F_V measured before stimulation was approximately two-fold higher than in normoxia (Fig. V.1). A higher $F_{\rm V}$ and amplitude are mechanisms that help to compensate for the reduction in oxygen availability to limit hypoxemia (e.g. Maxime et al., 2000; Pichavant et al., 2002). The S. solea in hypoxia did not show any difference between pre and post-stimulus F_V values. This could be related to various factors such as a smaller change in $F_{\rm V}$ at stimulation compared to normoxic fish, the existence of upper limits to $F_{\rm V}$, and/or differences in energy prioritization compared to normoxic fish (Perry et al., 2009).

Subtle prey movements may be easily detected by predators (Burrows & Gibson, 1995). Consequently, freezing, by combining immobility and hypoventilation, can be considered an effective anti-predator behaviour. Hypoxia significantly reduced the amplitude of hypoventilation in soles exposed to a startling stimulus. Specifically, it was measured a X% higher values of F_V during hypoxia than in normoxia, which were about 40 beats min⁻¹ (Fig. V. 1). In hypoxia, F_V may not be sufficiently low to ensure crypsis of S. solea in the presence of predators. This suggests that hypoxia may increase vulnerability to predation in S. solea. Further work using startling stimulation in hypoxia and normoxia in the presence of real predators would be needed to test this hypothesis. From an ecological point of view, however, the effect of hypoxia on the vulnerability of S. solea may be difficult to predict when their predators are piscivorous fishes, since hypoxia may also decrease the hunger of the piscivore, as well as their attack performance (Domenici et al., 2007). Nevertheless, the relatively high F_V shown in startled freezing S. solea in hypoxia, and consequent decrease in cryptic capacity is likely to increase their vulnerability to predators insensitive to hypoxia in the water, such as birds. Given that it is unlikely to contribute to crypsis, the functional significance of decreasing $F_{\rm V}$ in startled freezing S. solea in hypoxia is not clear. Perhaps such a minor decrease in F_V may simply correspond to a startle reflex whose adaptive significance as an anti-predator behavior is severely reduced in hypoxia compared to normoxia.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thanks Prineau M., Bayle A., Lan Chow Wing O., for their invaluable help during the experiment. All the experiments were carried out at Ifremer (Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture), Station de La Rochelle, France. This study was financially supported by the project STM, financed by the Italian Ministry for Research (MIUR). This study was conducted under the approval of the Animal Care Committee of France under the official licence of M.L. Bégout (17-010)

V.6. Synthèse

Dans le cinquième chapitre je me suis intéressée au comportement anti-prédateur chez les soles exposées à un niveau sub létale d'hypoxie. J'ai évalué le taux de réponse pour comprendre si en condition d'hypoxie les soles présentaient un pourcentage de réponse d'immobilisation qui augmentait aux dépenses de la réponse de fuite. Nous avons aussi utilisé la fréquence de ventilation comme indicateur physiologique pour évaluer la perception de risque de prédation, et pour évaluer si, en hypoxie, la fréquence de ventilation reste élevée en présence d'un potentiel prédateur.

Les résultats obtenus ont montré qu'en normoxie le taux de réponse de fuite était plus bas comparé aux précédentes études faites sur les poissons nageant dans la colonne d'eau (Lefrançois et al. 2005 ; Lefrançois et Domenici 2006), et qu'il diminuait encore plus en hypoxie. On peut supposer que cette diminution soit une manière de réduire la dépense énergétique liée à l'effort musculaire nécessaire au cours de la reponse de fuite.

En normoxie il est apparu que la simulation de l'attaque d'un prédateur induisait une diminution de la fréquence de ventilation en se rapprochant de zéro. Par contre, en hypoxie, la fréquence de ventilation, avant et après la stimulation, est le double de celle observée en normoxie. En hypoxie, au moment de la stimulation les soles ont diminué la fréquence de ventilation, mais de façon mineure par rapport aux soles testées en hypoxie.

On peut donc supposer que même si le niveau d'hypoxie testé n'est pas létal pour les soles, maintenir une fréquence de ventilation élevée va diminuer la capacité cryptique des soles et par conséquent augmenter leur vulnérabilité face à l'attaque du prédateur.

CHAPITRE VI -

La contamination par polluants organiques influence-t-elle la tolérance hypoxique et thermique chez la sole commune (Solea solea L. 1758)?

VI.1. Introduction générale

Dans le chapitre III, les effets d'une contamination aux PCB à court terme (1 à 2 mois) ont été évalués sur le métabolisme aérobie et, ce, en normoxie, ainsi qu'en conditions limitantes d'hypoxie. Nous n'avons pas observé d'effets sur le métabolisme aérobie maximal. Par contre une augmentation du métabolisme de maintenance a été remarquée associée à une élévation de la concentration critique en oxygène O_{2crit} . A travers leurs effets sur l' O_{2crit} , nous avons suggéré que l'exposition aux PCB était susceptible de limiter la tolérance à l'hypoxie chez les juvéniles de sole commune.

L'oxygène est considéré comme un facteur limitant puisqu'il réduit le taux métabolique maximal de l'animal (Figure VI. 1, Fry 1971). Au cours d'une hypoxie, la plupart des téléostéens maintiennent constant leur niveau métabolique de routine à travers des mécanismes optimisant l'apport en oxygène comme la régulation de la fréquence et/ou de l'amplitude ventilatoire (e.g. Randall 1982). Lorsque ces régulations ne sont plus suffisantes, le métabolisme de l'organisme est limité et diminue avec la teneur en oxygène, étant ainsi soumis à un déséquilibre métabolique mettant en danger sa survie (Steffensen 2007). L'animal passe alors d'un état « d'oxy-regulator », à un état « d'oxy-conformer ». A chaque niveau de métabolisme correspond une concentration en oxygène limitante à laquelle l'organisme 'bascule' d'un état à l'autre (Lefrançois et Claireaux, 2003). Dans l'étude présentée au chapitre III, les résultats ont suggéré que l'O_{2crit} associée au niveau particulier de métabolisme de maintenance augmentait en réponse à la contamination aux PCB, suggérant une diminution de la tolérance à l'hypoxie.

En utilisant des challenges, les objectifs de l'étude présentée dans ce chapitre étaient donc de tester la tolérance à l'hypoxie chez des soles ayant été exposées aux PCB sur du long terme (i.e. 24 mois). L'effet d'un second xénobiotique a été expérimenté, les HAP, afin d'évaluer une éventuelle similarité des effets relatifs à deux types de polluants organiques. Par ailleurs, le concept de la **tolérance thermique oxygène-dépendante** (Pörtner 2001) suggère que la limite supérieure de la fenêtre thermique soit liée à une limitation de la capacité métabolique aérobie, résultat d'un déséquilibre entre les besoins et les apports en oxygène. En milieu

naturel les poissons contaminés étant également exposés aux effets des variations thermiques, ce facteur a également été pris en compte.

L'hypothèse principale que nous avons testée au cours de ce travail était donc d'évaluer si, au travers d'une élévation du métabolisme de maintenance, la contamination chronique à deux polluants organiques, les PCB et les HAP, induisait une diminution de la tolérance hypoxique et thermique en conditions d'oxygène variables.

Does contamination by organic pollutants influence hypoxia and thermal tolerance in common sole *Solea solea*?

Cannas M¹., Durollet M², Buchet V^{.3}, Le Bayon N.³, Lefrançois C.¹

- 1- Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000, La Rochelle, France;
- 2- Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (FR-EDD), FR 3097, CNRS-Université de La Rochelle- Ifremer, 2 rue Olympe de Gouges, 17000, La Rochelle, France;
- 3- IFREMER, Département Dynamiques de l'Environnement Côtier, Technopole Brest-Iroise, Point du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

VI.2. Introduction

The capacity of an organism to extract oxygen from its environment is key to its survival and its physiological performance. Such capacity was assessed in many fish species through the measurement of the aerobic metabolic scope (AMS). AMS is the difference between the active (or maximum) and the standard (or maintenance) metabolic rates. AMS therefore illustrates the capacity of an organism to supply the oxygen necessary to sustain energy-demanding activities. Activities is intended on a "broad sense" as in Fry (1971), and includes energy-demanding activities at various levels of biological organization, i.e. from cellular, to physiological and whole animal levels. As a consequence, enhanced AMS reduces conflicts in energy-demanding activities and was found, for instance, to be correlated to growth in some species (Claireaux et al. 2000, Mallekh and Lagardère 2002, Claireaux and Lefrançois 2007). Many authors thereby consider AMS as a relevant gauge of physiological performance and, in larger view, as a relevant proxy of fitness (e.g. Priede 1977, 1985, Ware 1982, Miller 1997, Claireaux and Lefrançois, 2007).

AMS is largely driven by environmental factors, among which temperature and oxygen are the most studied (e.g. Schurmann and Steffensen 1992, Claireaux and Lagardère 1999, Lefrançois and Claireaux 2003, Lee et al. 2003, Lafrance et al. 2005). AMS is maximal at a species-specific thermal optimum, below and above which it decreases to become almost nil at a low and high critical temperature (e.g. Fry 1971, Portner and Farrell, 2008; Figure VI.1). Beyond these critical temperatures, energy-demanding activities are mainly sustained by anaerobic metabolism, which allows short term survival in these deleterious thermal conditions. On the other hand, oxygen is considered as a limiting factor since it reduces the animal maximal metabolic rate (Figure VI.1, Fry 1971). Both temperature and oxygen are also categorized as lethal factors, since at extreme values they can induce the organism's death by preventing progress of the metabolic processes.

Environmental-related changes in AMS participate to define the tolerance of a species to the involved factors. The tolerance zone represents the environmental 'arena' within which individuals of a species can survive (Beitinger et al. 2000). Since most of the aquatic organism are ectotherms, temperature was considered to be the 'abiotic master factor' (Brett, 1971) and was the subject of many studies which aimed at assessing environmental tolerance (Fry 1971, Beitinger et al. 2000, Pörtner et al. 2001, 2007, Sommer

& Pörtner 2002, Peck et al. 2004). Eurytherm and stenotherm species were found to be characterized by large and narrow metabolic windows, respectively (e.g. Portner and Farrell, 2008) that illustrate adaptation to a more or less extended range of temperature. For instance, Lee et al. (2003) tested three stocks of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* and one stock of coho salmon *O. kisutch* selected because of the differences in their ambient water temperature (ranging from 5°C to 20°C). The authors demonstrated that active metabolic rate showed optimal temperatures which were species specific. In addition, the range of temperatures allowing elevated active metabolic rate shifted towards more or less warm values depending on the species. Lee et al. (2003) underlined that all these temperature-dependant changes in metabolism were in accordance with the temperatures the different stocks experience in their natural environment.

Because of ongoing climate change, temperature is still at the centre of the debate. However, relevance of 'mono-factor' studies is likely to be limited since human activities induce changes in other environmental factors together with temperature. For instance, hypoxia, by limiting the active metabolic rate, narrows the thermal windows over which a species exhibits its AMS (figure VI.1, e.g. Lefrançois and Claireaux 2003, Schurmann and Steffensen 1997, Chabot and Claireaux 2008, Portner and Farrell, 2008 Wang et al. 2009). Exposure to various pollutants, such as ammonia (Shingles et al. 2001), pesticides (Farrell et al. 1998) or herbicides (Johansen and Geen 1990; Janz et al. 1991) also induces significant variations of aerobic metabolism. Pollutants are for instance expected to increase the fish SMR because of an increasing oxygen supply required to cover costs related to contamination-induced mechanisms, such as the increase of cell metabolism involved in cellular detoxification and repair, or the elevating synthesis of cellular protection proteins (for review Sokolova and Lannig 2008). Any process that induces an increase in SMR is expected to shift the energy balance of the organism and to divert energy from essential functions such as growth or reproduction. Furthermore, increasing SMR means also increasing O_{2 crit}, i.e. the minimal oxygen level necessary to maintain SMR (figure VI.1, Fry, 1948; Steffensen et al. 1994; van den Thillart et al. 1994; Schurmann and Steffensen, 1997; Iversen et al. 2010). Below this particular oxygen level, the maintenance of the metabolic energy balance is compromised. Metabolism shifts from aerobic to anaerobic pathways based on substrates that will become rapidly exhausted, leading to the fish death. Thus, any process that increases the $O_{2\,crit}$ of an individual is likely to limit its hypoxia tolerance and its survival. Therefore, through the related changes in aerobic metabolism, exposure to sub

Chapitre VI

lethal concentrations of xenobiotic is likely to reduce fish energy-demanding physiological performance as well as its tolerance to other environmental changes such as temperature increase and hypoxia. In this context, the objective of this study was to assess both thermal and hypoxia tolerance of common sole *Solea solea* contaminated with two categories of persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and Polychlorinated biphenyls (PCB). PAH and PCB were chosen because of the chronic exposure the fish are susceptible to be exposed to in coastal environments. Thermal tolerance was evaluated in normoxia, as well as in hypoxia in order to assess the combined effects of these factors that are expected to vary concomitantly in nature. Thermal tolerance was assessed in fish coping with increasing temperature following the critical thermal methodology (for review: Beitinger et al. 2000). Hypoxia tolerance was assessed through a similar approach in decreasing oxygen environment.

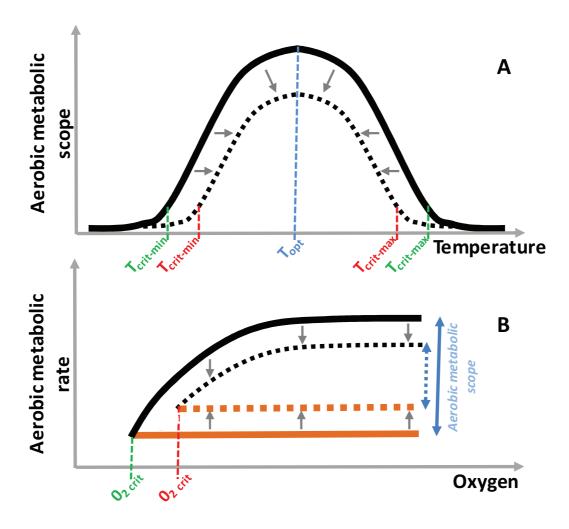


Figure VI.1- Temperature and oxygen-related variations in aerobic metabolic scope (AMS). A- AMS is maximal at a species-specific thermal optimum (- - -) below and above which it decreases to become almost nil at a low and high critical temperature (- - -). Limiting environmental conditions such as hypoxia reduce (\Rightarrow) the active metabolic rate and a decrease in AMS (\blacksquare \blacksquare) is observed. As a consequence the low and the high critical temperatures are increased and reduced respectively (- - - -), which reduces the range of temperature the fish can tolerate. B- At a fixed temperature the maximal aerobic metabolic rate (MO_{2 max} \longrightarrow) decreases with the oxygen level until it reaches the standard metabolic rate (SMR \longrightarrow). The critical oxygen level (O_{2 crit}) was defined as the particular oxygen level at which MO_{2 max} =SMR. Exposition to pollutants may induce both a reduction in MO_{2 max} (\blacksquare \blacksquare) and an increase in SMR (\blacksquare \blacksquare). As a consequence, the fish critical oxygen level is increased (O_{2 crit}), the AMS is reduced (\blacksquare \blacksquare) and the fish tolerance to hypoxia is likely to be decreased.

VI.3 Material & methods

VI.3.1 Animal

Juveniles of common soles, *Solea solea* (n = 144) were obtained from an aquaculture (Solea BV, Ijmuiden, Netherlands). Upon arrival to the laboratory, sole were transferred to indoor rearing thanks (625 l; 250 cm x 250 cm x 100 cm) with filtered sea water in open circuit. The water temperature followed the seasonal variations during which temperature ranged from 12 to 18°C. Fish were fed daily with commercial pellet (0.8% of the body weight; Food DAN- EX1362, Danafree). Feeding was discontinued 24h before any manipulation of the fish. As soon as allowed by a sufficient body mass, each sole was equipped with a pit tag to facilitate its identification.

VI.3.2 Food contamination

In order to simulate the contamination through the trophic pathways the pollutants were artificially added to the commercial pellets (DAN-EX 1362, Dana Feed, Horsens, Denmark) following the protocol described in Eichinger et al. (2010). In view of the very low solubility of the pollutant tested in the water, commercial pellet had to be coated with solvent (iso-octane: 160 ml for every 4 kg of food) before to be incorporated in the food. After coating, the pellets were evaporated under a nitrogen jet to remove the maximum amount of solvent. This procedure was employed to contaminate pellets with an equimolar mix of three PAH (pyrene, benzo[a]pyrene and the fluoranthene) to finally obtain a total concentration ([Σ PAH]) of 5.7 μ g of PAH g⁻¹ of food. The PCB mixture was similar to the mixture employed by Cannas et al. (submitted, chapter III of this manuscript): it contained four congeners of PCB: CB 153, CB 149, CB 105 and CB 118 and the total concentration ([Σ PCB]) was equivalent to the PCB_{low} concentration employed in this study, i.e. 0.6 μ g of PCB g⁻¹ of food.

VI.3.3 Fish contamination

Contamination lasted 2 years. Sole growth rate was regularly assessed all along the experimental period; At the moment of the experiment their final standard length was 22.8±2.7 and the final mass was 174.3±70.5 g (mean±S.D). Fish were contaminated via food pathways. During the contamination period, fish were held in different rearing tanks depending on the treatment they were exposed to. Sole were divided into four groups. A group (PAH, n=38) was fed with pellets containing the mix equimolar of PAH. A group (PCB, n=38) was fed with pellet containing the mix of PCB. A group control (C) was fed with uncontaminated food which contained no solvent (i.e., group Control, n=30). A group was fed with pellets containing only the Solvent (S, n=38) and it was used as a control to assess the effects of the solvent itself. At the end of the contamination period (24 months), the level of accumulated PAH in the sole was assessed by measuring the concentration of hydroxilated metabolites in the bile of the fish. The protocol employed is described in Mazéas and Budzinski (2005) and Le Du (2008). It allowed to assess a total concentration of 637 ng g^{-1} of bile. The concentration of CB153 measured in the liver was found to be 1400 $ng g^{-1}$ of dry weight. The details of the experimental and analytical protocols for the PCB are described in Bodin et al. (2007), Bodiguel et al. (2009) and Eichinger et al. (2010).

VI.3.4 Experimental set-up

Challenges were carried out in a squared tank (100 cm x 100 cm x 80 cm) where water-depth was 50 cm. Temperature was controlled with a thermoregulator (Teco, Italy) and oxygen with a gas-equilibration column. A pump maintained a constant flow from the experimental tank to the gas-equilibration column, where air or nitrogen was insufflated to set normoxic or hypoxic conditions, respectively. Water flowed back in the experimental tank by gravity.

VI.3.5 Hypoxic challenge

Three groups were constituted by a total of 31 to 35 soles. In each group, the number of individuals issued from each of the four treatments was balanced. The three groups were successively challenged. The day before each challenge, fish were transferred in the experimental tank where temperature matched the thermal conditions of acclimatization (13°C) and normoxia was set. Fish were challenged by decreasing progressively the oxygen, i.e. ~ 12 % of air saturation (a.s.) per hour.

VI.3.6 Thermal challenge

Two weeks later, a similar procedure was followed to challenge the sole in a thermal-changing environment. Each group was tested once in two constant conditions of oxygenation: normoxia (i.e. >85 % a.s., groups C_n , S_n , PAH_n and PCB_n) and hypoxia (i.e. 30% a.s., groups C_h , S_h , PAH_h and PCB_h). Successive challenges were separated by at least 3 days. In both cases, (i) at the moment of the transfer in the experimental tank, oxygen was set to normoxia, and temperature matched the thermal conditions of acclimatization (13°C), (ii) fish were challenged by increasing progressively temperature (~ 2°C. h⁻¹). For the groups C_n , S_n , PAH_n and PCB_n, normoxia was maintained all along the thermal challenge. On the contrary, before challenging the groups C_h , S_h , PAH_h and PCB_h, oxygenation was progressively dropped to 30 % a.s. in ~30 min and was then maintained at this level during the whole thermal challenge.

Whatever the type of challenge the sole were exposed to, as soon as an individual lost equilibrium, it was gently caught, identified (by reading the pit-tag), weighted and placed in a recovery tank where normoxia and temperature of acclimatization were set.

VI.3.7 Variables

When a fish lost equilibrium, the temperature at which it occurred was defined as the critical thermal maxima (CT_{max} , Beitinger et al. 2000). The temperature at which 50% of the tested individuals have lost equilibrium was assessed and defined as CT_{max-50} . This variable was employed as an indicator of the sole thermal tolerance. An identical approach was

employed to assess hypoxia tolerance. The level of oxygen ($O_{2 \text{ min}}$) at which a fish lost equilibrium was recorded. The oxygen level at which it have occurred for 50% of the individuals was defined as the $O_{2 \text{ min-50}}$.

VI.3.8 Statistical analysis

Distribution of each variable (CT_{max} and $O_{2\ min}$) was described using box-and-whisker plots for which the smallest observation, the lower quartile, the median, the upper quartile and the largest observation were illustrated. CT_{max-50} and $O_{2\ min-50}$ were evaluated as the median of their respective distribution. Regarding the tolerance in hypoxia, assessed through $O_{2\ min-50}$, an ANOVA test was used to analyse treatment differences (control C, solvent S, PCB-contaminated PCB, PAH-contaminated PAH). The effects of treatment and oxygen level (normoxia versus hypoxia) on CT_{max-50} were assessed with a two-way ANOVA (Zar, 1984). The level of statistical significance was set to p < 0.05.

VI.4 Results

Following the challenge, fish rapidly recovered as soon as conditions of preset acclimatization were restored. No fish died during the experiments.

VI.4.1 Hypoxic challenge

Independently of the treatment, sole lost equilibrium between 3 and 9% of air saturation. Even if $O_{2 \text{ min-}50}$ tended to be lower in the control, no significant difference was revealed among the four treatments (ANOVA, F=1.178, p=0.377, Figure VI.2).

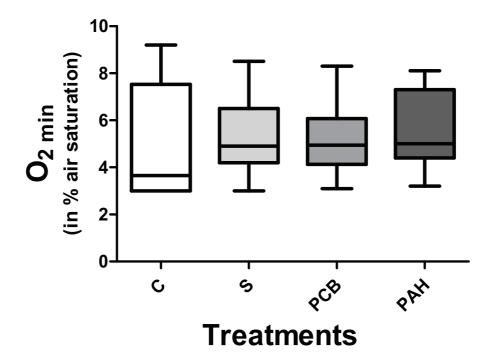
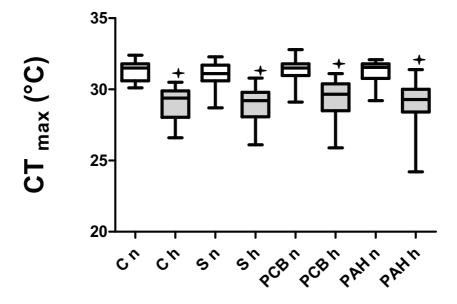


Figure VI.2 Hypoxia tolerance. Minimum level of oxygen (O_{2-min}) at which sole lost equilibrium. Four treatments were tested: uncontaminated control sole (C) and individuals fed with pellets containing solvent (S), polychlorinated biphenyl (PCB) or polycyclic aromati hydrocarbon (PAH).

VI.4.2 Thermal challenge

While exposed in normoxia, sole lost equilibrium at a CT_{max} ranging from 28.7 to 32.8°C (mean \pm S.D.: 31,3 \pm 0,1) whatever the treatment (Figure VI.3). On the other hand, range of CT_{max} was more extensive in hypoxia (i.e. from 24.2 to 31.4°C, mean \pm S.D.: 29,0 \pm 0,1) and was spread over lower values. CT_{max-50} did not show any significant difference among the treatments (two-way ANOVA, F=0.119, p=0.947). A significant effect of oxygen was found (two-way ANOVA, F=21.88, p<0.0001) independently of the treatment the sole were exposed to (two-way ANOVA, F=0.162, p=0.921 for the interaction term).



Treatments

Figure VI.3. Thermal tolerance. Critical thermal maxima (CTmax) in control sole (C) and in individuals fed with pellets treated with solvent (S), polychlorinatedbiphenyl (PCB) or polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Sole were exposed to a thermal challenge in normoxia (n) or in hypoxia (h). For a given treatment, + indicates significant difference between CTmax-50 assessed in normoxic and hypoxic conditions.

VI.5 Discussion

The aim of this study was to test in common sole if contamination by persistent organic pollutants (i.e. PCB and PAH) induced modifications in their thermal and hypoxia tolerance and, more particularly, if critical thermal maxima and oxygen level at which they lose equilibrium increase. No significant effect of contamination treatments was observed neither on hypoxia nor thermal tolerance, while thermal tolerance was significantly reduced in hypoxic conditions.

The concept of oxygen-limited thermal tolerance in aquatic ectotherms suggests that the upper limit of thermal windows is set by limitations in aerobic scope due to a mismatch between oxygen demand and supply capacities (e.g. Pörtner 2001, Sokolova and Lannig 2008). Decreasing availability of oxygen in water is therefore expected to widen this phenomenon, and thereby to accelerate hypoxemia and to reduce the maximal temperature a fish can tolerate. The 2.2° C-difference in CT_{max-50}

observed between sole exposed to normoxia and hypoxia is in accordance with this concept. Lefrançois and Claireaux (2003) modelled SMR, AMR and AMS as a function of temperature and oxygen in common sole. According to this model, the predicted temperature at which AMS becomes nil was 28°C in normoxia and 24°C at 30% a.s. (i.e. at the experimental hypoxia tested in the present study). These values are in accordance with the CT_{max} we assessed, since they match the lowest limit of the corresponding thermal ranges (i.e. [28.7; 32.8] and [24.2; 31.4] in normoxia and hypoxia respectively). Furthermore, Lefrançois and Claireaux (2003) estimated that, above the optimal thermal value, the sole AMR progressively decreased to become nil at 30.5°C that was defined as the maximal temperature for AMR. It is worth noticing that this value is also in accordance with the values assessed in the present study (i.e. CT_{max-50}= 31.3°C), which illustrates the close relationships between temperature and oxygen-induced changes in aerobic metabolism and the tolerance to these environmental factors.

On the other hand, contamination to PAH or PCB was found to have no effect on the tolerance whatever the tested environmental constraints (i.e. decreasing oxygen at a fixed temperature, increasing temperature in normoxia and increasing temperature in hypoxia). The fact that hypoxia tolerance was similar in PCB-contaminated individuals and control group mismatches the results of the study by Cannas et al. (submitted, chapter III of this PhD manuscript). These authors investigated metabolic regulations in juvenile of sole contaminated to PCB and found an upward trend in both SMR and the associated critical oxygen level. The minimal oxygen level necessary to maintain SMR being raised, the PCB-contaminated soles would have been sooner limited when facing a progressive hypoxia. One of the main reasons for this discrepancy between this expected pattern and the present observation may be the difference in the protocol of contamination followed in the two studies. Adult sole used for the present experiment were exposed to a PCB concentration, as well as a thermal regime, that were lower (i.e. $0.6~\mu g$ of PCB $g^{\text{-1}}$ of food, seasonal thermal variations within the range [12-18°C]) than in the previous study (i.e. 2.2 µg of PCB g⁻¹ of food and a constant 20°C-temperature; Cannas et al. submitted, chapter III). Although the difference in period of contamination (24 months versus 2 months) the level of PCB contamination was consequently similar in both studies, ranging between ~1400 and ~1783 ng of PCB g⁻¹ of dry weight in the liver. It is likely that a

similar hepatic concentration of PCB in the tenfold-heavier adults may have limit the expected increase in both SMR and critical oxygen level in comparison to the juvenile tested by Cannas et al. (submitted, chapter III). Furthermore, we cannot exclude that during the 24 months of contamination, growing sole may have developed some adaptive mechanisms which reduce potential effects of PCB exposure. For instance, oxygen acquisition may have been optimized in response to the potential PCB-related increase in oxygen needed to maintain SMR. Oxygen extraction and capacity to deliver oxygen to the tissues/organs is indeed known to be enhanced through mechanisms such as variations in gill surface, frequency and/or amplitude of ventilation, blood Hb-O₂ binding affinity or cardio-respiratory regulations (Randall 1982, Daxboeck et al. 1982, Mandic et al. 2009, Gamperl and Driedzic 2009; Farrel and Richards 2009). However, no additional findings allowed us to go further in the discussion.

To summarize, contrary to PAH or PCB contamination, hypoxia significantly reduced thermal tolerance. In the context of global climate change, hypoxia is therefore likely to influence the survival and the distribution of the common sole contrary to the persistent organic pollutants we tested. In addition, interferences with aerobic metabolism seem to participate to the physiological basis regulating this tolerance. However, the present study gives only an insight of the interactions between the three factors tested. Effects of xenobiotic depend for instance on many factors such as the type of exposure and the duration. The numerous studies on metals exposure allowed to put in light a controversial pattern of the effects on aquatic organisms (for review Sokolova and Lannig 2008), and a similar picture could be expected regarding exposure to persistent organic pollutants. Furthermore, the sole tested were acclimated to normoxia and a fixed temperature before to be challenging. As suggested by Beitinger et al. 2000, thermal tolerance may be expected to be dependent of the pretest acclimation temperature.

Therefore further investigations are required to build a general view of how thermal and hypoxia tolerance may be modulated by others factors, such as xenobiotics. For instance, the establishment of tolerance polygons over a large range of acclimation temperature may be a relevant basis for further studies, such as done in the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus* (Bennett and Beitinger 1997). In

Chapitre VI

parallel, it could be interesting to carry out detailed studies on aerobic metabolism (e.g aerobic metabolic scope, energy allocation) to investigate more extensively the participation of the bioenergetics limitations to the organism tolerance when facing multiple environmental stressors.

VI. 6. Synthèse

Les résultats on montré que la contamination chronique sur du long terme (24 mois) par les polluants organiques tels que les PCB et les HAP, ne réduisait ni la tolérance à l'hypoxie ni la tolérance thermique. Au contraire, la tolérance thermique s'est trouvée significativement réduite en condition d'hypoxie. Le fait que les soles contaminées présentent la même tolérance à l'hypoxie que les soles *contrôle* n'est pas en accord avec les conclusions émanant des résultats exposés précédemment (Cannas et al. soumis, chapitre III). Une des explications possibles peut résider dans les différences de protocoles utilisés dans les deux expérimentations. Les soles utilisées pour cette expérimentation ont été exposées à une concentration de PCB, ainsi qu'à un régime thermique inférieur (12-18°C) à l'étude précédente (§ III.2.2).

Il en est résulté des niveaux de concentration hépatique en PCB semblables dans les deux études (~1400 et ~1783 ng de PCB g⁻¹ de poids sec), alors qu'il s'agissait d'adultes dans cette étude, et de juvéniles dans le premier cas. Donc, nous pouvons supposer un effet moindre relativement à la masse corporelle et /ou une mise en place de mécanismes réduisant l'effet toxique des PCB au cours du développement des soles participant au maintien du métabolisme de maintenance, et donc une absence de besoins supplémentaires en oxygène.

Il est intéressant de noter que le niveau de contamination auquel ont été exposées les soles adultes est proche des observations faites *in situ* en Baie de Seine, et donc plus extrapolable au milieu naturel que les études menées chez les juvéniles. Les résultats présents suggèreraient donc que ni les PCB ni les HAP testés n'influenceraient la tolérance, et par conséquent la distribution, des soles communes dans un environnement variable en température et en oxygène.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Etant donné la forte productivité des zones côtières, elles sont utilisées comme nourriceries par de nombreuses espèces de téléostéens au cours de leur phase juvénile. Parmi ces zones, la côte française est reconnue comme étant une des plus importantes nourriceries pour la sole commune *Solea solea*. Cependant, les zones côtières présentent une variabilité élevée des facteurs physico-chimiques (e.g. température, oxygène, pH, salinité), ainsi qu'une détérioration plus ou moins importante de la qualité du milieu, causée par l'introduction de xénobiotiques tels que les PCB, ainsi qu'une eutrophisation qui résult souvent en des baisses d'oxygéne dessous (hypoxie).

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient de répondre à des questions concernant la physiologie et le comportement de juvéniles de la sole commune, face à des contraintes environnementales comme l'exposition aux PCB et l'hypoxie. L'intérêt de cette étude était d'évaluer si les juvéniles de sole, pendant cette période très vulnérable de leur vie, étaient influencés par cet environnement très variable au travers de dysfonctionnements de fonctions biologiques déterminantes pour leur croissance, leur survie et, donc, pour leur fitness.

Pour répondre à ces questions, j'ai étudié les effets induits par une contamination chronique à un mélange de 4 congénères de PCB et/ou par une exposition à des conditions sub létales d'hypoxie. Les effets ont été évalués à deux niveaux d'organisation biologique : l'organisme et l'organe.

Une approche de respirométrie a été utilisée pour étudier les effets d'une exposition par voie trophique à des concentrations sub-létales de PCB sur la capacité métabolique et la tolérance à l'hypoxie des juvéniles de sole commune. Nos résultats ont suggéré que pour les niveaux de contamination testés, l'exposition aux PCB sur une période de 2 mois n'affectait ni l'AMR, ni l'AMS. Si les soles présentent le même niveau de capacité métabolique après exposition aux PCB, cela suggère que l'allocation d'énergie vers les processus physiologiques tend à être constante. Par conséquent, les soles exposées aux PCB ne devraient pas présenter de réduction de leurs activités demandeuses en énergie comme la locomotion, la digestion ou la croissance, et donc maintenir leur probabilité de survie face aux facteurs de stress de l'environnement (Priede 1985; Evans 1990).

Cette absence d'effet sur la capacité métabolique est en accord avec les résultats concernant le taux de croissance obtenus au cours du projet ANR SoleBemol dont ma thèse fait partie. Dans ce projet, ont été utilisés trois types de contaminants en tant que représentants des contaminants organiques présents dans les soles échantillonnées dans la Baie de Seine: les PCB, les HAP et les polybromodiphényléthers (PBDE). Le taux de croissance a été évalué sur des soles exposées expérimentalement à chacun de ces polluants sur une période allant jusqu'à 24 mois. Les résultats ont montré une diminution significative de la croissance après une contamination de 18 mois et ce, uniquement chez les mâles contaminées aux PCB ou aux HAP en comparaison avec les soles non contaminées. Chez les soles non contaminées mais sans que cette différence ne soit significative. On peut supposer que l'absence de diminution de croissance chez les femelles soit liée à une plus faible contamination provoquée par le transfert de contaminants dans les œufs (Sundberg et al. 2007; Bodiguel et al. 2009). Les analyses ont montré que ce transfert était congénère-spécifique, et particulièrement important pour les congénères CB 105 et CB 118.

L'étude menée par Davoodi et Claireaux (2007) sur la même espèce exposée à une contamination aiguë aux HAP a montré une diminution du métabolisme maximal associée à un ralentissement de la croissance. La différence de réponse avec les résultats présentés dans cette thèse est très probablement liée à la différence de polluant et de type d'exposition. Les HAP étaient en effet présents en phase soluble dans l'eau. Les poissons étaient ainsi exposés aux polluants principalement à travers les branchies, ayant comme conséquence une réaction d'irritation et une augmentation du mucus limitant la diffusion branchiale de l'oxygène (Claireaux et al. 2005). Il est à noter également que ces expérimentations étaient réalisées chez l'adulte. Dans notre étude, les effets des PCB se sont révélés seulement après 60 jours d'exposition à la plus haute concentration (2239 ng PCB g-1 de nourriture); les soles présentaient alors un métabolisme de maintenance tendant à augmenter. L'augmentation du SMR a pu être la conséquence de la mise en place de processus participant à la détoxification des cellules. Richards (2011) souligne que la dépense énergétique majeure au niveau cellulaire est liée au processus de synthèse des protéines, estimée équivalente à 55% du métabolisme de maintenance. Or, les résultats issus du projet SoleBemol ont mis en évidence l'activation de gènes pour la production d'une protéine impliquée dans le transport

extracellulaire des polluants au niveau intestinal (l'ATP-binding cassette, subfamily B, member 1(ABCB1)). Rowe (1998) a montré que l'exposition aux métaux lourds (i.e. As, Cd, Cu, Ni, Pb et Se) entrainait une modification de l'allocation énergétique chez la crevette *Palaemonetes paludosu*, notamment liée à une augmentation du métabolisme de maintenance. Cette augmentation de la dépense énergétique serait provoquée par (i) la réparation des dommages induits par la contamination au niveau cellulaire et subcellulaire, (ii) la production des protéines de stress ou encore (iii) la mise en œuvre de processus de détoxication et d'élimination des éléments toxiques. Un résultat similaire a été révélé par Lannig et al. (2006), qui ont montré que l'exposition au Cd chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* induisait une augmentation du métabolisme de maintenance, reflétant une augmentation de coût de détoxication, ainsi que la mise en place de mécanismes de protection et réparation cellulaire. Ces auteurs soulignent que dans le contexte du changement climatique, la survie de cette espèce est menacée par l'interaction entre la pollution et la température à travers les effets sur la capacité métabolique aerobie.

Associée à l'accroissement du SMR, une augmentation de la concentration critique en oxygène (O_{2crit}) a été observée. L'élévation de l' O_{2crit} illustre le besoin supplémentaire en oxygène nécessaire au maintien du métabolisme et des activités de l'individu. Au cours d'une hypoxie progressive, les individus avec une O_{2crit} élevée sont ainsi plus rapidement limités pour extraire suffisamment d'oxygène pour maintenir leur SMR, devant alors faire face à une détresse physiologique plus marquée. Richards (2011) a ainsi conclu que, d'une manière générale, les espèces présentant une faible O_{2crit} étaient caractérisées par une tolérance accrue à l'hypoxie.

On pourrait alors s'attendre à une diminution de la tolérance à l'hypoxie chez les soles qui ont été contaminées aux PCB sur une période d'au moins 60 jours. Or, des challenges hypoxiques effectués sur des soles contaminés aux PCB pendant 24 mois n'ont mis en évidence aucune différence significative par rapport aux individus *contrôle* (chapitre VI). Aucune explication claire n'a pu être retenue quant à ces résultats. Toutefois, les contaminations en PCB atteintes restent faibles relativement à la masse des poissons, ce qui pourrait limiter les effets éventuels de ces xénobiotiques. Nous ne pouvont pas exclure non plus que les effets métaboliques potentiels chez les soles contaminées sur le long terme (24 mois) aient pu être compensés au cours de la croissance et du développement de ces individus par la mise en place de mécanismes optimisant l'extraction de l'oxygène dans

l'eau. Il est intéressant de souligner que les soles contaminées aux HAP présentent également une tolérance à l'hypoxie similaire aux individus *contrôle* (chapitre VI). La tolérance à la température n'a pas non plus été modifiée par l'exposition à ces polluants organiques, alors qu'elle est diminuée en hypoxie (chapitre VI). L'effet de l'hypoxie apparaît ainsi prévalant à celui des xénobiotiques testés. Dans le contexte du réchauffement global, les variations de la teneur en oxygène seraient ainsi plus susceptibles de participer aux processus de sélection de l'habitat chez la sole commune que les polluants organiques tels que les PCB ou le HAP. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que la nourricerie du Golfe de Gascogne est caractérisée par une augmentation de 0,26°C par décennie depuis les années 1970 (Goikoetxea et al. 2009), ainsi que des événements hypoxiques au cours desquels la teneur en oxygène s'abaisse jusqu'à 20% de saturation en air (i.e. à un niveau inférieur aux conditions hypoxiques testées dans l'étude présentée au chapitre VI).

Au contraire du cœur des mammifères, celui des poissons présente une forte capacité à répondre aux perturbations, comme à un changement de température, une hypoxie, un effort physique intense, tant à court terme qu'à long terme; on parle alors de plasticité cardiaque (Gamperl et Farrell 2004). Dans le chapitre IV de ma thèse, je me suis ainsi intéressée à évaluer *in vitro* les performances cardiaques suite au stress induit par la contamination chronique aux PCB, afin d'évaluer si la plasticité cardiaque pouvait être affectée chez les soles contaminées.

Nos résultats ont montré que la contamination à la plus haute concentration en PCB (2239 ng PCB g⁻¹) ne semblait pas affecter la force de contraction aux basses fréquences de stimulation. Par contre, lorsqu'il est exposé à une stimulation majeure (1,6 Hz), le ventricule présente une diminution significative de la force de contraction en comparaison des soles non contaminées. Les soles contaminées seraient alors limitées pour faire face à une forte sollicitation cardiaque comme cela se produit au cours d'un effort intense.

L'effet des PCB sur la force de contraction ne s'est donc exprimé qu'à certains niveaux de stimulation. On pouvait alors se demander si les mécanismes de régulation cellulaire impliqués ne dépendaient pas à la fois de la contamination et de la sollicitation cardiaque. Parmi les ions qui sont impliqués dans le travail du cœur, le Ca²⁺ est considéré comme le plus important (Vornanen et al. 2002). Il est en effet indispensable dans les processus de contraction et de relaxation du cœur. Grâce à l'utilisation de la RYA, il a été

possible de discriminer la provenance du Ca²⁺ : soit de l'extérieur en passant par les canaux calciques du sarcolemme, soit du RS. Comme cela est décrit au § II 4.3, le RS présente un rôle clé dans le couplage excitation-contraction, et sa participation est observée chez les soles dans certaines conditions. Nos résultats ont montré qu'indépendamment de l'adrénaline utilisée pour stimuler les ventricules, l'administration de la RYA révélait une participation active du RS à la plus basse des fréquences testées (0,2Hz) que ce soit chez les individus sains ou pour ceux contaminés aux PCB. Il est intéressant de remarquer que chez les soles contaminées, l'implication du RS est aussi présente à la fréquence physiologique de 0,5Hz, suggérant une plasticité cardiaque permettant de maintenir une force de contraction similaire à celle des individus non contaminés. Au contraire, cette plasticité disparaît à la fréquence de stimulation plus élevée (1,6Hz), ce qui est en accord avec la diminution significative de la force de contraction en comparaison soles non contaminées (chapitre IV; Figure IV.2). On peut alors supposer que chez les soles contaminées aux PCB une participation plus élevée du RS devient nécessaire, et que celle-ci est suffisante pour maintenir une contraction normale du cœur lorsqu'il n'est pas trop fortement sollicité. Toutefois, lorsqu'un travail cardiaque majeur est requis, la participation du RS ne suffit plus à assurer une fonctionnalité normale.

Il est également légitime de se demander ce qui peut-être à l'origine de l'augmentation de la participation du RS. De précédentes études ont montré que la contamination chronique à différents polluants induisait une hypertrophie des myocytes, comme chez le rat suite à une exposition aux organophosphorés (Calore et al. 2007). L'hypertrophie des myocytes provoque l'augmentation de la distance de diffusion du Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule, entre le sarcolemme et les myofibrilles (Figure II.9). Les cellules cardiaques des téléostéens se caractérisent par leur faible épaisseur (de 5 µm à 8 µm en moyenne pour la carpe et la truite respectivement) en comparaison des cellules de mammifères (32 µm environ chez le rat et le lapin) (Vornanen et al. 2002). Il est généralement admis que cette différence d'épaisseur pourrait expliquer l' importance moindre du RS chez les vertébrés inférieurs, puisque le calcium externe nécessaire à la contraction a une distance à parcourir dans le cytoplasme plus faible pour atteindre les protéines contractiles que dans les cardiomyocytes de mammifères où le RS sert de « relais ». Or, l'idée que le RS participerait peu au couplage excitation-contraction chez le poisson a été remise en question ces dernières années. Elle serait en particulier fonction des paramètres environnementaux (i.e. température) et de l'espèce (niveau d'activité du poisson,

pour revue Shiels et al. 2002). La participation du RS plus importante dans le cœur de soles contaminées pourrait être le résultat d'une hypertrophie des cellules résultant d'une modification de l'homéostasie générale (perturbation hydrominérales par l'action du cortisol) et d'une sur-sollicitation de cet organe. En l'occurrence, l'expression plus importante du RS dans des cellules hypertrophiées permettrait de maintenir une force de contraction équivalente à celle observée chez les soles *contrôle*. Par contre, lorsque la fréquence augmente (1,6 Hz), le délai entre les stimulations devientrait trop court pour permettre la participation du RS en absence de potentialisation adrénergique. Néanmoins pour pouvoir tester ce type d'hypothèse, des études au niveau cellulaire seraient nécessaires.

Outre une activité physique intense, la sollicitation du travail cardiaque augmente avec la température. Une étude récente a montré une augmentation régulière de la température de l'eau que dans le Golfe de Gascogne (Goikoetxea et al. 2009), notamment utilisé comme nourricerie par les juvéniles des soles (Le Pape 2003). Les organismes aquatiques y vivants se retrouvent donc à devoir faire face à une élévation progressive de la température, pouvant aussi être associée à des épisodes hypoxiques qui se révèlent de plus en plus fréquents (Methling et al. 2010). Les poissons sont ainsi soumis à un état de stress constant qui requiert une optimisation des performances cardiaques. Cependant, même si le schéma général reste incomplet, nos résultats suggèrent que l'exposition aux PCB nécessite que les cellules cardiaques conservent une plasticité optimale. Or, on peut s'interroger sur l'effet de changements climatiques sur la plasticité phénotypique des tissus.

Sur la base des résultats obtenus (Chapitres III et IV), nous avons mis en évidence que, dans l'ensemble, la contamination chronique aux PCB (durant 60 jours) n'affectait pas de façon drastique la capacité métabolique aérobie ni les performances cardiaques des juvéniles de sole. Seuls quelques effets disséminés ont été observés, comme une modification du métabolisme de maintenance et de la plasticité cardiaque. Par ailleurs, l'étude menée chez les adultes suggère que la contamination aux PCB ou aux HAP n'influence ni la tolérance thermique ni la tolérance à l'hypoxie (Chapitre VI).

Le fait de ne pas observer d'effets plus marqués pourrait être lié au type de protocole utilisé pour la contamination. Tout d'abord, il est important de souligner que le niveau de contamination des soles exposées pendant une période de 60 jours à la concentration plus basse en PCB a permis d'atteindre expérimentalement des niveaux des contamination proches de ceux mesurés dans la Baie de Seine sur des individus d'âge similaire. Toutefois,

nous avons pu remarquer que c'est aux plus hauts niveaux de contamination, atteints suite à l'exposition à la plus haute concentration de PCB, qu'ont pu être observés les réponses chez les fonctions physiologiques que nous avons testées. D'après les résultats obtenus, il serait donc intéressant d'évaluer l'effet d'une exposition à plus long terme, sur des individus plus âgés qui, nous le supposons, auraient atteint des niveaux de contamination plus élevés. Même si les challenges menés sur les soles adultes n'ont révélé aucun effet, il serait tout de même intéressant d'évaluer les effets d'une contamination sur du plus long terme (> 2 ans) du point de vue des performances métaboliques et cardiaques. Des mécanismes de régulation permettant le maintien de la tolérance aux facteurs environnementaux, comme l'oxygène et la température, pourraient être ainsi révélés.

Il est également important de noter que le choix des congénères utilisés dans cette étude est en accord avec les analyses faites dans le cadre du projet Sole Bemol sur des soles prélevées dans la Baie de la Seine, considérée comme la zone française la plus contaminée par ces polluants (Abarnou et al. 2001). Cependant, les congénères utilisés ne sont pas parmi les plus toxiques se trouvant dans le milieu naturel. Parmi les 209 congénères de PCB, 10 ont été identifiés comme étant les plus toxiques (Falandysz et al. 1994). Ces composés ont une toxicité semblable à celle du polychlorodibenzo-p-dioxine (PCDD). Ils sont capables de se lier au récepteur Ah (récepteur Aryl d'hydrocarbure) et d'induire des réactions biologiques et toxiques similaires à la dioxine. Les quatre congénères choisis dans notre étude sont classés comme des congénères non-coplanaires ayant des substitutions en position *ortho*, et sont considérés moins toxiques puisque ils n'ont pas cette affinité pour le récepteur Ah. Parmi les 4 congénères utilisés dans notre expérimentation, seuls le CB 118 et le CB 105 figurent parmi les dix congénéres les plus toxiques mentionnés précédemment (Falandysz et al. 1994).

Dans le chapitre V nous nous sommes intéressés à une autre fonction qui joue aussi un rôle essentiel pour la survie et la fitness des soles : le comportement anti-prédateur. Les soles sont caractérisées par une flexibilité de ce comportement ; face à l'attaque d'un prédateur, elles peuvent présenter une réponse de fuite qui leur permet de s'éloigner du prédateur, ou une réponse d'immobilisation. Tout facteur perturbant ces comportements est susceptible d'influencer les interactions proie-prédateur. En testant l'effet de l'oxygène, nous avons pu mettre en évidence que, conformément à plusieurs études précédentes (Lefrançois et al. 2005; Lefrançois et Domenici 2006), le taux de réponse de fuite des soles

diminuait en conditions d'hypoxie, augmentant ainsi la fréquence d'observation des réponses d'immobilisation.

Par ailleurs, la réponse d'immobilisation des soles était accompagnée de variations de fréquence de ventilation qui différaient en fonction de la teneur en oxygène du milieu. A notre connaissance, notre travail est le premier montrant que, lors d'une stimulation d'attaque par un prédateur, la fréquence de ventilation de la proie potentielle se réduisait. En normoxie, un arrêt respiratoire, illustré par une fréquence de ventilation réduite à zéro, est observé. Au contraire, lorsque les soles sont exposées à l'hypoxie, et bien qu'elles présentent également une diminution de leur fréquence de ventilation, il n'y a pas d'arrêt respiratoire proprement dit (Figure V.1). Ainsi, avant, pendant et après la stimulation, la fréquence de ventilation chez les soles testées en hypoxie reste toujours plus élevée qu'en normoxie. A travers ses effets sur la fréquence de ventilation, l'hypoxie réduit ainsi les capacités cryptiques des soles les rendant de ce fait plus visibles aux prédateurs. Face à un prédateur, l'hypoxie provoque donc un accroissement des réponses d'immobilisation, tout en augmentant la probabilité de détection, et donc d'attaque de la proie. Cela suggère, que bien qu'ils ne provoquent pas la mort par détresse respiratoire, les niveaux sub létaux d'hypoxie sont en mesure d'influencer la probabilité de survie des juvéniles de soles.

Toutefois, dans le milieu naturel, les interactions proie-prédateur dépendent aussi du type de prédateur considéré. Par exemple, si le prédateur est de type téléostéen, il est exposé aux mêmes conditions d'oxygénation que la proie, et on peut supposer qu'en hypoxie la fréquence des attaques diminue. Parmi les raisons possibles, il y a la diminution de l'appétit du prédateur généralement observée en hypoxie (e.g. chez le turbot *Scophthalmus maximus*, Pichavant et al. 2000 ; le bar moucheté *Morone saxatilis*, Brandt et al. 2009 ; la truite arc-enciel *Oncorhynchus mykiss*, Glencross 2009 ; la morue *Gadus morhua*, Chabot et Dutil 1999). Parmi les différents prédateurs de la sole, certains sont au contraire indépendants des caractéristiques d'oxygénation du milieu aquatique ce qui est le cas pour les prédateurs aériens. On peut supposer que le type de réponse anti prédateur (fuite *versus* immobilisation) puisse aussi dépendre du type de prédateur rencontré. Par exemple, si on considère un prédateur aérien, les poissons plats en s'immobilisant sont susceptibles de diminuer leur probabilité de détection. Mais si le prédateur utilise une détection plus tactile que visuelle, comme par exemple le grondin *Prionotus evolans* (Manderson et al. 1999), dans ce cas, la réponse de fuite semblerait être plus appropriée. Il serait ainsi pertinent d'évaluer le taux de

Conclusion générale

survie de juvéniles de soles en présence de divers types de prédateurs et de différentes conditions d'oxygénation afin d'estimer la « valeur » adaptative des différents types de comportements anti-prédateur observés chez cette espèce.

Par ailleurs d'après les résultats obtenus sur le métabolisme aérobie (chapitre III), nous avons pu remarquer une augmentation du métabolisme de maintenance chez les soles exposées à la plus forte concentration en PCB. Nous pourrions alors supposer que cette augmentation du métabolisme de maintenance soit associée à une élévation de la fréquence de ventilation pour assurer une assimilation d'oxygène plus importante. La contamination aux polluants pourrait ainsi avoir des effets similaires à l'hypoxie chez les individus soumis à la pression de prédation. Des investigations supplémentaires seront nécessaires afin d'évaluer le *pattern* de fréquence de ventilation au moment de l'attaque d'un prédateur chez des individus contaminés, afin d'estimer le degré de perturbation de leurs capacités de mimétisme.

Bibliographie

A

Abarnou, A. and Loizeau, V. (1994). La bioaccumulation: l'exemple des PCB. *Oceanis 20*, 29–45

Abarnou A., Loizeau V., Jaouen-Madoulet A., Le Guellec A.M. (2001) Contaminants in marine foodwebs. Actes colloques, Bordeaux Aquaculture, mars 2001 Publication INRA.

Abarnou, A. and Simon, S. (1986). Contamination de l'estuaire et de la baie de Seine par les PCBs. *In La baie de Seine, Groupe de recherches coordonnées Manche (Greco Manche), Actes de colloques No. 4. Ifremer, Université de Caen,* 471-476.

Abarnou, **A.**, (2010). Utilisation d'espèces halieutiques exploitées comme indicateurs de lacontamination chimique en zone littorale. http://archimer.fr/doc/00014/12475/.

Ahlborg, U. G., Becking, G. C., Birnbaum, L. S., Brouwer, A., Derks, H., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J. C., Liem, A. K. D. et al. (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs: Report on WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. *Chemosphere* 28, 1049-1067.

Aho, E. and Vornanen, M. (1999). Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of thermal acclimation. *Journal of Experimental Biology* **202**, 2663-2677.

Alderdice, D.F., Brett, J.R. (1957). Some effects of kraft mill effluent on young Pacific salmon. *Journal of Fishery Research Board Canada* **14**, 783–795.

Amara, R., Desaunay, Y. and Lagardere, F. (1994). Seasonal variation in growth of larval sole *Solea solea* (L.) and consequences on the success of larval immigration. *Netherlands Journal of Sea Research.* 32, 287-298.

Amara, R., Laffargue, P., Dewarumez, J.M., Maryaniak, C., Lagardere, F. and Luczac, C. (2001). Feeding ecology and growth of O-group flatfish (sole, dab and plaice) on a nursery ground (Southern Bight of the North Sea). *Journal of Fish Biology* **58**, 788–803.

Andersen, A. K., Schou, J., Sparrevohn, C.R., Nicolajsen, H. and StØttrup, J.G. (2005). The quality of release habitat for reared juvenile flounder, Platichthys flesus, with respect to salinity and depth. *Fisheries Management and Ecology* **12**, 211–219.

Andersson, T. and Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* 24, 1-19

Axelsson, M., Ehrenstrom, F. and Nilsson, S. (1988). Cholinergic and adrenergic influence on the teleost heart in vivo. *Journal of Experimental Biology.* **46**, 179-186

\mathcal{B}

- **Bailey, J. R. and Driedzic, W.R.** (1990). Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology* **149**, 239-254.
- **Barreto, R. E., Luchiari, A. C. and Marcondes, A. L.** (2003). Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behavioural Processes* **60**, 235-239.
- Barron, M., Carls, M.G., Heintz, R. and Rice, S.D. (2004). Evaluation of fish early life stage toxicity models of chronic exposure embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicological Sciences* **78**, 60-67.
- **Barton**, **B. A.** (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 517–525.
- Beck, M.W., Heck, K.L., Able, K.W., Childers, D.L., Eggleston, D.B., Gillanders, B.M., Halpern, B., Hays, C.G., Hoshino, K., Minello, T.J. et al. (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51, 633-641.
- **Beitinger, T.L., Bennett, W.A &. McCauley, R. W.** (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* **58,** 237–275.
- **Bennett, A. F.** (1980). The metabolic foundations of vertebrate behavior. *BioScience* **30**, 452-456.
- Bennett, W. A. and Bettinger, T. L. (1997). Temperature tolerance of the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Copeia* 1, 77-87.
- Bers, D.M., Bridge, J.H., Spitzer, K.W. (1989).Intracellular Ca²⁺ transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes.The *Journal of Physiology*, 417, 537-553.
- **Bilberg, K., Malteb, H., Wang, T., Baatrup, E.,** (2010). Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96, 159–165.
- **Blake, R. W.** (2004). Fish functional design and swimming performance. *Journal of Fish Biology* **65**, 1193-1222.
- **Blank, J. M., Morrissette, J. M., Davie, P. S. and Block, B. A.** (2002). Effects of temperature, epinephrine and Ca²⁺ on the hearts of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). The *Journal of Experimental Biology* **205**, 1881-1888
- Blank, J. M., Morrissette, J. M., Landeira-Fernandez, A. M., Blackwell, S. B., Williams, T. D. and Block, B. A. (2004). In situ cardiac performance of Pacific bluefin

- tuna hearts in response to acute temperature change. *The Journal of Experimental Biology* **207**, 881-890.
- Bodiguel X., Tronczyński J., Loizeau V., Munschy C., Guiot N., Le Guellec A.M., Olivier N., Roupsard F., Mellon C. (2008). Classical and novel organohalogen compounds (PCBs and PBDEs) in hake (*M. merluccius*, L.) from Mediterranean and Atlantic coasts (France). WIT Trans. Ecol. Environ 110, 157-166.
- Bodiguel, X., Maury, O., Mellon-Duval, C., Roupsard, F., Le Guellec, A. M. and Loizeau, V. (2009). A dynamic and mechanistic model of PCB bioaccumulation in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Sea Research* **62**, 124-134.
- **Borlakoglu, J.T., Haegele, K.D.** (1991). Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs. Comparative Biochemestry and Physiology. C, 100(3), 327-338.
- **Boon, J.P., Oudejans, R.C.H.M, Duinker, J.C.** (1984). Kinetics of individual polychlorinated biphenyl (PCB) components in juvenile sole (Solea solea) in relation to their concentrations in food and to lipid metabolism. *Comparative Biochemestry and Physiology C*: **79**(11), 131-142.
- Borgå, K., Gabrielsen, G.W. and Skaare, J.U. (2001). Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution* **113**, 187-198.
- **Bouchet, V.M.P., Debenay J.-P, Sauriau P.-G., Radford-Knoery, J. and Soletchnick, P.** (2007). Effects of short-term environmental disturbances on living benthic foraminifera during the Pacific oyster summer mortality in the Marennes-Oleron Bay (France). *Marine Environmental Research.* **64**, 358-383.
- **Brainerd, E., Page, B. and Fish, F**. (1997). Opercular jetting during fast start by flatfish. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1179-1188.
- Brandt, S. B., Gerken, M., Hartman, K. J. and Demers, E. (2009). Effects of hypoxia on food consumption and growth of juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **381**, S143–S149.
- Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Randall, D.J. and Val, A.L. (1995). Air breathing in the armored catfish (*Hoplosternum littorale*) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulfide rich waters. *Canadian Journal of Zoology* **73**, 739–744.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M. and Jones, K.C. (2002). Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners -- a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *The Science of The Total Environment* **290**, 181-198.
- **Brett, J.R.** (1971). Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockey salmon (*Onchorhynchus nerka*). *American Zoology* **11**, 99-113.

- **Brett, J. R. and Groves, T. D. D.** (1979). Physiological energetics. In *Fish Physiology*, vol. VIII (ed. W. S. Hoar, Randall, D. J. & Brett, J. R., eds), pp. 279-352. New York: Academic Press.
- Bridge, J.H.B., Spitzer, K.W., and Ershler, P.R. (1988). Relaxation of isolated ventricular cardiomyocytes by a voltage-dependent process. *Science* **241**, 823-825.
- **Brown, Grant E. and Smith, Jan F. (1998).** Acquired predator recognition in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): conditioning hatchery-reared fish to recognize chemical cues of a predator. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55** (3). pp. 611-617.
- **Bucheli, T. D. and Fent, K.** (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical reviews in environmental science and technology* **25**, 201-268.
- **Burleson, M.L. & Smatresk, N.J.** (1990a). Effects of sectioning cranial nerves IX and X on cardiovascular and ventilatory reflex responses to hypoxia and NaCN in channel catfish. *Journal of Experimental Biology* **154,** 407–420.
- **Burleson, M.L. & Smatresk, N.J.** (1990b). Evidence for two oxygen-sensitive chemoreceptor loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiological Zoology* **63**, 208–221.
- **Burleson, M.L., Smatresk, N.J. & Milsom, W.K**. (1992). Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. *Pp. 389–426 in W.S. Hoar, D.J. Randall, and A.P. Farrell, eds. Fish Physiology. Vol. XIIB. Academic Press, New York.*
- **Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D. and Ishaq, R.** (2004). Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere* **55**, 1043-1052
- **Bullock, T. H. (1984).** Comparative neuroethology of startle, rapid escape, and giant fiber-mediated responses. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, edited by R. C. Eaton. New York: Plenum, p. 1–13.



- Calore, E. E., Perez, N. M. and Herman, M. M. (2007). Morphometric studies of cardiac miocytes of rats chronically treated with an organophosphate *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**, 447-450.
- Calow, P., Forbes, V.E. (1998). How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comprative Biochemestry and Physiology* A120, 11–16.

- Cannon, W. B. (1929). Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. *Boston: Branford*.
- Caro, T. M., Graham, C. M., Stoner, C.J. & Vargas, J.K. (2004). Adaptive significance of antipredator behaviour in artiodactyls. *Animal Behaviour* 67, 205-228.
- **Chabot, D. and Dutil, J.-D.** (1999). Reduced growth of atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology* **55**, 472-491.
- Chabot, D., Dutil, J.-D. and Couturier, C. (2001). Impact of chronic hypoxia on food ingestion, growth and condition of Atlantic cod (*Gadus morhua*). In *ICES Annual Science Conference 89th Statutory Meeting, Theme session on Growth and Condition in Gadoid Stocks and Implications for Sustainable Management (V). ICES*, pp. 1–17 Copenhagen, Denmark.
- **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
- Chapman, L.J., Chapman, C.A., Nordlie, F.G. and Rosenberger, A.E. (2002). Physiological refugia: swamps, hypoxia tolerance and maintenance of fish diversity in the Lake Victoria region. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **133**, 421-437.
- **Chapman, L. J., McKenzie, D. J.** (2009). Behavioral responses and ecological consequences. In *Fish Physiology : Hypoxia*, vol. 27 eds. J. Richards A. Farrel and C. Brauner). pp. 25-77. San Diego: Elsevier.
- **Chau, K.W.** (2006). Persistent organic pollution characterization of sediments in Pearl River estuary. *Chemestry* 64(9), 1545-1549.
- **Cicero, M., Finoia, MG., Gabellini, M., Veschetti, E**. (2000). Concentration and distribution of persistent organic pollutants (POPs) in harbor dredging sediments: a pilot study using a statistical approach for a more efficient characterization and management. Environmental Monitoring Assessement **64**, 607–616.
- Claireaux, G. and Lagardere, J. P. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* 42, 269-280.
- Claireaux, G. and Lefrançois, C. (2007). Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**, 2031-2041.
- Claireaux, G., McKenzie, D.J., Genge, A.G., Chatelier, A.I., Aubin, J.I. and Farrell, A. P. (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout, *Journal of Experimental Biology* **208**, 1775-1784.
- Claireaux, G., Webber, D. M., Kerr, S. R. and Boutilier, R. G. (1995). Physiology and behaviour of free-swimming atlantic cod (*Gadus morhua*) facing fluctuating temperature conditions. *Journal of Experimental Biology* **198**, 49-60.

Claireaux, G. and Davoodi, F. (2010). Effect of exposure to petroleum hydrocarbons upon cardio-respiratory function in the common sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 98, 113-119.

Cooke, S. J., Steinmetz, J., Degner, J., Grant, E. and Philipp, D. (2003). Metabolic fright response of different-sized largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to two avian predators show variation in non lethal energetic costs. *Canadian of Journal Zoology* **81**, 699-709.

Cooke, S.J., Hinch, S.G., Farrell, A.P., Lapointe, M.F., Jones, S.R.M., Macdonald, J.S., Patterson, D.A., Healey, M.C., and Van Der Kraak, G. (2004). Abnormal migration timing and high en route mortality of sockeye salmon in the Fraser River, British Columbia. *Fisheries* 29, 22–33.

Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J. et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253-260.

Crawshaw, L. I. and O'Connor, C. S. (1997). Behavioural compensation for long-term thermal change. In *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish(Wood, C. M., and McDonald, D. G., Eds.)*. pp. 351-376. Cambridge, UK: Cambridge University Press

\mathcal{D}

DallaVia, J., van denThillart, G., Cattani, O. and Cortesi, P. (1998). Behavioural response and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology* **76**, 2108-2113.

DallaVia, J., van denThillart, G., Cattani, O. and deZwaan, A. (1994). Influence of long term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*.II. Intermediary metabolism in blood lever and muscle *Marine Ecology* **111**, 17-27.

Danis, B., Bustamante, P., Cotret, O., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W. and Warnau, M. (2005a). Bioaccumulation of PCBs in the cuttlefish *Sepia officinalis* from seawater, sediment and food pathways. *Environmental Pollution* **134**, 113-122.

Danis, B., Cotret, O., Teyssié, J.-L., Bustamante, P., Fowler, S.W. and Warnau, M. (2005b). Bioaccumulation of PCBs in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: seawater and food exposures to a 14C-radiolabelled congener (PCB#153). *Environmental Pollution* **135**, 11-16.

Davoodi, F. and Claireaux, G. (2007). Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea. Marine Pollution Bulletin* **54**, 928-934.

Daxboeck, C., Davie, P. S., Perry, S. F. and Randall, D. J. (1982). Oxygen Uptake in a Spontaneously Ventilating, Blood-Perfused Trout Preparation. *The Journal of Experimental Biology* **101**, 35-45.

- **Diaz, R. J.** (2001). Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality* **30**, 275-281.
- **Diaz, R. J. and Rosenberg, R.** (1995). Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. In *Oceanography and Marine Biology an Annual Review*, vol. 33, pp. 245-303. London: U C L Press Ltd.
- **Diaz, R. J., Nestlerode J and Diaz, M.L.** (2004). A global perspective on the effects of eutrophication and hypoxia on aquatic biota. *In G. L. Rupp and M. D. White (eds.), Proceedings of the 7th International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Session One 02 Oct 2006 Rabalais et al. 32 Quality, Tallinn, Estonia, May 12-15, 2003. EPA 600/R-04/049, U.S. Environmental Protection Agency, Ecosystems Research Division, Athens, Georgia., 1-33.*
- **Diaz, R. J. and Rosenberg, R.** (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* **321**, 926-929.
- **Domenici, P. and Batty, R. S.** (1997). Escape behaviour of solitary herring (*Clupea harengus*) and comparison with schooling individuals. *Marine Biology* **128**, 29-38.
- **Domenici, P. and Blake, R.** (1997). The kinematics and performance of fish fast start swimming. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1165-1178.
- **Domenici, P., Steffensen, J.F. and Batty, R.S.** (2000). The effect of the progressive hypoxia on swimming activity and schooling in Atlantic herring. *Journal of Fish Biology* **57**, 1526-1538.
- **Domenici, P.** (2002). The Visually Mediated Escape Response in Fish: Predicting Prey Responsiveness and the Locomotor Behaviour of Predators and Prey. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **35**, 87 110.
- **Domenici, P., Lefrancois, C. and Shingles, A.** (2007). Hypoxia and the antipredator behaviours of fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **362**, 2105-2121.
- **Driedzic, W. R.** (1983). The fish heart as a model system for the study of myoglobin. *T. Comparative Biochemestry and Physiology* Part A **76**, 487-493.
- **Duthie, G. G.** (1982). The respiratory metabolism of temperature adapted flatfish at rest and during swimming activity and the use of anaerobic metabolism at moderate swimming speed. *Journal of Experimental Biology* **97**, 359-373.
- **Dutil, J.D., Sylvestre, E.L., Gamache, L., Laroque, R., Guderley, H.** (2007). Burst and coast use, swimming performance and metabolism of Atlantic cod *Gadus morhua* in sublethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology* **71**, 363–375.

 ${\mathcal E}$

Eaton, R. C. and Hackett, J. T. (1984). The role of Mauthner cells in fast-starts involving escape in teleost fish. In *Neural Mechanisms of Startle Behavior* (ed. R. C. Eaton), pp. 213–266. New York: Plenum Press.

Edwards, R. (1971). The polychlorobiphenyls, their occurrence and significance: a review. *Chemistry and Industry* **47** 1340-1348.

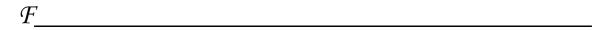
Eichinger, M., Loizeau, V., Roupsard, F., Le Guellec, A.M., Bacher, C. (2010). Modelling growth and bioaccumulation of Polychlorinated biphenyls in common sole (*Solea solea*). *Journal of Sea Reasearch* **64**, 373–385.

Eisler, R. and Belisle, A.A. (1996). Planar PCB hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. *Contaminant hazard review*.

Ellard, C. and Byers, R. (2005). The influence of the behaviour of conspecifics on responses to threat in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Animal Behaviour* 70, 49–58.

Ellis, T., Howell, B. R. and Hughes, R. N. (1997). The cryptic responses of hatchery-reared sole to a natural sand substratum. *Journal of Fish Biology* **51**, 389-401.

Evans, D. (1990). Metabolic thermal compensation by rainbow trout: effects on standard metabolic rate and potential usable power. *Transactions of the American Fisheries Society* **119**, 585 – 600



Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **245**, C1-C14.

Falandysz, J., Tanabe, S. and Tatsukawa, R. (1994). Most toxic and highly bioaccumulative PCB congeners in cod-liver oil of Baltic origin processed in Poland during the 1970s and 1980s, their TEQ-values and possible intake. *The Science of The Total Environment* **145**, 207-212.

Farrell, A.P. (1984) A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. *Canadian Journal of Zoology*. vol. **62**, n°4, pp. 523-536

Farrell, A.P. and Jones, D.R. (1992). The heart. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell, Editors, *Fish Physiology*, vol. XIIA, Academic Press, San Diego (1992), pp. 1–88.

Farrell, A.P. (1996). Features heightening cardiovascular performance in fishes with special reference to tunas. *Comparative Biochemestry and Physiology* **113A**, 61–7.

Farrell, A.P., Gamperl, A.K. and Bitwell, I.K. (1998). Prolonged swimming, recovery and repeated swimming performance of mature sockeye salmon *Onchorynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. *Journal of Experimental Biology* **201**, 2183-2193.

- **Farrell, A.P.** (2007). Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**, 2017-2030.
- **Farrell, A.P. and Richards, J.** (2009). Defining hypoxia: an integartive synthesis of the responses of fish to hypoxia. In *Fish Physiology : Hypoxia*, vol. 27 eds. J. Richards A. Farrel and C. Brauner): Elsevier.
- **Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., & Lagardere, J.P.** (2006). Impact of acute cadmium exposure on the trunk lateral line neuromasts and consequences on the "C-start" response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Aquatic Toxicology* **76**, 278–294.
- **Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A. and Tronczynski, J.** (1997). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* **34**, 857-867.
- **Fingerman, S. and Russell, L.** (1980). Effects of the polychlorinated biphenyl aroclor 1242 on locomotor activity and on the neurotransmitters dopamine and norepinephrine in the brain of the gulf killifish *Fundulus grandis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **25**, 682-687.
- **Fingerman, S.W. and Short, E.C.** (1983). Changes in neurotransmitter levels in channel catfish after exposure to benzo(a)pyrene, naphthalene, and Aroclor 1254. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **30**, 147-151.
- Fritsche, R. and Nilsson, S. (1989). Cardiovascular response to hypoxia in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology* **48**, 153-160.
- **Fry, F.E.J.** (1947). Effects of the environmental on animal activity. *Univ. Toronto Stud. Biol.* **55**, 1-62.
- Fry, F.E.J. et Hart J.S (1948). The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish. *Biological Bulletin* **94**, 66-77.
- **Fry, F.E.J.** (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. *In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds), Environmental Relations and Behavior (VI). Academic Press, New York*, 1–98.
- Fuiman, L. A., Rose, K. A., Cowan Jr, J. H. and Smith, E. P. (2006). Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relation to laboratory measures of performance. *Animal Behaviour* 71, 1389-1399.



Gamperl, A. K., Vijayan, M. M. and Boutilier, R. G. (1994).Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. Reviews in *Fish Biology and Fisheries*, vol. 4 N° 2, 215-255

- **Gamperl, A. K. and Farrell, A. P.** (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *Journal of Experimental Biology* **207**, 2539-2550.
- Gamperl, A. K., Driedzic, W. R., Richards, J. G., Farrell, A. P. and Brauner, C. J. (2009). Cardiovascular Function and Cardiac Metabolism. In *Fish Physiology*, vol. 27, pp. 301-360: Academic Press.
- **Gibson, R. N.** (1994). Impact of habitat quality and quantity on the recruitment of juvenile flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research* **32**, 191-206.
- Giles, W. and Shibata, S. (1981). Autonomic transmitter actions on cardiac pacemaker tissue: a brief review. *Federation Proceedings* **40**, 2618-2624.
- Giovane, A., Greco, G., Maresca, A., and Tota, B. (1980). Myoglobin in the heart ventricle of tuna and other fishes. *Experientia* **36**, 219-220.
- **Glencross, B. D.** (2009). Reduced water oxygen levels affect maximal feed intake, but not protein or energy utilization efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* **15**, 1-8.
- Godin, J.-G. J. and Valdron Clark, K. A. (1997). Risk-taking in stickleback fishes faced with different predatory threats. *Ecoscience* 4, 246-251.
- Goikoetxea, N., Borja, Á., Fontán, A., González, M. and Valencia, V. (2009). Trends and anomalies in sea-surface temperature, observed over the last 60 years, within the southeastern Bay of Biscay. *Continental Shelf Research* **29**, 1060-1069.
- **Goksøyr, A.** (1995). Cytochrome P450 in marine mammals: isozyme forms, catalytic functions, and physiological regulations. In *Developments in Marine Biology* **4**, 629-639.
- **Goksøyr, A. and Förlin, L.** (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* **22**, 287-311.
- Gooding, R. G., Neill ,W.H., and Dizon, A.E. (1981). Respiration rates and low-oxygen tolerance limits in skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Fishery Bulletin US* **79**, 31-48.
- Gollock, M. J., Currie, S., Petersen, L.H. and Gamperl, A. K. (2006). Cardiovascular and haematological responses of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to acute temperature increase. *The Journal of Experimental Biology* **209**, 2961-2970
- **Graham, J.B.** (1997). Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity, and Adaptation. San Diego: Academic Press; 299 pp.
- Grimes, A. C., Erwin, K. N., Stadt, H. A., Hunter, G. L., Gefroh, H. A., Tsai, H.-J. and Kirby, M. L. (2008). PCB 126 exposure disrupts zebrafish ventricular and branchial but not early neural crest development. *Toxicological Sciences* **106**, 193-205.
- **Guderley, H. and Portner, H.O.** (2010). Metabolic power budgeting and adaptive strategies in zoology: examples from scallops and fish. *Canadian Journal of Zoology* **88**, 753-763.

\mathcal{H}

- **Hahn, M.E. and Stegeman, J.J.** (1994). Regulation of Cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **127**, 187-198.
- Harper, A.A., Newton, I.P. and Watt, P.W. (1995). The effect of temperature on spontaneous action potential discharge of the isolated sinus venosus from winter and summer plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Experimental Biology* **198**, 137-140.
- **Hartzell, H. C.** (1988). Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **52**, 165-247.
- Hawkins, L. A., Armstrong, J. D. and Magurran, A. E. (2004). Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *Journal of Fish Biology* **65**, 88-100.
- Helyar, S.G., Patel, B., Headington, K., Assal, M.E., Chatterjee, P.K., Pacher, P. and. Mabley, J.G. (2009). PCB-induced endothelial cell dysfunction: Role of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical Pharmacology*, 78, 959-965.
- Henry, T. R., Spitsbergen, J. M., Hornung, M. W., Abnet, C. C. and Peterson, R. E. (1997). Early Life Stage Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Zebrafish (Danio rerio). *Toxicology and Applied Pharmacology* **142**, 56-68.
- **Herbert, N. and Steffensen, J.** (2005). The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Marine Biology* **147**, 1403-1412.
- **Herbert, N. and Steffensen, J. F.** (2006). Hypoxia increases the behavioural activity of schooling herring: A response to physiological stress or respiratory distress? *Marine Biology* **149**, 1217-1225.
- **Hicks, D.B., DeWitt, J.W.,** (1971). Effects of dissolved oxygen on kraft pulp mill effluent toxicity. *Water Research* **5**, 693–701.
- **Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J. and Land, S.C.** (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack, vol. 93, pp. 9493-9498.
- Hoekstra, P.F., O'Hara, T.M., Fisk, A.T., Borgå, K., Solomon, K.R. and Muir, D.C.G. (2003). Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environmental Pollution* 124, 509-522.

Hoffman, D.J. (2003). Handbook of Ecotoxicology. CRC, Boca Raton, FL, USA

Holloway, G., Sibly, R. and Povey, S. (1990). Evolution in toxin-stressed environments. *Functional ecology* **4**, 289-294.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D. and Fortin, R. (1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C. and Chevalier, G. (1992). Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and Mercury. *Arch. Environmental Contamination and Toxicology* **22**, 278-283.

Hughes, G.M. (1973). Respiratory responses to hypoxia in fish. *American Zoology* **13**, 475-489.

Huntingford, F.A., Metcalfe, N.B., & Thorpe, I.E. (1988). Choice of feeding station in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, parr: effects of predation risk, season and life history strategy. *Journal of Biology* **33,** 917-924.

Incardona, J. P., Carls, M., Day, H., Sloan, C., Bolton, J., Collier, T. K. and Scholz, N. (2009). Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasi*) exposed to crude oil during weathering. *Environmental Science & Technology* **43**, 201-207.

Ishibashi, Y., Kotaki, T., Yamada, Y. and Ohta, H. (2007). Ontogenic changes in tolerance to hypoxia and energy metabolism of larval and juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **352**, 42-49.

Iversen, N., McKenzie, D., Malte, H. and Wang, T. (2010). Reflex bradycardia does not influence oxygen consumption during hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **180**, 495-502.

(7
J	/

Janz, D.M., Farrell, A.P., Morgan, J.D. and Vigers, G.A. (1991). Acute physiological stress responses of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to sublethal concentrations of garlon 4®, garlon 3a® and vision® herbicides. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**, 81-90.

Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A.M., Loizeau, V., Leboulender, F. (2000). Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar

polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Journal of Chromatography*. A 886, 153-173.

Jensen, S. (1966). Report of a new chemical hazard. New Scientist 32:612.

Jeremiason, J.J., Eisenreich, S.J., ,Paterson, M.J., Findlay, D., Kling, H.J., Beaty, K., Hecky, R. and Elser, J. (1999). Biogeochemical cycling of atmospherically-derived PCBs in lakes of variable trophic status: a paired lake experiment. *Limnology and Oceanography* 44, 889-902.

Jo, S. H., Choi, S. Y., Kim, K. T. and Lee, C. O. (2001). Effects of Polychlorinated biphenyl 19 (2,2', 6-trichlorobiphenyl) on contraction, Ca[2+] transient, and Ca[2+] current of cardiac myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. vol. 38, n°1, pp. 11-20

Johansen, J.A. and Geen, G.H. (1990). Sublethal and acute toxicity of the ethylene glycol butyl ether ester formulation of triclopyr to juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **19**, 610-616.

Jonsson, A. and Carman, R. (2000). Distribution of PCBs in sediment from different bottom types and water depths in Stockholm Archipelago, Baltic Sea. *Ambio* 29, 277-281

Johnsson, J., Hojesjo, J. and Fleming, I. A. (2001). Behavioural and heart rate responses to predation risk in wild and domesticated Atlanite salmon. *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences* **58**, 788-794.

Jordan A.D., Steffensen, JF. (2007). Effects of Ration Size and Hypoxia on Specific Dynamic Action in the Cod *Physiological and Biochemical Zoology* **80**(2):178–185.



Kalmaz, E.V. and Kalmaz, G.D. (1979). Transport, distribution and toxic effects of polychlorinated biphenyls in ecosystems: Review. *Ecological Modelling* **6**, 223-251.

Kannan, K., Yasunaga, Y., Iwata, H., Ichihashi, H., Tanabe, S. and Tatsukawa, R. (1995). Concentrations of heavy metals, organochlorines, and organotins in horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, from Japanese coastal waters. Archives of Environmental *Contamination and Toxicology* **28**, 40-47.

Keen, J. E., Aota, S., Brill, R. W., Farrell, A. P. and Randall, D. J. (1995). Cholinergic and adrenergic regulation of heart rate and ventral aortic pressure in two species of tropical tuna, *Katsuwonus pelamis* and *Thunnus albacares*. *Canadian Journal Zoology*. **73**, 1681–1688.

Kennedy, C. J. and Walsh, P. J. (1997). Effects of temperature on xenobiotic metabolism. *In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), Global Warming - Implications for Freshwater and Marine Fish. Cambridge University Press*, pp. 303-324.

Kerr, R.A. (1990). Global warming continues in 1989. Science 247, 4942: 521

Kraemer, L. D. and Schulte, P. M. (2004). Prior PCB exposure suppresses hypoxia-induced up-regulation of glycolytic enzymes in *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **139**, 23-29.

 \mathcal{L}

Lafrance, P. Castonguay, M., Chabot, D., Audet, C. (2005). Ontogenetic changes in temperature preference of Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* **66**, 553-567

Lannig, G., Bock, C., Sartoris, F.J. and Pörtner, H.O. (2004). Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L. studied by magnetic resonanceimaging and online venous oxygen monitoring. *American journal of physiology-regulatory integrative and comparative physiology*, **287**, R902-R910.

Lannig, G., Flores, J.F. and Sokolova, I.M. (2006). Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology* **79**, 278-287.

Laurent, P. (1962). Contribution a l'étude morphologique et physiologique de l'innervation du coeur des Teleosteens. *Archives d'*anatomie *microscopique et de morphologie expérimentale 51, suppl.*

Le Du, M. (2008). Etude des phénomènes de bioaccumulation/biotrasformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques; Relation exposition genotoxicité, vol. Thèse d'Université, pp. 377: Université de Bordeaux 1.

Lee, C.G, Farrell, A.P., Lotto, A., MacNutt, M.J., Hinch, S.G., Healey, M.C. (2003). The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks. *Journal of Experimental Biology.* 206, 3239-3251.

Lefevre S., Do Thi Thanh Huongb, Wang T., Nguyen Thanh Phuongb and Bayley, M (2011) Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology Volume 158, Issue 2, pp 207-214.

Lefrançois, C., Shingles, A. and Domenici, P. (2005). The effect of hypoxia on locomotor performance and behaviour during escape in Liza aurata. *Journal of Fish Biology* **67**, 1711-1729.

Lefrançois, C. and Claireaux, G. (2003). Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart in the common sole *Solea solea*. *Marine Ecology Progress Series* **259**, 273-284.

Lefrancois, C, and Domenici P. (2006). Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., exposed to hypoxia. Heidelberg, ALLEMAGNE: Springer

- Lehmler, H.-J., Robertson, L. W., Garrison, A. W. and Kodavanti, P. R. S. (2005). Effects of PCB 84 enantiomers on [3H]-phorbol ester binding in rat cerebellar granule cells and 45Ca2+-uptake in rat cerebellum. *Toxicology Letters* **156**, 391-400.
- Le Pape, O., Holley, J., Guérault, D. and Désaunay, Y. (2003). Quality of coastal and estuarine essential fish habitats: estimations based on the size of juvenile common sole (*Solea solea* L.). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **58**, 793-803.
- **LeRoy, K.D., Thomas, P. and Khan, I.A.** (2006). Thyroid hormone status of Atlantic croaker exposed to Aroclor 1254 and selected PCB congeners. *Comparative Biochemistry and Physiology* **144**, 263-271.
- **Lillywhite, H.B., Zippel. K.C., Farrell, A.P.** (1999).Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A 124, 369-382.
- Lind, J. and Cresswell, W. (2005). Determining the fitness consequences of antipredation behavior. *Behavioral Ecology* 16, 945-956
- Lipiatou, E., Tolosa, I., Simo, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S., Sicre, M. A., Bayona, J. M., Grimalt, J. O., Saliot, A. et al. (2007). Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean sea. *Deep-Sea Research II* 4 881–905.
- Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.M. and Menesguen, A. (2001). A model of PCB bioaccumulation in the sea bass food web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Marine Pollution Bulletin* 43, 242-255.
- **Loneragan, N.R. and Bunn S.E.** (1999). River flows and estuarine ecosystems: implications for coastal fisheries from a review and a case study of the Logan River, southeast Queensland. *Australian Journal of Ecology* **24**, 431-440.
- **Long, E. R. 2000.** Degraded sediment quality in U.S. estuaries: a review of magnitude and ecological implications. *Ecological Applications* 10,338–349.
- **Loonen, H., Van De Guchte, C., Parsons, J.R., De Voogt, P. and Govers, H.A.J.** (1996). Ecological hazard assessment of dioxins: Hazards to organisms at different levels of aquatic food webs (fish-eating birds and mammals, fish and invertebrates). *Science of The Total Environment* **182**, 93-103.
- **Lowe, C. and Davidson W.** (2005). Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. *Journal of Fish Biology* **67**, 752–766.
- **Lyng, G.D., Seegal, R.F.** (2008). Polychlorinated biphenyl-induced oxidative stress in organotypic co-cultures: Experimental dopamine depletion prevents reductions in GABA. *NeuroToxicology.* **29(2)**, 301-308

α			
\mathcal{M}			

- Macgregor, K., Oliver, I. W., Harris, L. and Ridgway, I. M. (2010). Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: Current levels and temporal trends. *Environmental Pollution* **158**, 2402-2411.
- Manderson, J. P., Phelan, B. A., Bejda, A. J., Stehlik, L. L. and Stoner, A. W. (1999). Predation by striped searobin (*Prionotus evolans*, Triglidae) on young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum): examining prey size selection and prey choice using field observations and laboratory experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **242**, 211-231.
- Mandic, M., Sloman, K. A. and Richards, J. G. (2009a). Escaping to the surface: a phylogenetically independent analysis of hypoxia-induced respiratory behaviors in sculpins. *Physiological Biochemical Zoology* 82, 703-738.
- **Marchand** M. (1989). Les PCB dans l'environnement marin. Aspects biochimiques d'apports et de distribution. Cas du littoral français. *Journal of Water Science* 2, 373-403.
- Mariottini, M., Corsi, I. and Focardi, S. (2006). PCB levels in European eel (*Anguilla anguilla*) from two coastal lagoons of the Mediterranean. *Environmental Monitoring and Assessment* 117, 519-528.
- **Marsh, A. G., Cohen, S. and Epifanio, C. E.** (2001). Larval energy metabolism and physiological variability in the Asian shore crab Hemigrapsus sanguineus. *Marine Ecology. Progres Serie* **218**, 303-309.
- Martinez -Porchas M., Martinez Cordova, LR, and Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4, 158-178.
- Marty G.D., Hose J.E., McGurk M.D., Brown E.D., Hinton, D.E. (1997). Histopathology and cytogenetic evaluation of Pacific herring larvae exposed to petroleum hydrocarbons in the laboratory or in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Canadian Journal of Fish Aquatic Science 54, 1846-1857.
- Maxime, V., Nonnotte, G., Peyraud, C., Williot, P. and Truchot, J.-P. (1995). Circulatory and respiratory effects of an hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respiatory Physiology* **100**, 203-212.
- Maxime, V., Nonnotte, G., Williot, P. (1998). Adaptations respiratoires et circulatoires de l'esturgeon sibérien à une hypoxie environnementale. *Bulletin Française de la Pêche et de la Pesciculture* 350-351.
- Maxime, V., Pichavant, K., Boeuf, G. and Nonnotte, G. (2000). Effects of hypoxia on respiratory physiology of turbot, Scophthalmus maximus. *Fish Physiological Biochemestry* **22**, 51-59.
- **Mazéas, O. and Budzinski, H.** (2005). Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**, 985-990.

- McKenzie, D. J., Pedersen, P. B. and Jokumsen, A. (2007). Aspects of respiratory physiology and energetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) families with different size-at-age and condition factor. *Aquaculture* **263**, 280-294.
- McKenzie, D. J., Campbell, H. A., Taylor, E. W., Andrade, M., Rantin, F. T., Abe, A. S. (2007a). The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air-breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *Journal of Experimental Biology* **210**, 4224–4232.
- McNatt, R. A. and Rice, J. A. (2004). Hypoxia-induced growth rate reduction in two juvenile estuary-dependent fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**, 147-156.
- Mendola, P., Buck, G.M., Sever, L.E., Zielezny M., Vena J.E. (1997). Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *American Journal of Epidemiology* 146(11), 955-960
- **Mendonça P.C., Gamperl, A.K.** (2009). Nervous and humoral control of cardiac performance in the winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *The Journal of Experimental Biology* **212**, 934-944
- Mercier C., Axelsson M., Imbert N., Claireaux G., Lefrancois C., Altimiras J., Farrell A.P. (2002). In vitro cardiac performance in triploid brown trout at two acclimation temperatures. *Journal of Fish Biology*. **60**, 117-133.
- Mesquita, F.O. & Young, R.J (2007). The behavioural responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*) to anti-predator training. *Applied Animal Behaviour Science* **106**, 144–154.
- Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. and Thorpe, J. E. (1987). The influence of predation risk on the feeding motivation and foraging strategy of juvenile Atlantic salmon. *Animal Behaviour* **35**, 901-911
- Methling, C., Aluru, N., Vijayan, M. M. and Steffensen, J. F. (2010). Effect of moderate hypoxia at three acclimation temperatures on stress responses in Atlantic cod with different haemoglobin types. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **156**, 485-490
- Middaugh, D. P., Shelton, M. E., McKenney, J. C. L., Cherr, G., Chapman, P. J. and Courtney, L. A. (1998). Preliminary Observations on Responses of Embryonic and Larval Pacific Herring, *Clupea pallasi*, to Neutral Fraction Biodegradation Products of Weathered Alaska North Slope Oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 188-196.
- Miller, J. M., Burke, J. S. and Fitzhugh, G. R. (1991). Early life history patterns of Atlantic North American flatfish: Likely (and unlikely) factors controlling recruitment. *Netherlands Journal of Sea Research* 27, 261-275.
- **Miller, J.** (1997). Opening address of the third flatfish symposium. Journal of Sea Research. 37, 183-186

Milligan, C. L., (1987) Muscle and liver intracellular acid-base and metabolite status after strenuous activity in the inactive, benthic starry flounder, *Platichthys stellatus*. Physiological Zoology **60**, 54-68.

Milligan C.L., Graham M.S., Farrell A.P. (1989). The response of trout red cells to adrenaline during seasonal acclimation and changes in temperature. *Journal of Fish Biology* **35**, 229-236.

Moon, H.-B., Choi, M., Choi, H.-G., Ok, G. and Kannan, K. (2009). Historical trends of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs and nonylphenols in dated sediment cores from a semi-enclosed bay in Korea: Tracking the sources. *Chemosphere* **75**, 565-571

П	1
٠,	\ /
- 1	v
J	•

Neill, W. H. and Bryan, J. D. (1991). Responses of fish to temperature and oxygen, and response integration through metabolic scope. In: *Aquaculture and water quality, advances in world aquaculture* (eds Brune D. E. & Tomasso J. R.). The world aquaculture society, Baton rouge, p 30-57.

Nfon, E., Cousins, I. T. and Broman, D. (2008). Biomagnification of organic pollutants in benthic and pelagic marine food chains from the Baltic Sea. *Science of The Total Environment* **397**, 190-204.

Nikinmaa M. (1992). How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicology* **22**, 227-238.

Nilsson, B., M.D., and Siesjö, B.K. (1983). A venous outflow method for measurement of rapid changes of the cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat. *Stroke* **14**, 797-802

Nixon, S., W. (1995). Coastal marine euthrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* **41**, 199-219

_	-
1	
ı	1
•	_

Olson KR, Farrell AP. (2006). The cardiovascular system. In: Evans DH, Claiborne JB, editors. *The Physiology of Fishes*, 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. pp 119–152.



Parkinson, A. and Safe, S. (1987). Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. In *Environmental Toxin* (ed. O. H. S. Safe), pp. 49-76. Germany: Springer-Verlag.

Peck, L. S., Webb, K. E. and Bailey, D. M. (2004). Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. *Functional ecology* **18**, 625-630.

- **Peyraud, C. & Labat, R**. (1962). Réactions cardio-respiratoire observé chez la sole au cours de l'ensablement. *Hydrobiologia* **19**, 351–356.
- Pereira, J., Goldberg, R., Ziskowski, J., Berrien, P., Morse, W. and Johnson, D. (1999). Essential fish habitat source document: winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, life history and habitat characteristics. NOAA Tech. Rep. NMFS.
- **Pessah, I.N., Cherednichenko, G., Lein, P.J** (2010). Minding the calcium store: Ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* **125**, 260-285.
- **Petersen, J. and Pihl, P. L.** (1995). Response to hypoxia of plaice, *Pleuronectes platessa*, and dab, *Limanda limanda* in the south-east Kattegat: distribution and growth. *Environmental Biology of Fishes* **43**, 311-321.
- Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Quéméner, L., Maxime, V., Nonnotte, G. and Boeuf, G. (2000). Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture* 188, 103-114.
- **Pollock, M. S., Chivers, D. P., Mirza, R. S. and Wisenden, B. D.** (2003). Fathead Minnows, *Pimephales promelas*, learn to recognize chemical alarm cues of introduced brook stickleback, *Culaea inconstans. Environmental Biology of Fishes* **66**, 313-319.
- **Pörtner, H. O. and Grieshaber, M. K.** (1993). Critical PO₂(s) in oxy-conforming and oxy-regulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In *In The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations To Environment And Mode Of Life* (ed. e. J. E. P. W. Bicudo), pp. 330-357. Boca Raton FL, USA CRC Press Inc.
- **Pörtner, HO**. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. **88 (4)**, 137-1460.
- **Pörtner, H.O. and Knust, R.** (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* **315**, 95-97.
- **Pörtner, H. O. and Farrell, A. P.** (2008). Physiology and climate change. *Science* **322**, 690-692
- **Pörtner, H. O. and Lannig, G.** (2009). Oxygen and capacity limited thermal tolerance. In *Fish Physiology : Hypoxia*, vol. 27 eds. J. Richards A. Farrel and C. Brauner). pp. 143-191. San Diego: Elsevier.
- **Pörtner, H. O.** (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology* **213**, 881-893.
- **Pörtner, H. O., Schulte, P. M., Wood, C. M. and Schiemer, F.** (2010). Niche Dimensions in Fishes: An Integrative View. *Physiological and Biochemical Zoology* **83**, 808-826.

- **Poupa, O., Lindström, L. and Tota, B.** (1981). Cardiac growth, myoglobin, proteins and NDA in developing tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.). *Comparative Biochemestry Physiology* A 70 pp. 217–222.
- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Björnsson, B. T., Einarsdottir, I. E., Canario, A. V. M. and Sweeney, G. E. (2001). Thyroidal hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. C* 130, 447-459.
- **Preuss, T. & Faber, D.S.** (2003). Central Cellular Mechanisms Underlying Temperature-Dependent Changes in the Goldfish Startle-Escape Behavior. *The Journal of Neuroscience* **23** (13), 5617–5626.
- **Priede, I. G.** (1977). Natural selection for energetic efficiency and the relationship between activity level and mortality. *Nature* **267**, 610-611.
- **Priede, I. G.** (1985). Metabolic scope in fish. *In: Fish energetics: new perspectives (eds P. Tyler & P. Calow) London, UK: Croom Helm.*, 33–64.



Queiroz, H. and Magurran, A. (2005). Safety in numbers? Shoaling behaviour of the Amazonian red-bellied piranha. *Biological Letters* **1**, 155-157.



Radabaugh, D.C. (1989). Season color changes and shifting antipredator tactics in darters. *Journal of Fish Biology* **34**, 679–695.

Randall, D. J. (1982). The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *Journal of Experimental Biology* **100**, 275-288.

Randall D.J., Perry S.F. (1992). Catecholamines. In *Fish Physiology*, vol. 12B (ed. W.S. Hoar, Randall D.J., Farrell A.P.), pp. 225-300. New York: Academic Press.

- Randall, D. J., Ip, Y. K., Chew, S. F. and Wilson, J. M. (2004). Air breathing and ammonia excretion in the giant mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*. *Physiological and Biochemical Zoology* 77, 783–788.
- Rantin, F. T, Gesser, H., Kalinin, A.L., Guerra, C. D. R, De Freitas, JC. and. Driedzic, W. R (1998). Herat performance, Ca²⁺ regulation and energy metabolism at high temperature in *Bathygobius soporator*, a tropical marine teleost. *Journal of Thermal Biology*, vol. 23, No. I. pp. 31-39
- **Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F.** (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C **120**, 1-27

Richards, J. G. (2009). Metabolic and molecular responses of fish to hypoxiaHypoxia, vol. 27 (ed. A. P. F. a. C. J. B. J. G. Richards), pp. 443-485. San Diego: Elsevier

Richards, **J.** (2011). Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *Journal of Experimental Biology* **214** 191-199.

Rowe, C. L. (1998). Elevated standard metabolic rate in a freshwater shrimp (*Palaemonetes paludosus*) exposed to trace element-rich coal combustion waste. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **121**, 299-304.

Rousseau, E., Smith J.S., Meissner G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behaviour of single Ca⁺² release channels. *American Journal of Physiology* **253**, C364-C368.

Russell, M.J, Dombkowski, R.A., Olson, K.R. (2008). Effects of hypoxia on vertebrate blood vessels. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* Volume 309A, Issue 2, pp. 55–63.

S

Saito, A. (1969). Electophysiological studies on the pacemaker of several fish hearts. *Zoological Magazine* **78**, 291-296.

Sandblom, E., Olsson, C., Davison, W. and Axelsson, M. (2010). Nervous and humoral catecholaminergic control of blood pressure and cardiac performance in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 156, 232–236

Santer, R. M. (1974). The organization of the sarcoplasmic reticulum in teleost ventricular myocardial cells. *Cell and TissueResearch* **151**, 395-402.

Santer, R.M. (1985). Morphology and Innervation of the Fish Heart. Berlin: Springer-Verlag.

Satchell, G. H. (1991). Physiology and form of fish circulation. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 2001, p. 1–235.

Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J. W. and Macdonald, R. W. (2007). Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin* **54**, 1845-1856.

Schurmann, H. and Steffensen, J. F. (1992). Lethal oxygen levels at different temperatures and the preferred temperature during hypoxia of the Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology* **41** 927-934.

Schurmann, H. and Steffensen, J. F. (1994). Spontaneus swimming activity of Atlantic cod Gadus morhua exposed to graded hypoxia at three temperatures. *Journal of Experimental Biology* **197**, 129-142.

Schurmann, H. and Steffensen, J. F. (1997). Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* **50**, 1166-1180.

- **Schmidt, K., Staaks, G. B. O., Pflugmacher, S. and Steinberg, C. E. W.** (2005). Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (Cyprinus carpio). *Aquatic Toxicology* **71**, 49-59.
- **Selye, H.** (1985). History and present status of the stress concept. *In A. Monat & R.S. Lazarus, eds. Stress and Coping, 2nd ed. New York: Columbia University.*
- **Shiels H.A., Farrell A.P.** (1997). The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing calcium to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1607-1621.
- **Shiels, H. A., Freund E.V., Farrell A.P. and Block B.A.** (1999). The sarcoplasmic reticulum plays major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. *Journal of Experimental Biology* **202**, 881-890.
- **Shiels H.A., Farrell A.P.** (2000). The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). *Comparative Biochemestry and Physiology* A **125**, 331-341.
- **Shiels H.A., Vornanen M., Farrell A.P.** (2002). The force-frequency relationship in fishheart. A review. *Comparative Biochemesty and Physiology* A **132**, 811-826.
- Shingles, A., McKenzie, D. J., Taylor, E. W., Moretti, A., Butler, P. J. and Ceradini, S. (2001). Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **204**, 2691-2698.
- Shingles, A., McKenzie, D. J., Claireaux, G. and Domenici, P. (2005). Reflex cardioventilatory responses to hypoxia in the flathead gray mullet (*mugil cephalus*) and their behavioural modulation by perceived threat of predation and water turbidity. *Physiological and Biochemical Zoology* 78, 744-755.
- **Sibly, R.M., Calow, P.**(1989). A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of Linneus Society* **37**, 101–116.
- **Sipes, I. and Schnellmann R.G.** (1987). Biotransformation of PCBs: metabolic pathways and mechanisms. In *Polychlorinated biphenyles (PCBs): mammalian and environmental toxicology. Environmental Toxin* (ed. S. S. editor), pp. 97-110. New York: Springer Verlag.
- Smith, E.N., Allison, R.D. & Crowder, W.E. (1974). Bradycardia in a free ranging American alligator. *Copeia* (issue 3), 770-772.
- Smith, M.P. Michael J. Russell, M.J., Wincko, J.T., Olson, K.R. (2001). Effects of hypoxia on isolated vessels and perfused gills of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A 130, 171-181.
- **Soares, M. G. M., Menezes, N. A. and Junk, W. J.** (2006). Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia* **568**, 353-367.

- **Sokolova, I.M and Lannig G.** (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201.
- **Sollid, J., Weber, R. E. and Nilsson, G. E.** (2005). Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp Carassius carassius and goldfish *Carassius auratu*. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1109–1116.
- Sollid, J., Rissanen, E., Tranberg, H. K., Thorstensen, T., Vuori, K. A. M., Nikinmaa, M. and Nilsson, G. E. (2006). HIF-1a and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced transformation. *Journal of Comparative Physiology* **176B**, 359-369.
- **Sommer, A. M. and Pörtner, H.-O.** (2002). Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population. *Marine Ecology-Progress Series* **240**.
- **Stecyk, J.A.W., Farrell, A.P.,** (2006). Regulation of the cardiorespiratory system of common carp (*Cyprinus carpio*) during severe hypoxia at three seasonal acclimation temperatures. *Physiological Biochemical Zoology* **79**, 614–627.
- **Steffensen, J. F., Bushnell, P. G. and Schurmann, H.** (1994). Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: no evidence of metabolic cold adaptation. *Polar Biology* **14**, 49-54.
- **Steffensen, J.F.** (2007) Oxygen consumption of fish exposed to hypoxia: are they all oxyregulators or are any oxyconformers? In: Brauner CJ, Suvajdzic K, Nilsson G, Randall DJ (eds) Fish physiology, fish toxicology and fisheries management: proceedings of the 9th international symposium. Ecosystem Research Division Publication EPA/600/R-07/010. United States of Envrionmental Protection Agency, Athens, Georgia, pp 237–248.
- **Stierhoff, K. L., Targett, T. E. and Miller, K.** (2006). Ecophysiological responses of juvenile summer and winter flounder to hypoxia: experimental and modelling analyses of effects on estuarine nursery quality. *Marine Ecology Progress Series* **325**, 255-266.
- Stouthart, X. J. H. X., Huijbregts, M. A. J., Balm, P. H. M., Lock, R. A. C. and Wendelaar Bonga, S. E. (1998). Endocrine stress response and abnormal development in carp (*Cyprinus carpio*) larvae after exposure of the embryos to PCB 126. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 321–329.
- Sundberg, H., Hanson, M., Liewenborg, B., Zebuhr, Y., Broman, D. and Balk, L. (2007). Dredging associated effects:maternally transferred pollutants and DNA adducts in feral fish. *Environmental Science & Technology* **41**, 2972-2977.

 \mathcal{T}

Taylor, J. C. and Miller, J. M. (2001). Physiological performance of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert, 1884), in chronic and episodic hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **258**, 195–214.



Underwood, A. J. (1981). Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanography Marine Biology* **19**, 513–605.

 ${\cal V}$

Van Dolah, R. F., Riekerk, G. H. M., Bergquist, D. C., Felber, J., Chestnut, D. E. and Holland, A. F. (2008). Estuarine habitat quality reflects urbanization at large spatial scales in South Carolina's coastal zone. *Science of The Total Environment* **390**, 142-154

van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G. and Murk, A. (2009). PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Toxicology* **92**, 213-220.

van denThillart, G., via, J. D., Vitali, G. and Cortesi, P. (1994). Influence of long term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical oxygen levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Marine Ecology* **104**, 109-117.

Vaquer-Sunyer, R. and Duarte, C.M. (2008). Threshold of hypoxia for marine diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15452-15457.

Vines C.A., Robbins T., Griffin F.J., Cherr G.N. (2000). The effects of diffusible creosote derived compounds on development in Pacific herring (*Clupea pallasi*). *Aquatic Toxicology*. **51**, 225-239.

Virkki, L., Nikinmaa, M. (1993). Tributyltin inhibition of adrenergically activated sodium/proton exchange in erythrocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **25**, 139-146.

Voltura, M.B and French, J.B. (2007). Effects of Dietary PCB Exposure on Reproduction in the White-Footed Mouse (*Peromyscus leucopus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**, 264–269.

Vornanen, M. (1997). Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca2+ channels in the ventricular myocytes of a teleost fish. *American Journal of Physiology* **272**, 1432-1440.

Vornanen, M. (1999). Na⁺/Ca²⁺ exchange current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemmal Ca²⁺ influx. *Journal of Experimental Biology* **202**, 1763-1775.

Vornanen, M., Shiels H.A. and Farrell, A.P. (2002). Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comparative Biocheestry and Physioogy*, Part **A**, 827-846.

Vornanen, M., Stecyk, S. J. A. and Nilsson, G.E. (2009). The anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). *In Hypoxia* (ed. J. G. Richards, A. P. Farrell and C. J. Brauner), San Diego: Elsevier, 397-441

W

Waid, J. S. (1986). PCBs and the environment. Volumes I to III, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1987.

Walker, J. A., Ghalambor, C. K., Griset, O. L., McKenney, D. and Reznic, D. N. (2005). Do faster starts increase the probability of evading predators? *Functional ecology* **19**, 808-815

Walker, M. K. and Peterson, R. E. (1991). Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 21, 219-237.

Wang, T., Lefevre, S., Huong, D. T. T., van Cong, N. and Bayley, M. (2009). The effect of hypoxia on growth and digestion. In *Hypoxia*, vol. 27 eds. J. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 361-396: Elsevier.

Ware, D.M. (1982). Power and evolutionary fitness of teleosts. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* **39**, 3–13.

Webb, P. W. (1981). The effect of the bottom on the fast start of flatfish *Citharichthys stigmaeus. Fishery Buletin.* **79**, 271–276.

Webb, P. W. (1986). Effect of body form and response threshold on the vulnerability of four species of teleost prey attacked by largemouth bass (Micropterus salmoides). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**, 763-771.

Wedemeyer, G. A., Barton, B. A. and McLeay., D. J. (1990). Stress and acclimation. In: C.B. Schreck & P.B. Moyle (ed.) Methods for Fish Biology, *American Fisheries Society*, Bethesda.451-490

Wedemeyer, G. A., McLeay, D. J. and Goodyear, C. P. (1984.). Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. *In V.W. Cairns, P.V. Hodson, and J.O. Nriagu (editors). Contaminant Effects on Fisheries*.

Welker, T. L., Mcnulty, S. T. and Klesius, P. H. (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.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591–625.

Wieser, W. (1985). Developmental and metabolic constraints of the scope for activity young rainbow trout (*Salmo gardinieri*). *Journal of Experimental Biology* 118, 133-142

Williams, **J.**, & Brown, **J.A.** (1991). Developmental changes in foraging-predator avoidance trade- offs in larval lumpfish, *Cyclopterus lumpus*. *Marine Ecology Progress Series* **76**, 53-60.

Wilson, R. W., Bergman, H. L. and Wood, C. M. (1994). Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1: Acclimation specificity, resting physiology, feeding, and growth *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**, 527-535.

Wilson, R. S., Lefrançois, C., Domenici, P. and Johnston, I. A. (2010). The effects of environmental factors on the unsteady swimming performance of fish. In *Fish locomotion:* an eco-ethological perspective, eds. D. P. and I. A. Johnston), pp. 269-265: Enfield, NH: Science Publishers.

Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses *Marine Pollution Bulletin* **45**, 35-45.

Wu, R. S. S., Zhou, B. S., Randall, D. J., Woo, N. Y. S. and Lam, P. K. S. (2003). Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environmental Science and Technology* 37, 1137-1141.



Yamashita, Y., Tanaka, M. and Miller, J. M. (2001). Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *Journal of Sea Research* **45**, 205-218.

Z_{-}

Zaza, M. D., Rochetti, M., and Difrancesco, D. (1996). Modulation of the hyperpolarization activated current (lf) by adenosine in rabbit sinoatrial myocytes. *Circulation* **94**, 734-741.