



**HAL**  
open science

**Structure génétique, réponses bioénergétiques et traits de vie, de populations de flets (*Platichthys flesus*) soumises au réchauffement climatique, sur un gradient latitudinal**

Nicolas Pédrón

► **To cite this version:**

Nicolas Pédrón. Structure génétique, réponses bioénergétiques et traits de vie, de populations de flets (*Platichthys flesus*) soumises au réchauffement climatique, sur un gradient latitudinal. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0058 . tel-01431379

**HAL Id: tel-01431379**

**<https://theses.hal.science/tel-01431379v1>**

Submitted on 10 Jan 2017

**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 bretagne  
occidentale

UNIVERSITE  
BRETAGNE  
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Nicolas Pédrón**

Préparée à l'IFREMER (Plouzané, France)

Et au LEMAR

(UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER)

Structure génétique,  
réponses bioénergétiques  
et traits de vie,  
de populations de flets  
(*Platichthys flesus*) soumises au  
réchauffement climatique, sur un  
gradient latitudinal

Thèse soutenue le 29 Septembre 2016

devant le jury composé de :

**Filip VOLCKAERT**

Professeur, Université de Leuven / Rapporteur

**Frédéric SILVESTRE**

Professeur, Université de Namur / Rapporteur

**Jérôme CACHOT**

Professeur, Université de Bordeaux / Examineur

**Grégory CHARRIER**

Maitre de conférence, Université de Bretagne Occidentale /  
examineur

**Chantal CAHU**

Directrice de recherche, Ifremer / Directrice de thèse

**Jean LAROCHE**

Pr, Université de Bretagne Occidentale / Directeur de thèse





# Remerciements

Merci tout d'abord aux membres du jury, en particulier les Pr. Filip Volckaert et Frédéric Silvestre d'avoir accepté de rapporter ce travail, et au Pr Jérôme Cachot et Grégory Charrier (Maitre de conférence) d'avoir accepté d'être examinateurs.

Merci également à la région Bretagne, à l'Institut d'aménagement de la Vilaine et au LabEx Mer pour avoir financé cette thèse.

Ma plus sincère reconnaissance revient au Pr. Jean Laroche qui, depuis qu'il m'a accordé sa confiance il y a maintenant six ans, m'a (liste non exhaustive) soutenu, encouragé, formé, secoué, enguirlandé, conseillé, botté le train quand j'en avais besoin, mais jamais sans se départir trop longtemps de sa pédagogie et de sa patience. Merci de m'avoir poussé aussi loin, et de m'avoir soutenu jusqu'au bout du bout tant sur les manips que sur la rédaction. J'ignore à l'heure où j'écris ces lignes ce qu'il adviendra de ma carrière, mais son influence me suivra forcément pendant très longtemps.

Merci également à José-Luis Zambonino pour ses précieux conseils sur toutes les expérimentations qui ont été menées, mais aussi pour sa gentillesse et pour avoir su trouver les mots justes quand la pression était forte.

Un gigantesque et monumental merci à Nicolas Le Bayon, le MacGyver des distributeurs (de granules), l'Epicure de l'aquaculture, le Marie Curie de la tuyauterie, etc., pour son inépuisable soutien autour des bacs, pour maintenir tous ces flets en vie dans le meilleur environnement possible avant qu'ils ne passent à la casserole au nom de la Science. Sans lui, cette thèse ne serait pas la moitié de ce qu'elle est présentement, et j'espère sincèrement pouvoir matérialiser l'expérience acquise en manipulations des poissons en terme d'emploi.

Un grand merci à toute l'équipe du labo ARN, David, Guy, Yvette, Chantal, et tout le monde, pour leur bonne humeur lors des pauses.

Merci à Gregory Charrier pour sa bonne humeur et son aide précieuse sur tout le volet génétique, et pour avoir toujours répondu présent, dès qu'il y avait une manip à lancer ou une dissection à réaliser. Un grand merci à Vianney et Sébastien pour leur aide sur la manip protéo, ce n'était pas gagné mais ça a valu le coup d'insister ! Merci à Adeline pour son aide sur... un peu tout ! Merci aussi à Marie pour son aide précieuse, les stats, c'est vraiment un monde à part.

Merci à Christophe et Anne (Bado-Nilles) pour leurs conseils en cytométrie, les résultats n'ont pas



été significatifs mais ce fut formateur.

Merci à toutes les personnes impliquées dans les pêches de flets, Rachid Amara et Vincent Cornil pour nos poissons de Boulogne, la famille Tribalier pour les poissons de Vilaine, et à nos collègues portugaises Rita et Vanessa pour leur énergie et leur motivation, trois années de suite !

Merci à mes prédécesseurs Isabelle, Edouard, Célie, Claire pour avoir rendu ces premières années aussi sympathique, avant qu'ils ne s'envolent vers d'autres horizons.

Pour finir sur un plan plus personnel, merci infiniment à mon ami Romain, pour m'avoir supporté pendant ces dix ans, pour m'avoir inspiré durant ces centaines d'heures de TP et de TD, pour m'avoir fait marrer pendant ces soirées. Nos chemins se séparent un peu, mais juste un peu...

Merci à tous mes amis, les Romains pour ces HellFest exultatoires, Antoine pour ses bons délires, Gwladys pour ces pauses-café reposantes. Merci à Dom pour son soutien toutes ces années, tu nous manques...

Merci à ma famille pour leur soutien depuis le début de mes études, malgré mon plantage en médecine (j'aurais essayé !).

Merci à ma doudou-fa pour son amour, sa patience et sa compréhension. Il n'y a pas de mots pour le dire assez bien, sans toi je ne serais pas grand-chose au sortir de cette thèse, et à présent le Monde n'a qu'à bien se tenir !

# Table des matières

<b>Chapitre I :Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
1.1 Impacts du réchauffement climatique sur les poissons marins.....	3
Modèles de distribution d'espèces .....	3
Réponse évolutive des populations au changement climatique .....	4
Populations périphériques vs centrales : quel potentiel évolutif ?.....	4
1.2 Contexte géographique de la thèse : l'Atlantique Nord-Est .....	5
1.3 Modèle poisson ciblé dans la thèse : le flet ( <i>Platichthys flesus</i> ) .....	6
1.4 Etat des connaissances sur la diversité génétique et phénotypique de populations centrales et périphériques du flet européen .....	8
1.5 Le projet scientifique de cette thèse .....	10
1.6 Plan de présentation de cette thèse .....	12
<b>Chapitre II : Principaux outils mis en œuvre</b> .....	<b>13</b>
2.1 Génétique de populations.....	15
Questions explorées par la génétique de populations .....	15
Les principales forces évolutives et leurs effets sur la diversité génétique .....	15
Evolution de la diversité et de la structure génétique des populations in natura .....	17
2.2 Approche en bioénergétique.....	18
Rappels sur l'énergétique cellulaire (Amérand 2006, Tortora & Derrickson 2007).....	18
Mitochondrie et stress oxydant.....	20
Composition lipidique des membranes cellulaires & propriétés fonctionnelles des mitochondries (Charmentier & Charmentier 2006) .....	22
Réserves lipidiques.....	23
Bioénergétique & tolérance au multistress dans les populations naturelles.....	24
2.3 Evaluation des normes de réaction sur les stades embryo-larvaires.....	27
2.4 Développement zootechnique sur la production larvaire de flets .....	29
Elevage des flets adultes .....	29
Alimentation .....	29
Prophylaxie .....	30
Première expérience de production de larves et de juvéniles (Janvier-Avril 2013) .....	31

Deuxième expérience de production de larves (Janvier-Avril 2014) .....	34
Troisième expérience de production de larves (Décembre 2014-Mai 2015).....	35
Bilan sur les difficultés de la production de larves de flet au laboratoire .....	37
Common Garden sur juvéniles sauvages.....	37
<b>Chapitre III : Structure génétique de populations de flet le long des côtes Européennes .....</b>	<b>39</b>
Résumé du chapitre .....	41
Introduction.....	41
Résultats et discussion .....	42
Article 1:New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder ( <i>Platichthys flesus</i> ) to anthropogenic stress and contrasted environments.....	45
Article 2: Genetic variation across the European flounder geographical range, mainly considering central vs southern peripheral populations .....	51
<b>Chapitre IV : Réponses de populations de flets à un stress thermique et hypoxique : approches bioénergétique et protéomique .....</b>	<b>83</b>
Résumé du chapitre .....	85
Introduction.....	85
Résultats et discussion .....	86
Article 3: Contrasted patterns of energy metabolism, in core vs southern peripheral European flounder populations, exposed to temperature rising and hypoxia .....	89
Article 4: Proteomic responses of European flounder to temperature rising and hypoxia: differential sensibilities of peripheral vs core populations.....	115
<b>Chapitre V : Normes de réaction sur les traits d'histoire de vie de stades précoces de flet .....</b>	<b>141</b>
Résumé du chapitre .....	143
Introduction .....	143
Résultats et discussion.....	143
Article 5: Thermal reaction norms in European flounder life history traits: variations along a latitudinal cline .....	115
<b>Chapitre VI : Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>163</b>

Objectifs principaux et approches mises en œuvre dans cette thèse.....	165
Peut-on détecter une différenciation génétique significative entre les populations de flets à l'échelle de l'Europe ? .....	166
La différenciation génétique entre les populations de flet centrales et périphériques se traduit elle par une différenciation phénotypique entre leurs juvéniles soumis à un multi-stress ? .....	168
Peut on différencier les normes de réaction thermiques des traits de vie, pour les stades embryolarvaires de flet issus de populations centrales et périphérique ? .....	170
Valeur des populations périphériques Sud en termes de conservation d'une espèce ?.....	172
Perspectives de recherche .....	173
<b>Bibliographie générale .....</b>	<b>177</b>

# Listes des figures (hors publications)

## **Introduction**

Figure 1:Relation entre la température annuelle moyenne de la mer (100m de prof.) et la distribution actuelle des stocks de morue de l'Atlantique Nord-Est (in Bigg et al. 2007).....	5
Figure 3: Le cycle de vie du flet européen en milieu estuarien.....	7
Figure 2: Zone d'échantillonnage de populations de flet en France et au Portugal.....	7
Figure 4: Fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative (Amérand 2006).....	19
Figure 5: Génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS), in Tomanek (2015).....	21
Figure 6: La tolérance au stress limitée par l'énergie, pour évaluer les impacts du multistress.....	26
Figure 7: Normes de réaction (Jensen et al. 2008).....	28
Figure 8: Flets adultes dans leur bac d'élevage.....	30
Figure 9: Flets femelles avant et pendant un stripping.....	31
Figure 10: Embryons de flets.....	32
Figure 11: Larves lécithotrophes.....	33
Figure 12 :Larve alécithe et juvéniles.....	33
Figure 13: Exemple de malformations.....	34
Figure 14: Incubateur en PVC.....	35
Figure 15: Disposition expérimental du common garden embryo-larvaire.....	36
Figure 16: Bac d'expérimentation sur juvéniles sauvages.....	37

## **Discussion et perspectives**

Figure 17: Acclimatation et adaptation de populations de poissons.....	166
------------------------------------------------------------------------	-----

# Communications scientifiques

Calves I, Dupuy C, Lavergne E, Galland C, Capitaine C, **Pédrón N**, Charrier G, Guinand B, Quiniou L, Laroche J. 2011. Structure génétique et réponses aux multi-stress de populations de flet (*Platichthys flesus*) sur un cline latitudinal. ECOBIM 2011: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011.

Laroche J, Calves I, Claireaux G, Amérand A, Théron M, Loizeau V, Labonne M, Sanchez W, Cabral H, Vasconcelos RP, França S, **Pédrón N**, Quiniou L (2012). Climate change, hypoxia and chemical stress: Impacts on the energetic metabolism of the European flounder *Platichthys flesus*. Colloque franco-québécois ECOBIM, Reims 5-8 juin 2012

Dupuy C, Calves I, Claireaux G, Amérand A, Théron M, Loizeau V, Labonne M, Sanchez W, Cabral H, Vasconcelos RP, França S, **Pédrón N**, Quiniou L (2012). Réponses de populations de poulamons au stress le long du St Laurent: biomarqueurs au niveau cellulaire, biochimique et physiologique. Colloque franco-québécois ECOBIM, Reims 5-8 juin 2012

Dupuy C, Calves I, **Pédrón N**, França S, Vasconcelos RP, Auffret M, Quiniou L, Laroche J. Cellular and molecular responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to the effects of climate change, hypoxia and chemical stress, in several estuaries from France to Portugal. 28<sup>th</sup> Congress – European Society for Comparative Physiology and Biochemistry – Bilbao, 2-5 September 2012.

Laroche J, **Pédrón N**, Lavergne E, Calves I, Labonne M, Quiniou L, Claireaux G, Amérand A, Théron M, Loizeau V, Guinand B, Le Bayon N, Mazurais D, Zambonino J, Cahu C. EVOLFISH: Effets du réchauffement global et de la contamination locale sur les réponses évolutives d'un poisson côtier le flet, *Platichthys flesus*. Séminaire Changements Environnementaux - ANR - Toulouse, 17 et 18 avril 2013.

**Pédrón N**, Lavergne E, Calves I, Mazurais D, Zambonino J, Le Bayon N, Quiniou L, Laroche J. Does the chronic chemical contamination of an European flounder population decrease its thermal tolerance ? 17<sup>th</sup> Congress – PRIMO, Pollutant responses in marine organisms, University of Algarve, Faro, Portugal, 5-8 May 2013.

Laroche J, Zambonino J, Claireaux G, Loizeau V, Mazurais D, **Pédrón N**, Le Bayon N, Charrier G, Vianney P, Cahu C. Effets du réchauffement climatique global, et des stress anthropiques à échelle locale, sur un poisson plat estuarien. Rencontres scientifiques du département RBE – Ifremer, Nantes : Biodiversité et usage durable des ressources biologiques marines dans un contexte de changement global et de pressions anthropiques, 5 & 6 Novembre 2013.

Charrier G, Vasconcelos RP, **Pédrón N**, Zambonino-Infante J, Claireaux G, Mazurais D, Le Bayon N, Fonseca VF, Cabral HN, Laroche J. Integrative approach on the responses of a coastal fish to global warming, local hypoxia and contamination in the North-East Atlantic. ECSA 54 – Coastal systems under change : tuning assessment and management tools. Sesimbra, Portugal, 12-16 May 2014.

Laroche J, **Pédrón N**, Charrier G, Vasconcelos RP, Loizeau V, Zambonino Infante J, Claireaux G, Mazurais D, Le Bayon N, Fonseca VF, Cabral HN. Approche populationnelle en écotoxicologie marine. Colloque franco-québécois ECOBIM, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané, 20-23 Mai 2014.



# Chapitre I : Introduction générale





## 1.1 Impacts du réchauffement climatique sur les poissons marins

Dans l'Atlantique Nord et le Pacifique Nord-Est, les données collectées sur les populations exploitées en 1998, ont montré pour les poissons marins un déclin majeur de 65% de la biomasse de reproducteurs, relativement aux niveaux historiques connus (Reynolds *et al.* 2005). Cette étude souligne un besoin urgent de mieux comprendre la biologie de la vulnérabilité afin de résoudre les controverses actuelles sur les critères utilisés pour évaluer le risque d'extinction, et ainsi améliorer les priorités nationales et internationales pour la conservation.

Face au réchauffement climatique, les populations de poisson peuvent réagir de trois façons : 1) disparaître, ou échapper au stress en se déplaçant vers des habitats plus appropriés au Nord, 2) rester et s'acclimater aux nouvelles conditions au moyen de la plasticité phénotypique, et/ou 3) s'adapter aux nouvelles conditions par des modifications génétiques (évolution par sélection naturelle).

### Modèles de distribution d'espèces

Dans l'Atlantique Nord-Est, le réchauffement climatique a entraîné un changement d'abondance et de distribution (latitude, profondeur) de nombreuses espèces de poisson. Par exemple, l'abondance des espèces Lusitaniennes a augmenté ces récentes décennies (e.g. la sole), cependant l'abondance des espèces Boréales a décliné aux limites Sud de leur aire de répartition (e.g. la morue, la plie, la limande), mais augmente dans leur limite Nord (e.g. la morue) (Rijnsdorp *et al.* 2009). Ces changements induits par le climat peuvent profondément impacter les systèmes socio-économiques en induisant l'effondrement des stocks, en particulier ceux situés sur la limite Sud de la distribution actuelle des espèces.

Les modèles de distribution d'espèces (Species Distribution Models « SDM »), développés sur des poissons d'intérêt commercial, sont en mesure d'expliquer les modifications des aires d'abondance de différentes espèces signalées en Atlantique Nord, et notamment en Mer du Nord (Lenoir *et al.* 2011). Ainsi, les SDM constituent des outils utiles pour la compréhension de la distribution actuelle ou potentielle des espèces. Cependant, les SDM souffrent de limites potentielles, et sont souvent incapables de prédire précisément les limites des aires de distribution des espèces (Nord, Sud, Est, Ouest). Une limite importante des SDM est liée au fait qu'ils reposent sur un mécanisme unique (e.g. les limites de tolérance thermique des espèces) ou un profil environnemental (e.g. le gradient latitudinal de la température de surface) sur toute l'aire de distribution des espèces, alors que des mécanismes différents, ou des pressions environnementales spécifiques peuvent en

réalité contrôler la distribution des espèces dans différentes zones géographiques (Fly *et al.* 2015).

Par ailleurs, l'une des principales limites des modèles de distribution d'espèces est qu'ils ignorent le rôle de l'adaptation locale dans la mise en place des limites de la distribution d'une espèce. Par exemple, dans le cadre des SDM, toutes les populations d'une espèce donnée sont considérées comme partageant la même tolérance physiologique à la température.

### Réponse évolutive des populations au changement climatique

Comme vu précédemment, la plupart des prédictions sur la persistance des espèces marines dans les habitats, ne considèrent pas le rôle de l'évolution et le potentiel des organismes à s'adapter au changement climatique.

Cependant, la prise en compte des perspectives évolutives est cruciale pour une meilleure compréhension des impacts du changement climatique sur le milieu marin (Munday *et al.* 2013). En effet, même les espèces au temps de génération relativement long peuvent s'adapter aux changements environnementaux, si leurs populations possèdent une variabilité génétique conséquente et stable dans le temps, et un potentiel de croissance démographique élevé. Par ailleurs, face aux effets immédiats des nouvelles conditions environnementales, la plasticité phénotypique peut permettre aux populations de se maintenir et laisse ainsi le temps aux adaptations génétiques de se mettre en place. Différentes approches expérimentales combinées (outils moléculaires, génétique quantitative et évolution expérimentale) apparaissent comme étant la voie optimale pour acquérir une meilleure compréhension du potentiel évolutif des populations. Au final, ces nouvelles approches devraient aboutir à une meilleure gestion des ressources marines.

Bien que les connaissances manquent encore sur les mécanismes physiologiques fondamentaux qui régissent les réponses et l'adaptation des populations marines face au changement climatique, la performance de populations le long de clines géographiques, caractérisés par un gradient latitudinal des températures, a fourni d'excellentes preuves de la capacité d'acclimatation et d'adaptation des populations face aux altérations environnementales (Sanford & Kelly 2011).

### Populations périphériques vs centrales : quel potentiel évolutif ?

Les populations périphériques sont spatialement séparées des populations centrales, et souvent aussi écologiquement marginales, étant confrontées à des environnements biotiques et abiotiques différents, et soumises fréquemment à des conditions stressantes. Ainsi, les goulets d'étranglement, les flux de gènes restreints, et les nouveaux régimes de sélection inter-agissent et peuvent entraîner une réorganisation génétique induisant une rupture dans la co-adaptation des gènes (Lesica &

Allendorf 1994).

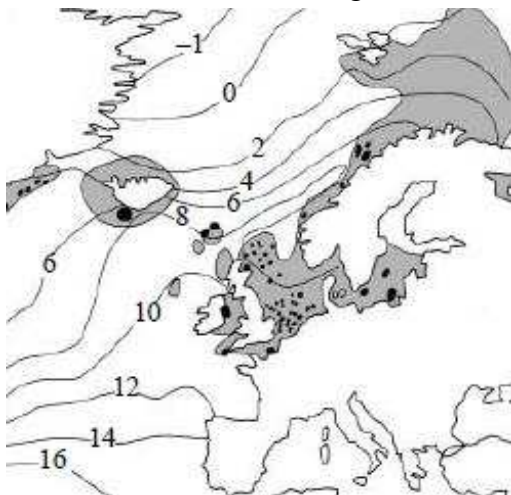
L'évaluation de la structure génétique des populations à travers l'aire de distribution d'une espèce devient un sujet majeur, pour comprendre pourquoi des espèces peuvent présenter des limites de répartition stables et pour définir la valeur en terme de conservation des populations périphériques (Eckert *et al.* 2008).

Quelques études ont montré que les réponses des espèces terrestres et aquatiques au changement de l'environnement sont probablement largement déterminées par les réponses des populations aux limites de répartition (Hampe & Petit 2005 ; Alberto *et al.* 2013). Contrairement aux populations situées à la limite en expansion (au Nord de la distribution), les populations en limite Sud restent peu étudiées, en dépit de l'importance de ces populations comme des réservoirs anciens de diversité génétique. En effet, ces populations longuement isolées dans les habitats périphériques peuvent contenir des génotypes qui leur confèrent une résistance au futur réchauffement, soulignant ainsi la nécessité de protéger les petites populations périphériques autant que les grandes populations centrales (Moritz *et al.* 2012).

## 1.2 Contexte géographique de la thèse : l'Atlantique Nord-Est

Cette thèse se concentre sur l'Atlantique Nord-Est, de la Manche au Portugal, où est clairement observé un gradient latitudinal des températures annuelles moyennes de la mer (Fig.1). La côte Portugaise se situe à l'interface entre la flore et la faune à affinité d'eau chaude et froide, et un nombre considérable d'espèces d'eau froide (*i.e.* abondantes dans le Nord de l'Europe) atteignent leur limite Sud de répartition sur cette côte (Lima *et al.* 2007).

De nombreuses espèces marines présentent un déclin latitudinal d'abondance le long de la côte Portugaise. Les limites Sud de certaines espèces d'eau froide se sont déplacées vers le Nord dans cette région ; elles sont probablement liées au récent réchauffement climatique associé à un fort gradient de température de surface le long de cette côte (Assis *et al.* 2013). L'analyse fine des températures de la mer au Portugal révèle un gradient latitudinal de température clair tout au long de



l'année, l'upwelling intense durant la saison chaude (au Nord de cette côte) contribuant à accentuer ce gradient (Lima *et al.* 2007).

Figure 1: Relation entre la température annuelle moyenne de la mer (100m de prof.) et la distribution actuelle des stocks de morue de l'Atlantique Nord-Est (in Bigg *et al.* 2007)

Les études phylogéographiques ont montré que les populations en limite de distribution (basse latitude) de nombreuses espèces côtières de l'Atlantique Nord-Est, présentent une diversité génétique marquée, principalement liée à la présence de refuges Sud au cours du dernier maximum glaciaire, situés dans le Nord-Ouest de la Péninsule Ibérique (Provan 2013). De plus, la phylogéographie des poissons côtiers démersaux dans l'Atlantique Nord-Est a mis en évidence que l'expansion post-glaciaire dans le Nord de l'Europe provient principalement de refuges en Manche ou au Sud de la Mer du Nord, avec parfois une contribution très réduite du refuge Ibérique (Larmuseau *et al.* 2009, 2010). Finalement, en considérant les écosystèmes terrestres, d'eau douce et marins, on constate que la plupart des populations relictuelles du Sud n'ont pas été une source de recolonisation post-glaciaire majeure du Nord de l'Europe, contrairement à l'opinion commune, préservant ainsi leur forte spécificité génétique relativement aux populations du Nord (Hampe & Petit 2005).

Par conséquent, deux visions du futur de ces populations en limite Sud de distribution coexistent : (1) la prédiction de leur disparition complète basée sur la modélisation, (2) des hypothèses plus optimistes basées sur leur persistance passée. Aussi, une vision plus équilibrée pourrait émerger de nouveaux travaux développés sur ces populations marginales.

### **1.3 Modèle poisson ciblé dans la thèse : le flet (*Platichthys flesus*)**

Le modèle poisson étudié dans cette thèse est le flet européen (*Platichthys flesus*). C'est une espèce boréale catadrome présentant : (1) une ponte en mer à des profondeurs modérées (20 à 50 m), souvent localisée à l'embouchure des estuaires, (2) une certaine fidélité aux sites de ponte, (3) une vie juvénile estuarienne d'environ 2,5 ans (Dando 2011). Le flet est une espèce côtière particulièrement pertinente pour explorer l'impact des changements globaux sur les populations, en raison de son recrutement au stade juvénile dans les nurseries estuariennes peu profondes (Fig. 2) ; ces secteurs sont particulièrement affectés par le réchauffement climatique, et parfois par une eutrophisation pouvant conduire à un stress hypoxique. Le flet est largement distribué en Europe, du Portugal à la Norvège; il constitue un excellent modèle pour explorer l'adaptation/vulnérabilité des populations, face à des stressseurs dans les systèmes côtiers (Hemmer-Hansen *et al.* 2007; Calvès *et al.* 2013; Laroche *et al.* 2013; Larsen *et al.* 2013; Marchand *et al.* 2013; Lavergne *et al.* 2015).

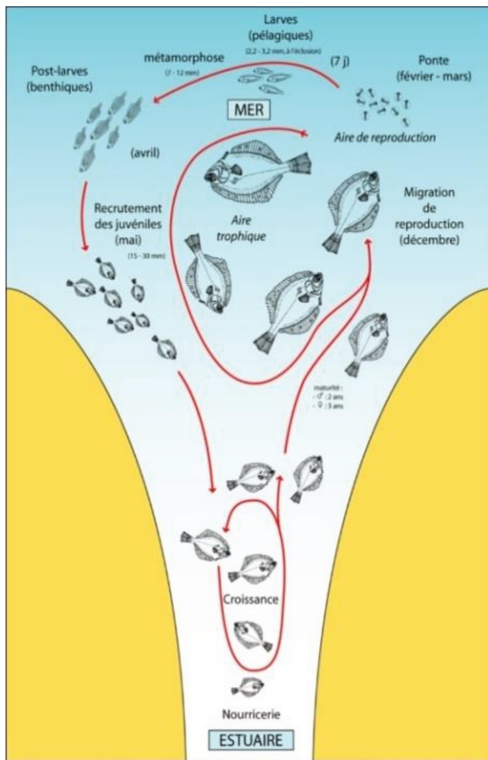


Figure 2: Le cycle de vie du flet européen en milieu estuarien



Figure 3: Zone d'échantillonnage de populations de flet en France et au Portugal

Ces trois dernières décennies, l'abondance d'une espèce boréale telle que le flet européen (*Platichthys flesus*) a diminué significativement dans le Golfe de Gascogne (Hermant *et al.* 2010) et dans l'estuaire de Gironde (Chaalali *et al.* 2013) ; cette chute étant principalement liée aux effets du réchauffement global, particulièrement dans la partie Sud du Golfe de Gascogne. On note également que le flet est devenu très rare le long de la côte du Pays Basque (Marigómez I., University of the Basque Country, communication personnelle).

Le long de la côte Nord Portugaise, plusieurs populations de flet sont suivies et maintiennent une démographie active, particulièrement au niveau des estuaires du Minho et de la Lima, séparés de 50 km (Freitas *et al.* 2009, Ramos *et al.* 2010, Morais *et al.* 2011) ; leur persistance est probablement liée à l'existence d'un upwelling actif durant la saison estivale au Nord-Ouest de la Péninsule Ibérique (Lima *et al.* 2007). La limite Sud de la distribution du flet est localisée au Portugal, cette espèce étant devenue extrêmement rare à la latitude de Lisbonne (Fig. 3), alors qu'elle y était abondante il ya quelques décennies (Cabral *et al.* 2001). On estime que le déplacement de la limite Sud du flet vers le Nord à la latitude du Mondego (Fig. 3) est principalement liée au récent réchauffement de la température de surface de la mer dans cette région (Cabral *et al.* 2007 ; Nicolas *et al.* 2011).

Il est donc important de remarquer que la distribution et l'abondance actuelle du flet dans la partie Sud de son aire de distribution (du Golfe de Gascogne au Portugal) ne peut être décrite sous la

forme d'un simple gradient latitudinal assimilé à un proxy de la température, mais est en fait reliée à des changements hydroclimatiques à échelle régionale.

#### **1.4 Etat des connaissances sur la diversité génétique et phénotypique de populations centrales et périphériques du flet européen**

Les facteurs déterminants la capacité des populations à s'adapter aux changements climatiques sont peu connus ; cette méconnaissance conduisant à de fortes incertitudes pour les plans de conservation et gestion des ressources marines. Les travaux sur les processus liés à l'adaptation au réchauffement global seront d'un intérêt majeur pour améliorer notre capacité à prédire la résistance des espèces marines (Pörtner *et al.* 2010). Des études récentes conduites sur les poissons ont révélé un rôle significatif de la variabilité génétique dans la tolérance thermique et hypoxique, qui pourrait permettre aux populations de s'adapter aux stress anthropiques liés aux changements climatiques (Anttila *et al.* 2013). La prédiction sur les réponses évolutives des organismes marins reste cependant un véritable défi en biologie marine (Munday *et al.* 2013) ; la mise en œuvre d'approches intégratives englobant tous les niveaux d'organisation biologique, des gènes aux populations, et en prenant également en compte le cycle de vie complexe des poissons marins, sera d'un intérêt majeur pour acquérir une compréhension globale du potentiel évolutif de ces espèces.

Dans ce contexte, le laboratoire LEMAR a initié une collaboration avec le « Centro de Oceanografia » (Lisbonne, Portugal) en 2009, visant à rechercher les « Effets du réchauffement climatique global et de la contamination locale sur la réponse évolutive de deux poissons côtiers » (projet EVOLFISH, ANR, 2009-2012). Ce projet visait principalement les réponses du flet aux stress dans quatre estuaires présentant des conditions environnementales contrastées : au Portugal (le Mondego localisé en limite Sud de l'aire de distribution du flet) et en France (la Vilaine un système eutrophisé, la Seine un estuaire très pollué, la Canche un système « témoin » *i.e.* peu impacté a priori par les stressseurs).

EVOLFISH a analysé la diversité génétique de ces populations par des marqueurs neutres de type microsatellites et ainsi mis en évidence une structure génétique significative sur la zone étudiée, ainsi qu'un statut génétique original de la population du Mondego (Calvès *et al.* 2013).

Dans une deuxième étape EVOLFISH a comparé les réponses phénotypiques des populations *in natura* (du Sud au Nord : Mondego, Vilaine, Seine). Des investigations sur le niveau d'expression de différents gènes ont souligné (1) une sous expression de la Cytochrome C oxidase sub-unit 2 (CO II) et de la sous unité ribosomale mitochondriale 12S, et (2) une surexpression du ratio CO II/12S dans la population du Mondego relativement aux populations françaises ; ces résultats suggèrent que



la population du Sud pourrait réduire sa densité mitochondriale et maximiser la synthèse d'ATP par mitochondrie (Calvès 2011).

Des poissons juvéniles issus des trois estuaires précédents ont été par ailleurs soumis à un challenge hypoxique en situation de Common Garden au Laboratoire LEMAR-Ifremer. La population de Seine a montré une large variabilité inter-individuelle dans sa tolérance à l'hypoxie. Pour la Vilaine, une distribution bimodale dans la distribution des performances des poissons à l'hypoxie a été détectée, avec une sous population résistante vs une sous population sensible, le phénotype intermédiaire étant absent. Une hypothèse a été formulée sur une localisation différentielle des deux groupes dans l'habitat estuarien, les résistants étant associés à la partie amont et les sensibles à la partie avale, moins affectée par l'hypoxie en saison estivale. Pour les individus issus du Mondego, la sous-population résistante à l'hypoxie n'est plus observée ; ce résultat suggérant que l'acclimatation et/ou l'adaptation de la population du Sud aux températures « élevées » pourrait se traduire par un coût physiologique limitant sa capacité à résister à un stress hypoxique aigu (Calvès 2011). Les processus métaboliques supportant ce « trade off » entre tolérance thermique et résistance à l'hypoxie ne sont pas connus, mais les données moléculaires précédentes suggèrent que le métabolisme énergétique est au cœur de cette interaction.

Dans une troisième étape du projet EVOLFISH, une expérience de common garden a été conduite sur des juvéniles de flet issus des 3 populations précédentes en les soumettant à des stress thermique, chimique et à du multistress (thermique + chimique) sur une période de 1 mois. Les stress thermique et chimique considérés séparément ont induit une activation du métabolisme énergétique pour les poissons du Mondego, relativement à ceux de Vilaine, alors que le multistress a clairement induit une chute du métabolisme énergétique associée à une perte de fitness (absence de croissance, perte de poids corporel) pour le groupe du Mondego relativement à celui de Vilaine. De plus, au cours de ces expériences, il a été démontré que les performances cardiaques (consommation maximale en oxygène de cardiomyocytes perméabilisés) des poissons du Mondego étaient moins sensibles à la température relativement aux deux groupes du Nord (Seine & Vilaine) ; cette performance supérieure disparaissant lors du multi-stress (Calvès 2011).

Globalement le projet EVOLFISH a mis en évidence des capacités différentielles des populations à résister aux stress environnementaux au cours de différentes expériences en situation de common garden ; une hypothèse a été formulée sur une possible adaptation locale des flets de la population périphérique du Mondego à son environnement thermique, associée à des compromis physiologiques conduisant à sa plus forte vulnérabilité en situation de multistress (Calvès 2011). Par ailleurs, il a été aussi mis en évidence une interaction possible entre stress chimique chronique et réchauffement climatique (Lavergne *et al.* 2015) ; les poissons collectés dans le système fortement contaminé (Seine) présentant une plus faible tolérance au stress thermique au laboratoire,



relativement aux poissons prélevés dans un estuaire peu contaminé, situé à une latitude similaire (Vilaine).

Au final, le Laboratoire LEMAR a ainsi mis en évidence la pertinence du modèle flet européen, pour explorer les mécanismes physiologiques et évolutifs impliqués dans la réponse et l'adaptation d'un poisson boréal, face aux changements climatiques sur l'Atlantique Nord-Est.

### 1.5 Le projet scientifique de cette thèse

Cette thèse propose une démarche intégrative incluant l'analyse des réponses moléculaires (activités enzymatiques, protéomique), des traits de vie, de la structure génétique des populations, pour approfondir nos connaissances sur les réponses adaptatives du flet européen, au réchauffement climatique. Ce projet explore également l'importance des populations périphériques situées en limite Sud de l'aire de distribution, relativement aux populations centrales, pour la conservation à long terme de la diversité génétique, et pour le maintien du potentiel évolutif d'une espèce côtière.

*Une première approche est menée en génétique de populations*, pour explorer la diversité et la structure génétique de populations de flet à l'échelle de l'ensemble de son aire de distribution (de la Norvège au Portugal, en incluant la Mer Baltique). Nous utilisons ici des marqueurs neutres hypervariables (12 marqueurs microsatellites) pour tester notamment la connectivité possible entre les populations périphériques du Sud (Portugal), et les populations centrales situées plus au Nord (Golfe de Gascogne, Manche). De plus la stabilité de la diversité génétique est évaluée par l'analyse de la variabilité temporelle intra-estuaire, sur différentes populations centrales et périphériques. Nous explorons également dans cette approche, la diversité génétique de 6 marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism), développés à partir du polymorphisme de différents gènes candidats, considérés comme potentiellement soumis à la sélection dans les systèmes estuariens (Marchand *et al.* 2010, 2013). Au final environ 1000 poissons répartis sur 15 populations (certaines présentant donc un réplica temporel) ont été génotypés. L'utilisation de marqueurs génétiques neutres et potentiellement sélectionnés devrait aboutir à une identification fine des unités de conservation, *ie* des populations ou groupes de populations présentant à la fois un isolement géographique et une adaptation locale (Hemmer-Hansen *et al.* 2014).

***Une deuxième approche de cette thèse est développée sur la bioénergétique comparée entre populations de flet.*** Cette approche a été initiée en se basant (1) sur la bioénergétique différentielle détectée entre populations de flet, dans les travaux précédents du LEMAR, et (2) sur les publications majeures de Sokolova *et al.* (2012, 2013) sur la tolérance au stress limitée par l'énergie, permettant d'intégrer les effets des stress multiples sur les populations naturelles.

Les travaux menés dans notre approche en bioénergétique s'inscrivent dans le cadre d'une expérience de common garden pour évaluer la contribution de la génétique à la variation des traits phénotypiques, et identifier de possibles patterns d'adaptation locale au sein des populations le long d'un gradient environnemental. Ce common garden implique une acclimatation d'environ 1 mois au laboratoire de juvéniles collectés dans trois estuaires (Fig.3), avant de démarrer des challenges expérimentaux. Les populations retenues présentent une stabilité interannuelle dans le recrutement et sont donc démographiquement actives ; elles sont localisées :

- en position centrale, relativement à l'aire de distribution de l'espèce, *ie* dans la Canche , un système considéré comme peu impacté par les stress environnementaux (Kerambrun *et al.* 2013) , et dans la Vilaine, un estuaire eutrophisé présentant un risque hypoxique en saison estivale ;
- en position périphérique, *ie* dans la Lima au Nord du Portugal.

On observe ici que cette approche expérimentale ne peut mettre en évidence la part de la variation des traits phénotypiques entre les populations due à la plasticité phénotypique induite avant l'échantillonnage (*ie* liée aux effets maternels, épigénétiques, ontogéniques, physiologiques, en réponses à l'environnement pré ou post natal). Cependant cette approche reste d'un intérêt majeur, car elle permet d'étudier la réponse d'individus qui sont représentatifs des pressions sélectives locales, *ie* de poissons qui ont survécu à la première phase de mortalité aigüe, durant le recrutement de juvéniles en système côtier (Harrald *et al.* 2010).

Le protocole du common garden est ici résumé succinctement. Des flets juvéniles (0+) sont ramenés et acclimatés au laboratoire, puis soumis à un stress multiple (60 jours à 21°C, un stress hypoxique étant pratiqué les 6 derniers jours où le % de saturation en oxygène de l'eau de mer a été maintenu à 40%). Divers marqueurs du métabolisme énergétique sont ciblés sur deux organes d'importance pour la gestion et le stockage de l'énergie : le foie et le muscle blanc, ce dernier représentant environ 70% du poids frais. Les activités de quatre enzymes liées au métabolisme énergétique sont mesurées, *ie* celles de la cytochrome c oxydase (CCO) et de la citrate synthase (CS) pour les enzymes mitochondriales, de la lactate deshydrogénase (LDH) pour le métabolisme anaérobie, de la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) liée au cycle des pentoses phosphates. Dans le foie et le muscle, différentes classes de lipides sont quantifiées par HP-TLC (High-Performance Thin Layer Chromatography). En parallèle de ces approches ciblées sur les

activités enzymatiques et sur les teneurs en lipides, une approche en protéomique (sans *a priori*) est réalisée sur le foie, afin de déterminer si des voies métaboliques sont activées différenciellement en situation de stress et de non-stress, entre populations centrales et population périphérique.

**La troisième approche menée dans cette thèse vise à produire des larves F1 en common garden, à partir du croisement entre adultes matures, capturés en hiver dans les estuaires précédents (Canche, Vilaine, Lima).** Le développement de ces descendants F1 est suivi et challengé au stade larvaire, en limitant les effets de la plasticité phénotypique au cours des tout premiers stades, et en évaluant ainsi la possible différenciation génétique entre les populations.

Dans la nature, les larves de flet sont principalement observées dans le plancton de Février à Avril ; durant cette période, et sur la dernière décennie, le gradient thermique observé du Nord de la France au Portugal se traduit par une température moyenne de surface de la mer sur le plateau continental, en face des estuaires, variant de 8°C à 14°C (Martinho *et al.* 2013). Aussi, les larves F1 de chaque estuaire sont exposées à un gradient thermique reflétant le gradient naturel (8°C, 10°C, 12°C, 14°C). Les normes de réaction de la croissance larvaire à (taille à l'éclosion, à l'ouverture de la bouche, mais aussi taille du vitellus) sont donc étudiées par population et comparées. Nous recherchons donc ici à révéler les causes de la variabilité phénotypique, différenciation génétique ou plasticité phénotypique, dans les performances de croissance entre populations le long du gradient latitudinal.

### 1.6 Plan de présentation de cette thèse

Suite à cette introduction (**chapitre 1**), l'intérêt des principaux outils mis en œuvre au cours de la thèse sera présenté (**chapitre 2**) en ciblant : la génétique de populations, l'approche en bioénergétique et l'évaluation des normes de réaction sur les stades embryo-larvaires, et pour finir le développement zootechnique sur la production larvaire de flets.

Les travaux sur la diversité génétique des populations de flets seront décrits sous la forme de deux publications (une note technique sur l'obtention de nouveaux marqueurs génétiques sur le flet, et un article sur la structure génétique de cette espèce à l'échelle de l'Europe) (**chapitre 3**).

L'approche en bioénergétique à partir de notre expérience en common garden sur les stades juvéniles sera présentée sous la forme de deux drafts de publication (**chapitre 4**) ; un premier développement sur l'approche ciblée sur le métabolisme énergétique et l'état des réserves, un deuxième développement sur l'approche protéomique sans *a priori*.

L'évaluation des normes de réaction des stades embryo-larvaires sera exposée sous la forme d'un draft de publication (**chapitre 5**).

Enfin, ce mémoire de thèse s'achèvera par une discussion générale et des perspectives de recherche (**chapitre 6**).

## Chapitre II : Principaux outils mis en œuvre



## 2.1 Génétique de populations

### Questions explorées par la génétique de populations

La génétique de populations est une discipline scientifique qui explore comment le polymorphisme génétique (ie la variation de l'ADN) est distribuée dans les populations, dans l'espace et dans le temps. Ainsi, sur l'aire de distribution d'une espèce, on peut généralement identifier différentes populations (ou dèmes, ou unités de reproduction) présentant une certaine stabilité spatio-temporelle.

Rappelons les définitions de base en génétique de populations :

- un gène correspond à une entité physique d'ADN transmise du parent à sa descendance
- un locus identifie la position occupée par un gène sur un chromosome
- un allèle correspond à l'une des différentes formes que peut prendre un locus (un organisme diploïde présentant deux allèles paternel et maternel identiques pour un locus donné est qualifié d'homozygote, et d'hétérozygote si les deux allèles sont différents).

La variabilité génétique d'une population naturelle peut être décryptée en répondant aux questions suivantes : est-elle forte ou faible ? Quelle est son origine ? Comment cette variabilité peut-elle se maintenir ou pas ? Quelle est la signification écologique et évolutive de cette variabilité ? La génétique de populations va donc s'intéresser aux génotypes, mais aussi aux relations génotypes-phénotypes, en considérant particulièrement les phénotypes déterminant les possibilités de survie et de reproduction.

### Les principales forces évolutives et leurs effets sur la diversité génétique

Dans la nature, les populations d'une espèce donnée distribuées au sein d'une aire de répartition sont généralement soumises à des contraintes environnementales (journalières, saisonnières et parfois inter-annuelles) très contrastées. Ces populations peuvent se retrouver isolées, par la distance ou par la présence de barrières environnementales, ce qui peut conduire à une différenciation génétique qui est sous l'emprise de quatre forces évolutives majeures (Conner & Hartl 2004). Trois d'entre elles tendent à augmenter le niveau de différenciation entre populations : la mutation, la dérive génétique et la sélection naturelle. La quatrième force évolutive est la migration génétique (ou flux génique) qui correspond aux mouvements plus ou moins permanents de gènes d'une population vers une autre, assurés par les individus d'une population qui vont se reproduire dans une autre population. La migration, contrairement aux trois forces évolutives précédentes, tend à homogénéiser le pool génétique et donc à réduire la différenciation génétique entre les populations.

La mutation est la source fondamentale de création de nouvelle variabilité génétique au sein d'une population. C'est un processus qui produit un allèle différent de l'allèle ancestral ; il est souvent lié à des erreurs lors de la phase de réplication de l'ADN. La mutation est un phénomène rare sur un gène fonctionnel (ie une séquence d'ADN codant pour une protéine), mais peut être très fréquente sur des régions non codantes (a priori considérées comme neutres, ie non sujettes à la sélection), comme les marqueurs microsatellites qualifiés de loci hypervariables.

La dérive génétique est un phénomène aléatoire qui se traduit par une modification possible des fréquences alléliques d'une génération à la suivante, au sein d'une population. En effet, les gènes de la descendance représentent souvent un échantillonnage non parfait des gènes parentaux, particulièrement si la population est de petite taille. Le risque de perte d'allèles, et donc de variabilité génétique, par la dérive, est inversement proportionnelle à la taille de la population. Toute disparition d'allèle peut avoir des conséquences graves pour une population, voire pour l'espèce considérée, car la valeur adaptative de certains allèles ne s'exprime pas forcément dans les conditions écologiques actuelles, mais pourrait s'exprimer dans les conditions futures. Notons que la dérive conduit de plus à une divergence des fréquences alléliques entre les populations, particulièrement si elles sont de petites tailles, et donc à une différenciation génétique accrue entre les populations au cours du temps. Un paramètre très étudié en génétique de populations est la taille efficace :  $N_e$  (Conner & Hartl 2004) dont on peut donner une définition simplifiée, en considérant qu'elle représente une estimation du nombre de géniteurs qui participent à l'effort de reproduction dans une population, et qui ont une descendance viable. Pour une population idéale (nombre de géniteurs très grand, sex ratio = 1, probabilité de succès reproducteur identique pour les différents géniteurs, générations non chevauchantes, pas de migration, mutation, sélection) :  $N_e = N$ , avec  $N$  correspondant au nombre total de géniteurs. Dans toutes les populations naturelles,  $N_e$  est généralement très inférieure à  $N$ , par la fenêtre environnementale étroite généralement associée à la survie larvaire, se traduisant par une survie effective de larves issues de relativement peu de familles, malgré le nombre potentiellement considérable de géniteurs dans certaines populations. En génétique de populations, on observe que la dérive génétique est inversement liée à la taille efficace de la population, ie une dérive forte est associée à un  $N_e$  faible, et une dérive faible à un  $N_e$  fort. La taille efficace est donc un paramètre d'intérêt majeur pour le suivi des populations naturelles particulièrement de petites tailles, dans le cadre notamment de la biologie de la conservation. Les méthodes temporelles d'estimation du  $N_e$  (basées sur la variabilité des fréquences alléliques dans une population, sur plusieurs générations) ont été développées sur différents taxons (plantes, salmonidés, amphibiens) avec un certain succès ; actuellement de gros développements méthodologiques sont en cours, pour estimer la taille efficace instantanée des populations, une des méthodes les plus robustes étant basée sur le déséquilibre de liaison entre loci (Antao et al. 2010, Waples & Do 2010, Do et al. 2014).

Enfin, la dernière force évolutive façonnant la diversité génétique des populations naturelles est la sélection qui affecte les régions du génome dont des variations ont des conséquences directes sur la fitness des individus portants ces variations. Les individus ayant la meilleur fitness survivent et participent davantage à la reproduction dans une population, relativement aux individus moins « performants », transmettant ainsi leurs gènes de manière préférentielle à la génération suivante. A l'issue de quelques générations successives, la population pourra donc refléter une adaptation génétique.

### Evolution de la diversité et de la structure génétique des populations *in natura*

Si nous dressons un bilan de l'action des principales forces évolutives agissant sur la diversité génétique des populations naturelles, on remarque que quelle que soit la nature des loci considérés (neutres, ou potentiellement soumis à une pression de sélection), ils seront tous soumis aux effets antagonistes de la migration et de la dérive génétique, sur la différenciation génétique inter-populationnelle. Certaines populations pourront présenter un équilibre migration/dérive et donc une certaine stabilité temporelle dans leur diversité génétique et leur niveau de différenciation inter-populationnelle ; à l'inverse d'autres populations, caractérisées par une instabilité démographique, comme des réductions massives de leurs effectifs certaines années (ou goulots d'étranglement démographiques), pourront présenter les conséquences d'une dérive forte, ie une perte de diversité allélique, une instabilité temporelle de leur diversité génétique et une différenciation accrue relativement aux autres populations. Nous avons vu par ailleurs que la mutation est un phénomène rare qui ne modifie pas a priori la diversité génétique des populations à court ou moyen terme.

La sélection peut quant-à elle exercer une pression majeure sur les populations naturelles, sur les loci considérés comme « non neutres » (ie codant pour des protéines fonctionnelles, ou localisés à proximité de loci sous sélection, sur le même chromosome) ; les effets souvent « diversifiant » de la sélection étant clairement en opposition aux effets « homogénéisant » de la migration. La résultante de la sélection exercée sur une population, dans un environnement donné, peut se traduire par une adaptation locale, ie les génotypes « résidants » ayant une plus forte fitness dans leur habitat de naissance que ne l'auraient les génotypes « étrangers », identifiés dans des populations éloignées (Kawecki & Ebert 2004). Un nombre croissant d'études soulignent que si l'adaptation locale en milieu marin était considérée comme un phénomène marginal il y a deux décennies de par les fortes capacités de dispersion des espèces, on s'aperçoit qu'en réalité une forte proportion d'invertébrés et vertébrés marins montrent des adaptations locales en dépit de phases planctoniques de dispersion parfois longues (Conover et al. 2006 ; Sanford & Kelly 2011 ; Munday et al. 2013). Le type de marqueur génétique est capital pour interpréter correctement une différenciation génétique entre



populations, en effet la différenciation associée à des loci sous sélection peut être observée malgré un fort flux génique entre les populations, de telle manière que les populations qui apparaissent homogènes pour des loci neutres, peuvent présenter une adaptation locale (Conover et al. 2006). Des travaux récents confirment ainsi que l'utilisation combinée de loci neutres et non neutres améliore considérablement nos connaissances sur la structure génétique des populations de poissons marins dans l'Atlantique Nord-Est ; ces résultats devant conduire à terme, à une meilleure identification et conservation des populations présentant une diversité génétique originale (Limborg et al. 2012 ; Teacher et al. 2013 ; Hemmer-Hansen et al. 2014).

## 2.2 Approche en bioénergétique

Rappels sur l'énergétique cellulaire (Amérand 2006, Tortora & Derrickson 2007)

Chez les animaux, organismes hétérotrophes, l'énergie est obtenue par oxydation de différents composés obtenus par voie alimentaire (glucides, lipides et protéines). Les éléments macromoléculaires obtenus par l'alimentation sont tout d'abord métabolisés par voie digestive en oses, acides aminés, glycérol et acides gras. Ces composés vont ensuite suivre différentes séquences métaboliques ; la production d'énergie au niveau cellulaire sous la forme d'ATP pouvant être la résultante de séquences dites aérobies, nécessitant de l'oxygène, ou de séquences anaérobies en absence d'oxygène.

**La production d'ATP par le métabolisme aérobie** (la respiration cellulaire) résulte de trois chaînes de réactions successives:

- le glucose sanguin passe dans la cellule, ie dans le cytosol, et va servir de substrat à la **glycolyse** qui le transforme en pyruvate.
- le pyruvate est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale, la mitochondrie possédant une double membrane qui délimite un compartiment soluble appelé matrice ; le pyruvate sert alors de substrat pour le **cycle de Krebs** qui va produire essentiellement du CO<sub>2</sub>, de l'ATP, du NADH + H<sup>+</sup> et de la FADH<sub>2</sub> ;
- NADH + H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> vont être re-oxydés au niveau de la **chaîne respiratoire** (Fig. 4) ; leurs électrons sont ainsi transportés au travers des différents complexes de la chaîne respiratoire jusqu'à leur accepteur final, l'oxygène. La chaîne respiratoire est composée de 4 complexes enzymatiques (I, II, III, IV) et de deux éléments mobiles : l'ubiquinone (UQ) et le cytochrome c (Cyt c). La **phosphorylation oxydative** est le couplage de cette chaîne respiratoire avec un cinquième complexe (V) responsable de la formation de l'ATP. L'essentiel des complexes assurant la phosphorylation

oxydative est inséré dans la membrane interne mitochondriale.

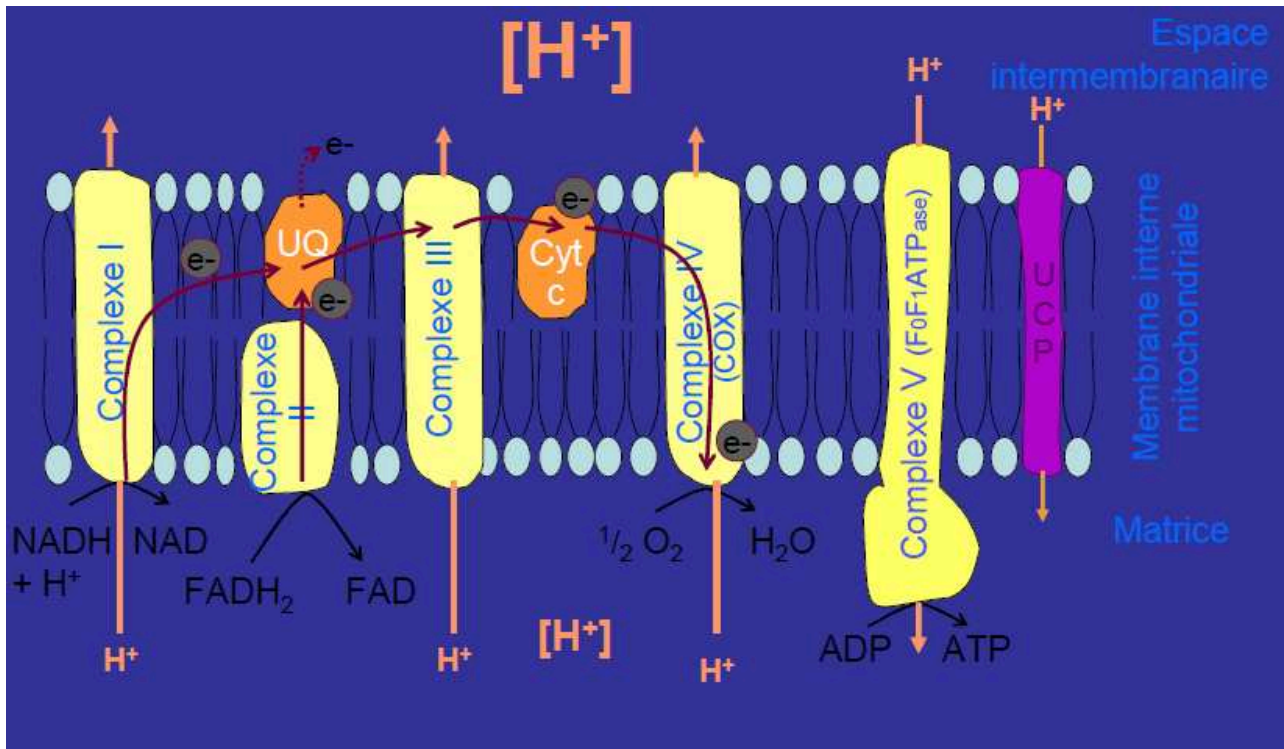


Figure 4: Fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative (Amérand 2006)

Le complexe I permet le transfert de deux électrons transportés par  $\text{NADH} + \text{H}^+$  vers l'ubiquinone, couplé à un transfert de proton  $\text{H}^+$  contre gradient, de la matrice vers l'espace intermembranaire. La concentration en  $\text{H}^+$  est donc plus importante dans l'espace intermembranaire que dans la matrice. Le complexe II assure le transfert de deux électrons vers l'ubiquinone, par l'oxydation des flavines ( $\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD}$ ). Les ubiquinones sont des transporteurs d'électrons mobiles qui font le lien entre les complexes I, II et le complexe III. C'est à ce niveau qu'il existe une fuite d'électrons responsable de la **production de ROS (Reactive Oxygen Species)**. Le complexe III permet le transfert des électrons vers un deuxième transporteur mobile, le cytochrome c, qui s'accompagne d'un transfert de  $\text{H}^+$  vers l'espace intermembranaire. Au final le cytochrome c achemine les électrons vers le complexe IV soit la cytochrome oxydase (COX) ; on observe au niveau de ce dernier complexe un pompage de  $\text{H}^+$  et une réduction de l'oxygène en eau.

L'activité de transfert des  $\text{H}^+$  par les complexes I, III, IV crée et renforce un gradient de concentration en  $\text{H}^+$  important de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient électrochimique assure un potentiel de membrane permettant notamment la phosphorylation de l'adénosine diphosphate ADP en ATP. Ce gradient de proton conduit les  $\text{H}^+$  à retourner dans la matrice au travers du complexe V ( $\text{F}_0\text{F}_1 \text{ATPase}$ ) qui utilise l'énergie libre du gradient pour former des molécules avec des liaisons fortes en énergie, sous forme d'ATP ; ie il existe une relation directe

(couplage) entre le retour des protons dans la matrice et la production d'énergie sous forme d'ATP. Le couplage de la phosphorylation oxydative est plus ou moins actif en fonction de la disponibilité en ADP par exemple. On décrit deux stades respiratoires :

- le stade 4 caractérisé par le seul fonctionnement de la chaîne respiratoire sans phosphorylation ; il s'agit alors d'une diffusion simple de  $H^+$  selon le gradient de concentration, et sans activation du complexe V ; en effet il existe une **fuite de protons** au travers des protéines découplantes (UCP de l'anglais : uncoupling protein, voir Fig. 4) qui permet de dissocier la phosphorylation oxydative du retour des protons dans la matrice, et donc de maintenir une consommation basale en oxygène au stade 4 ;

- par contre, au stade 3, soit en présence d'ADP, il y a stimulation de la synthèse d'ATP et donc de la chaîne respiratoire. En situation in vivo, de par la présence de la fuite de protons, la mitochondrie est dans un état intermédiaire entre les stades 4 et 3, donc en situation de couplage variable entre la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ATP. Cette fuite de protons semble avoir plusieurs rôles comme le contrôle du potentiel de membrane, de l'efficacité de la synthèse d'ATP, ou encore la régulation de la production de ROS.

On estime que les divers transferts d'électrons de la chaîne de phosphorylation oxydative conduisent à la production de 34 molécules d'ATP par molécule de glucose fournie.

**De l'ATP peut également être formé en l'absence d'oxygène, dans des séquences dites anaérobies.** En l'absence d'oxygène, la séquence décrite précédemment ne peut alors fonctionner. Le système essentiel de fourniture d'ATP en anaérobie est lié à l'oxydation du glucose (issu par exemple du glycogène musculaire) qui sera transformé en pyruvate par la glycolyse, puis en lactate sous l'action de la lactate déshydrogénase (LDH). L'anaérobiose fournit deux moles d'ATP par mole de glucose oxydée et présente donc un rendement nettement inférieur à celui de l'aérobiose.

### Mitochondrie et stress oxydant

Comme nous venons de le voir, les mitochondries produisent la plus grosse partie de l'énergie demandée par les tissus en aérobiose, par la phosphorylation oxydative. Parallèlement à leur implication dans la bioénergétique, les mitochondries sont les sources majeures de production intracellulaire de ROS, considérés comme des sous produits de la chaîne de transport d'électrons (Meany et al. 2006) ; aussi un accroissement du taux d'activité métabolique sera associé avec une plus forte production de ROS au niveau mitochondrial (Heininger 2002).

Les ROS sont produits par le transfert d'un électron libre vers l'oxygène moléculaire (Fig.5). Le transfert du premier électron génère l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le second (avec deux protons) produit

le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction de Fenton, qui inclue du fer ferreux, produit ensuite le radical hydroxyl, qui peut être au final transformé en H<sub>2</sub>O.

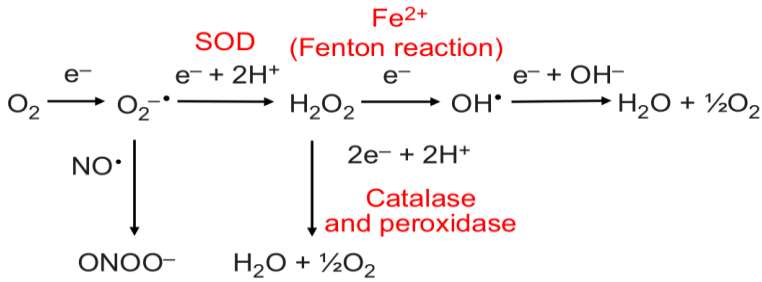


Figure 5: Génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS), in Tomanek (2015)

Les ROS peuvent induire une oxydation des protéines, des dommages à l'ADN, et peuvent endommager les membranes en générant des peroxydations lipidiques (Chang & Roots 1985, Genova et al. 2004). Les mitochondries sont donc susceptibles de devenir les premières cibles pour les dommages moléculaires induits par les ROS. Ceci pouvant conduire à des perturbations du métabolisme mitochondrial et à leur dégénérescence (St Pierre et al. 2002).

Des imperfections dans le transport des électrons à travers différents complexes mitochondriaux pourraient être responsables d'un excès de production de ROS (Ide et al. 1999). La fuite de protons pourrait de plus jouer un rôle important au niveau de la modulation de la production de ROS (Korshunov et al. 1997, Brand 2000) : ie un découplage d'intensité moyenne de la phosphorylation oxydative par la fuite de protons, limiterait le flux d'électrons entre les complexes I et III, et conduirait ainsi à limiter la production de ROS. Un niveau de fuite de proton approprié face à la reproduction et aux fortes températures estivale permettrait ainsi de contenir la production de ROS pour certains invertébrés (Keller et al. 2004).

Dans le but de limiter la production de ROS, différents enzymes antioxydants sont identifiés chez les invertébrés et vertébrés (Fig. 5) ; une synthèse sur le thème étant développée par Tomanek (2015). La première ligne de défense est la super-oxyde dismutase (SOD), une métalloprotéine qui converti le O<sub>2</sub><sup>·-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans la mitochondrie, la SOD est associé à un manganèse, et dans l'espace intermembranaire et le cytosol à un atome de cuivre ou zinc. La catalase (CAT) et la glutathione peroxidase (GPx) sont deux hémoprotéines dont le rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène. Enfin, la glutathion S-transférase est une enzyme de détoxification de phase deux, qui se conjugue à des molécules électrophiles néfastes afin de faciliter leur excréation. Aux activités enzymatiques antioxydantes précédentes, il faudrait aussi prendre en compte les antioxydants non enzymatiques produits pas la cellule comme le glutathion, et les vitamines E,A,C.

Au final, la revue bibliographique précédente souligne que nous n'avons encore que très peu

de connaissances sur les capacités des ectothermes à moduler leurs défenses anti-oxydantes pour faire face à une probable augmentation de la production de ROS au niveau mitochondrial, suite à une exposition à des épisodes de stress thermiques dont la fréquence devrait augmenter sous l'effet du réchauffement climatique global.

Composition lipidique des membranes cellulaires & propriétés fonctionnelles des mitochondries (Charmentier & Charmentier 2006)

Les lipides membranaires appartiennent principalement au groupe des phospholipides. L'ensemble des lipides intervient pour environ 50% dans la composition chimique globale des membranes. Tous les phospholipides sont dérivés de l'acide phosphatidique auquel sont ajoutés d'un côté deux « queues » hydrophobes d'acides gras et de l'autre une « tête » hydrophile. L'ensemble constitue une structure dite amphiphile avec une partie polaire et une partie apolaire situées dans deux régions distinctes de l'espace. En milieux aqueux les lipides s'organisent automatiquement en bicouche (partie hydrophobes tournées vers l'intérieur et parties hydrophiles tournées vers l'extérieur). La nature des têtes et des queues est très variable ; les têtes les plus fréquentes étant la choline, l'éthanolamine, la sérine et l'inositol. Les phospholipides structurés sur cette base formeront respectivement les groupes de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphoéthanolamine (PE), de la phosphosérine (PS) et du phosphatidylinositol (PI). Les PC et PE sont majoritaires, les premiers sont surtout présents sur la partie externe de la bicouche, les PE étant surtout présents sur la partie interne, en contact avec le cytosol. Les acides gras donnant les queues hydrophobes sont nombreux, leur longueur variant entre 12 et 24 atomes de carbone ; ils peuvent être saturés ou insaturés, et présentent donc dans ce dernier cas avec un nombre de doubles liaisons allant de 1 à 6.

Les acides gras constituant la partie centrale des bicouches leur confèrent les caractéristiques d'un liquide huileux ; ils régissent la fluidité plus ou moins grande des membranes. Cette fluidité a une grosse importance physiologique car elle conditionne notamment les possibilités d'insertion et les mouvements des divers éléments constitutifs comme les protéines ; elle est fonction de la conformation et de la nature des acides gras constitutifs. Cette fluidité est variable avec la température ; une diminution de celle-ci se traduisant par une diminution de la fluidité qui peut s'avérer néfaste au fonctionnement des membranes. Un processus d'acclimation ou adaptation a été décrit dans les populations naturelles (**homeoviscous adaptation : HVA**) ; il est lié à la variation de la composition en acides gras des lipides. Les acides gras à courtes chaînes et insaturés (présentant des doubles liaisons carbone – carbone) sont plus fluides que ceux à longues chaînes et complètement saturés. Les ectothermes des régions froides présentent donc en conséquence une augmentation du nombre d'acides gras insaturés au sein des membranes cellulaires, permettant donc de maintenir la

fluidité membranaire et donc d'assurer un fonctionnement normal des cellules.

Les lipides peuvent agir comme des co-facteurs pour certaines protéines de membrane et des travaux récents démontrent que le fonctionnement de la mitochondrie dépend de lipides structuraux spécifiques et de leur composition en acide gras. Ainsi, la composition en acide gras des phospholipides de la membrane interne mitochondriale explique une grande partie de la variabilité de la fuite de proton basale au niveau mitochondrial, pour beaucoup d'espèces animales (Brand et al. 1991 ; Hulbert & Else 2005). Les cardiolipides représentent une classe de phospholipides avec une structure unique de diphosphatidylglycerol qui est localisée quasiment exclusivement dans la membrane interne mitochondriale ; ces cardiolipides avec leur acides gras associés sont des facteurs d'activation/désactivation des complexes intégrés de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale incluant les complexes I et III (Schlame & Ren 2006, Schlame et al. 2000, 2005). Quand la composition en acides gras est modifiée, des activités spécifiques des protéines membranaires peuvent être modifiées, conduisant à une modulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative mitochondriale (consommation d'oxygène / production d'ATP) (Yamaoka et al. 1988, Watkins et al. 1998), de la production de ROS (Paradies et al. 2002). Les quantités de cardiolipides sont inversement corrélées avec la production de ROS et corrélées avec le potentiel de membrane mitochondrial (Huang et al. 2006). On remarque par ailleurs que les cardiolipides sont impliqués dans la régulation de la fuite de proton (Hoch 1998). Pour finir, des observations parallèles sur la modification de la composition en acide gras des cardiolipides en lien avec les activités de la cytochrome C oxydase, ont été faites sur la truite (*Oncorhynchus mykiss*) et sur un mollusque bivalve (*P. magellanicus*), durant des acclimatations thermiques ; elles démontrent que la régulation des lipides membranaires dans les mitochondries musculaires chez ces ectothermes serait fortement associée à la composition des chaînes carbonatées du cardiolipide (Kraffe et al. 2007, 2008). Globalement, on peut considérer que les cardiolipides jouent un rôle majeur dans le fonctionnement de la chaîne de transport d'électron au niveau mitochondrial, dans la régulation de la fuite de protons et dans l'accrochage spécifique du cytochrome C dans une zone stratégique de la chaîne de transport d'électrons.

### Réserves lipidiques

Ce sont les triglycérides (ou triacylglycérols), appartenant à la classe des lipides neutres qui constituent la réserve énergétique la plus importante de l'animal ; ils se composent d'un tri-esters de glycérol et de trois acides gras. Selon les espèces de poissons, cette réserve d'énergie peut être stockée dans le foie, le muscle, le tissu adipeux périviscéral ou sous-cutané (Ando et al. 1993). Un indice de stockage lipidique communément utilisé chez les poissons est estimé par le rapport entre la quantité



de triacylglycérols (TAG : réserve lipidique) et la quantité de stérols (ST : incorporés dans la structure des membranes cellulaires). On observe que les teneurs en TAG sont reliées à l'état nutritionnel du poisson, les TAG étant fortement mobilisés durant une période de stress, alors que les teneurs en stérols restent essentiellement inchangées (Galois et al. 1990, Kerambrun et al. 2013).

### **Bioénergétique & tolérance au multistress dans les populations naturelles**

Les populations marines sont soumises de manière croissante au multistress, étant exposées aux effets de différents facteurs de forçage à échelle globale (réchauffement climatique, acidification des eaux) et à échelle locale (eutrophisation, hypoxie, contamination chimique,..). On observe que ce sont les espèces côtières et estuariennes qui vont être particulièrement soumises au multistress de par : leur habitat peu profond très exposé au réchauffement climatique, les modifications du régime de salinité des eaux de transition, leur exposition directe aux rejets des activités anthropiques (agricoles, domestiques et industrielles). On considère dans cette thèse qu'un stress est un facteur environnemental qui conduit à une perturbation physiologique de l'individu, se traduisant par une perte de fitness (Schulte 2014).

Dans une méta-analyse sur les effets de multiple stress dans les populations marines, Crain et al. (2008) soulignent que les stressseurs peuvent interagir de plusieurs manières. Cette interaction est additive quand l'effet du multi-stress sur le biomarqueur mesuré est la somme des stress séparés, mais elle peut aussi être synergique (supérieure à la somme) ou multiplicative (égale ou supérieure au produit des effets des stress séparés). Cette étude fait le bilan de 171 travaux impliquant 2 stressseurs (et plus), et observe que quand le nombre de stressseurs s'accroît dans un système (plus de 2), les interactions deviennent complexes et plus communément synergiques. Ce travail souligne par ailleurs qu'il devient particulièrement urgent de mieux comprendre les interactions entre stressseurs, pour mieux définir les stratégies de conservation des populations.

Le déclin des espèces est souvent lié aux impacts combinés et négatifs de multiple stressseurs, ainsi le déclin de nombreuses populations d'amphibiens (très étudié au niveau mondial) est lié aux effets conjoints de la perte d'habitat, des contaminants et des changements climatiques (Sih et al. 2011) ; une espèce pouvant montrer une réponse adaptative face à un nouveau stressseur, mais peut décliner au final de par sa faible performance relativement à un autre facteur de forçage (Roggel et al. 2009).

Dans une synthèse sur l'impact du stress environnemental sur des poissons estuariens vivant en environnement variable, Schulte (2014) considère que ces espèces ont des capacités de résistance à court terme ainsi qu'une plasticité à long terme face à des modifications de température, salinité et d'oxygène dissous ; la variation de la capacité des populations à s'acclimater à ces stressseurs

suggérant une possible adaptation locale exprimée au niveau biochimique et moléculaire, notamment au niveau du métabolisme énergétique.

Cette thèse va donc développer une approche expérimentale ciblée sur la bioénergétique pour détecter de possibles capacités de résistance différentielle des populations face à un multi-stress (stress thermique & hypoxique). Nous nous inscrivons pleinement dans le cadre du travail conceptuel de Sokolova (2012, 2013) qui propose d'intégrer les effets des stress multiples, en analysant la réponse aux stress des individus, limitée par l'énergie ; son travail se concentre donc sur les effets des stressseurs au niveau de la bioénergétique, comme un outil intégrateur de la physiologie et de l'écologie fonctionnelle, pour évaluer le risque écologique dans les populations naturelles, et pour identifier les habitats assurant la viabilité des populations. Sokolova (2013) décrit ainsi quatre stades majeurs caractérisant le statut bioénergétique d'une population face à un stress d'intensité croissante (optimum, pejus, pessimum, stade léthal) (Fig.6).



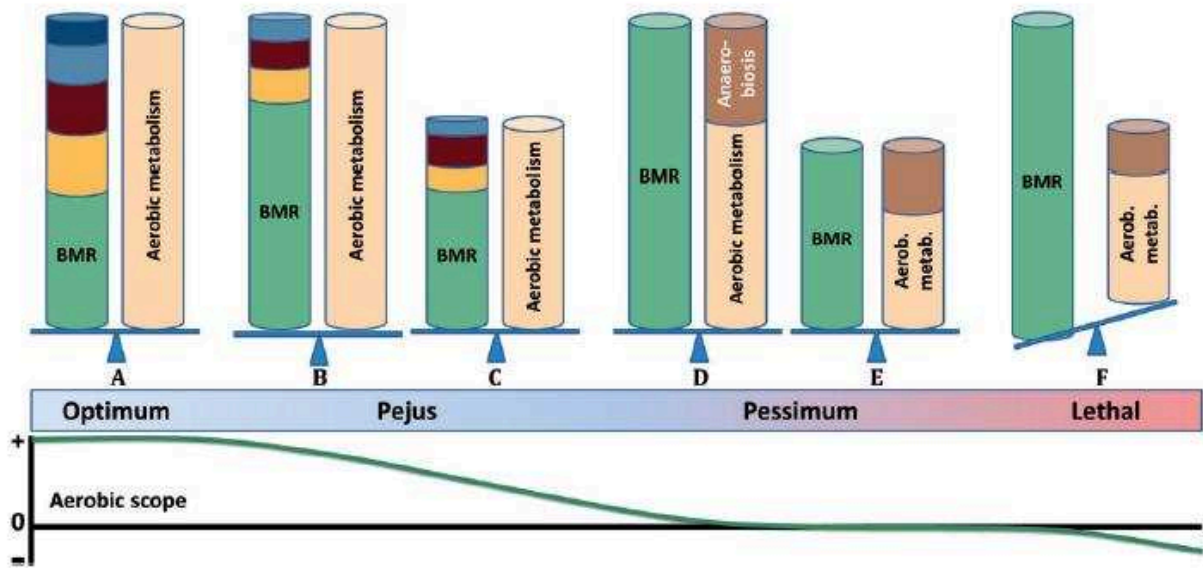


Figure 6: La tolérance au stress limitée par l'énergie, pour évaluer les impacts du multistress

L'énergie produite par un organisme peut être allouée à cinq unités d'allocation de l'énergie (Fig.6) : le métabolisme basal (Basal Metabolic rate : en vert), l'activité (en orange), la reproduction (rouge foncé), la croissance (bleu clair) et le stockage d'énergie (bleu foncé).

la production d'énergie peut être réalisée par le métabolisme en aérobose (rose) voire en anaérobiose (brun).

**A « Optimum »**, le registre métabolique « Aerobic scope » est maximal ; il reflète la différence entre la consommation en oxygène d'un animal en activité soutenue et celle liée au métabolisme basal, ie c'est un indicateur du potentiel d'énergie qu'un organisme peut placer dans des fonctions autres que les fonctions de survie. On remarque un équilibre entre l'énergie dépensée et celle produite par l'aérobose.

**B « Pejus »**, pour un stress modéré, les coûts de la maintenance sont accrus (énergie additionnelle à fournir, pour la protection relativement au stress et pour la réparation des dommages).

**C « Pejus »**, l'intensité du stress s'accroît, avec notamment une altération possible dans l'assimilation de la nourriture ou dans la production d'énergie par aérobose, conduisant à un déclin du registre métabolique.

**D « Pessimum »**, pour un stress fort, l'augmentation progressive de la demande en ATP pour la maintenance et/ou l'altération progressive de l'aérobose dépasse la fourniture d'ATP possible par l'aérobose. Le registre métabolique est quasiment nul et le métabolisme énergétique se réoriente vers une anaérobiose partielle ; ceci fournissant l'énergie pour la maintenance et permettant la survie de l'organisme pour un certain temps.

**E « Pessimum »**, la survie peut être accrue par une dépression du taux d'activité métabolique qui réduit le turnover énergétique (limitant les fonctions demandeuses d'ATP, non essentielles pour la survie).

**F « Lethal »**, en situation de stress majeur, l'équilibre entre la production et la demande en énergie est rompu de manière constante, le registre métabolique devient négatif et l'animal est conduit à la mort.

### 2.3 Evaluation des normes de réaction sur les stades embryo-larvaires

Un des objectifs de cette thèse est de considérer les variations de sensibilité du poisson aux stressseurs environnementaux, au cours de son cycle biologique, en se focalisant essentiellement sur les stades embryo-larvaires et juvéniles. Cette approche ontogénique dans l'étude de la réponse aux stress est particulièrement pertinente pour permettre aux scientifiques de mieux modéliser et prédire, dans le futur, les altérations du fonctionnement des populations naturelles face à différents scénarios climatiques (Rijnsdorp et al. 2009). On remarque que peu d'informations sont disponibles sur l'impact du changement climatique sur le développement des œufs et sur la survie larvaire, pour les poissons côtiers (Gillanders et al. 2011).

Si des populations diffèrent par leurs traits d'histoire de vie (taux de croissance aux premiers stades de vie, survie larvaire,...) en milieux naturels, ces différences peuvent être parfois considérées comme reflétant une divergence adaptative entre les populations, alors qu'elles peuvent être simplement liées à la plasticité phénotypique qui s'exprime dans des milieux contrastés. Rappelons que la plasticité phénotypique est la capacité qu'à un génotype de produire différents phénotypes, sous différentes conditions environnementales.

A l'inverse, un manque de différences phénotypiques dans la nature, ne met pas forcément en évidence une similarité génétique entre les populations (Haugen & Vøllestad 2000 ; Marcil et al. 2006). Quand les effets des génotypes s'opposent aux effets de l'environnement, un pattern qualifié de « variation contregradient » peut alors conduire à une similarité phénotypique entre populations qui reflète alors une divergence génétique entre elles; un exemple classique dans la littérature concerne un poisson estuarien, *Menidia menidia*, dont le taux de croissance augmente avec la latitude le long de la côte Nord Est Américaine, et compense exactement la réduction de la saison de croissance vers les hautes latitudes (Conover et al. 2009).

Ainsi, pour étudier la divergence génétique entre populations, en considérant les caractères phénotypiques comme les traits d'histoire de vie, il est nécessaire de séparer les composantes génétiques et environnementales agissant sur ces traits par des expériences de « common garden » (CG) qui ont montré leur efficacité pour déterminer les bases génétiques des différences phénotypiques entre groupes ou populations. Ces CG consistent à produire une ou plusieurs générations successives au laboratoire (F1, F2,...) dans des conditions identiques, en éliminant ainsi les différences environnementales entre les groupes ou populations (Marcil et al. 2006). Au cours de ces expériences comparant les performances de différentes populations, la plasticité peut être décrite graphiquement par une norme de réaction, ie une fonction linéaire ou non linéaire qui présente comment les individus d'une population répondront en moyenne à des modifications d'une variable environnementale.

Une littérature récente met clairement en évidence une différenciation d'origine génétique dans les normes de réaction thermiques entre les populations de poissons d'eau douce, anadromes ou marins, pour des traits liés au développement embryonnaire (Hutchings et al. 2007, Jensen et al. 2008, Bauman & Conover 2011, Hutchings 2011). Ces travaux soulignent que la plasticité est un caractère héritable et que les normes de réaction différentes entre populations peuvent refléter une adaptation locale en réponse à la sélection naturelle.

Nous présentons ici à titre d'exemple (Fig. 7), les normes de réaction thermiques pour des traits d'histoire de vie sur stades précoces, mesurés sur 4 populations danoises de truite (*Salmo trutta*) en situation de CG, en fonction de la température d'élevage (2, 5, 8°C) (Jensen et al. 2008)

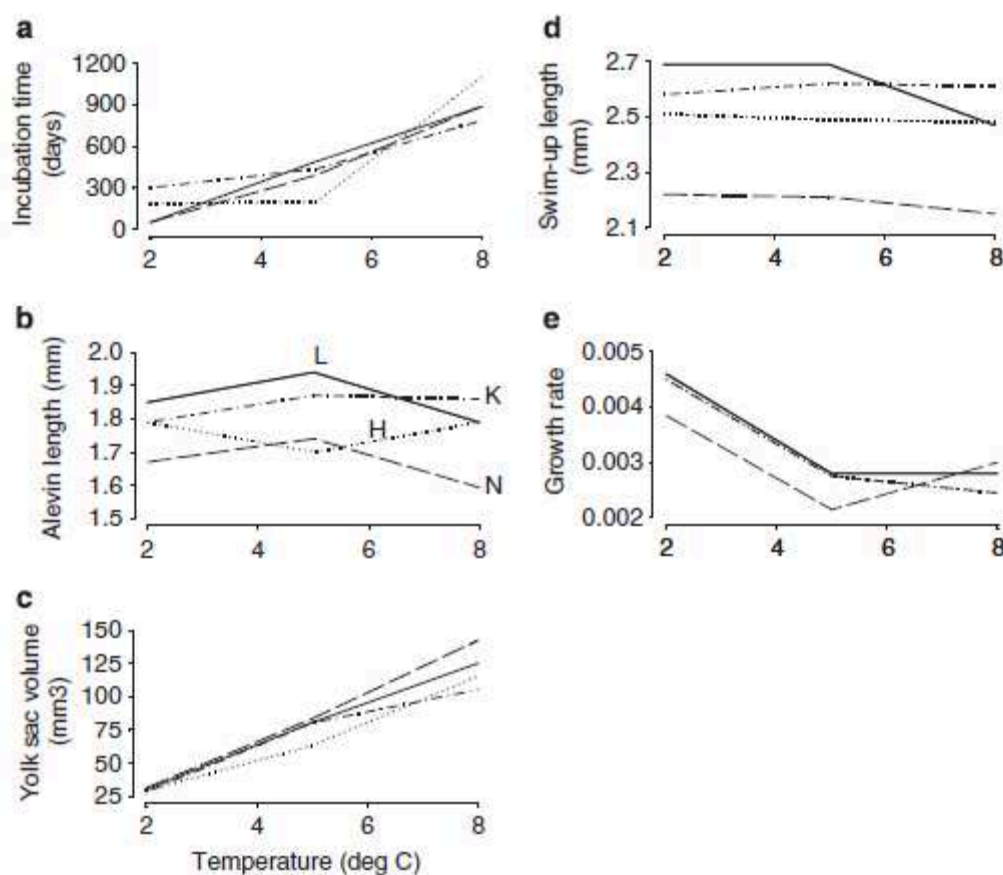


Figure 7: Normes de réaction sur les traits d'histoire de vie de stades précoces, pour 4 populations de truites danoises (*Salmo trutta*) en fonction de la température d'élevage (2, 5 et 8°C) (Jensen et al. 2008)

On peut remarquer un effet de la température pour 3 traits particuliers, b : longueur moyenne de l'alevin, d : « Swim-up length » : la taille à la première prise de nourriture, e : le taux de croissance ; cette variation inter-populationnelle est en adéquation avec les régimes de température expérimentés par les populations, dans leurs environnements de naissance.

## 2.4 Développement zooteknique sur la production larvaire de flets

L'acclimatation au laboratoire de flets sauvages a nécessité un investissement important au cours de cette thèse, avec un investissement journalier allant de 20 min à 5 h par jour entre l'arrivée de géniteurs en Novembre jusqu'à la fin des manipulations en Mai. Nous allons ici décrire brièvement le cheminement qui a été suivi ces trois dernières années, les contraintes rencontrées, et les améliorations qui ont été apportées pour tenter d'optimiser les expérimentations menées sur les trois stades de vie: adulte, larve et juvénile.

### Elevage des flets adultes

Nous avons appris dans un premier temps à maintenir dans les meilleures conditions possibles un nombre élevé d'adultes issus de trois populations naturelles, afin qu'un nombre suffisant de géniteurs soit disponible, pour assurer les premières reproductions expérimentales.

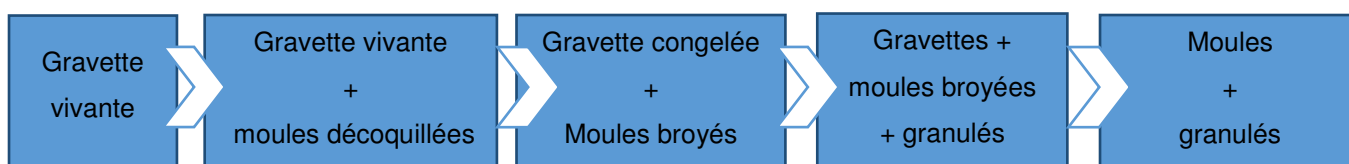
La première année, en Novembre et Décembre 2012 des flets d'une taille supérieure à 25 cm ont été collectés dans 3 environnements :

- en zone côtière, en face de Boulogne sur mer (Novembre 2012, N=23)
- en estuaire de Seine (Décembre 2012, N=33)
- en estuaire de Vilaine (Novembre 2012, N= 26).

Les poissons ont été transportés par la route, puis élevés dans le hall d'aquaculture de l'Equipe ARN – IFREMER (Plouzané), où toutes les expérimentations ont été conduites, avec le soutien majeur de Nicolas Le Bayon (responsable des expérimentations sur poisson, dans l'équipe ARN). Cette première année était destinée à réaliser des tests afin de déterminer la faisabilité d'une reproduction en milieu contrôlé.

### Alimentation

Afin de stimuler l'appétit des poissons, les géniteurs se sont d'abord vu proposer des appâts vivants, type gravette vendue aux pêcheurs à la ligne. L'objectif a été un sevrage progressif de l'appât vivant vers du granulé industriel, agrémenté de moules (initialement extraites crues de leur coquille, puis dans une seconde phase broyées sommairement) en tant qu'aliment de transition et appétant.



L'approche pour arriver au sevrage progressif en appât vivant a consisté à préparer un glaçon, de la taille d'un lingot (environ 15×5×5 cm), contenant moitié granulés et moitié moules broyés, qui flotte dans le bac et stimule ainsi « l'attaque » des poissons les plus affamés en provoquant une réaction de mimétisme des autres individus. Néanmoins les poissons n'ont pas tous progressé au même rythme vis-à-vis du sevrage, et certains n'ont même pas du tout repris l'alimentation, ce qui les a conduit à la mort au bout de quelques semaines (ils ont été euthanasiés, au-delà d'un certain niveau d'amaigrissement, considéré comme irréversible). Nous n'avons jamais pu atteindre pour les adultes un sevrage complet vis-à-vis de l'appât vivant et des moules, ie avec une alimentation uniquement composée de granulés.

### Prophylaxie

A leur arrivée, les poissons subissent un traitement préventif avec l'antibiotique à large spectre Actitetra B (laboratoire BIOVE) à 200 mg/litre d'eau pendant une heure. Afin de maintenir les adultes plusieurs mois dans un bon état de santé, ils ont été élevés dans des bacs de 1,5×1,5 mètres, avec une hauteur d'eau de 40 cm et un renouvellement permanent de l'eau issue de la Rade de Brest, et une évacuation des eaux usées et des fécès par le fond et une surverse (Fig. 8). La température de l'eau de mer était celle de la Rade de Brest, avec un minimum à 9 °C en Décembre et une remontée progressive de température entre Mars et Mai (14 degrés lors de la fin des premiers essais). Le poids et la taille de chaque individu ont été suivis tous les 15 jours, avec un examen plus poussé si nécessaire et parfois une suppression manuelle des poux de mer, *Lepeophtheirus pectoralis*, parfois très invasifs. Le parasite flagellé unicellulaire du genre *Trichodina* sp. a également posé de nombreux problèmes durant les élevages, en fragilisant la barrière muqueuse des poissons et en les exposants aux infections extérieures. Plusieurs traitements antibiotiques ont été nécessaires (Actitetra B à 200 mg/litre d'eau pendant une heure, répété 7 jours), ce qui a requis un ajustement du timing des expérimentations afin que les mesures effectuées ne soient pas biaisées par l'infection ou le traitement en cours.



Figure 8: Flets adultes dans leur bac d'élevage (ARN-Ifremer, Photo: Louis Quiniou)

### 2.4.2 Production et élevage de F1 (larves & juvéniles)

#### Première expérience de production de larves et de juvéniles (Janvier-Avril 2013)

Initialement, les bacs étaient équipés de récupérateurs d'œufs, qui accumulaient les éléments flottants supérieurs à une taille de 0.5mm dans les bacs. Le 28 Janvier 2013 est la date de la première ponte spontanée et de la seule et unique occurrence de récupération d'œufs naturellement fertilisés dans les bacs. A partir du 20 Février, les femelles matures ont été strippées manuellement deux à trois fois par semaine, pour certaines d'entre elles pendant huit semaines d'affilé jusque fin Mai (Figure 9). A partir de cette période, deux expérimentations préparatoires ont été menées parallèlement. Tout d'abord, le nombre d'œufs par ponte été déterminé manuellement à chaque stripping, afin de déterminer une dynamique de ponte par femelle et par population, et évaluer le moment où le lancement d'une expérimentation permettait a priori d'obtenir la meilleure qualité des œufs. Ce suivi a été abandonné après quelques semaines, lorsque nous nous sommes aperçus de la forte variation du volume de ponte (parfois avec une interruption d'une semaine, puis une reprise de ponte pour une femelle), de la qualité de ponte (proportion d'œufs opaques « surmatures » variable), et du décalage de maturation intra et inter-population.



Figure 9: Flets femelles avant et pendant un stripping (Photos: Olivier Mouchel)

Ensuite, des essais de fertilisation ont été effectués afin de maîtriser l'aspect technique de l'élevage des stades précoces. Pour notre premier essai de fertilisation nous avons simplement mélangé 200ml d'œufs avec 1 ml de sperme, puis 200ml d'eau de mer ont été introduits pour activer les gamètes. Cette méthode nous a immédiatement permis d'obtenir plus de 70% d'embryons au stade +2 cellules après quelques heures (Fig. 10) .



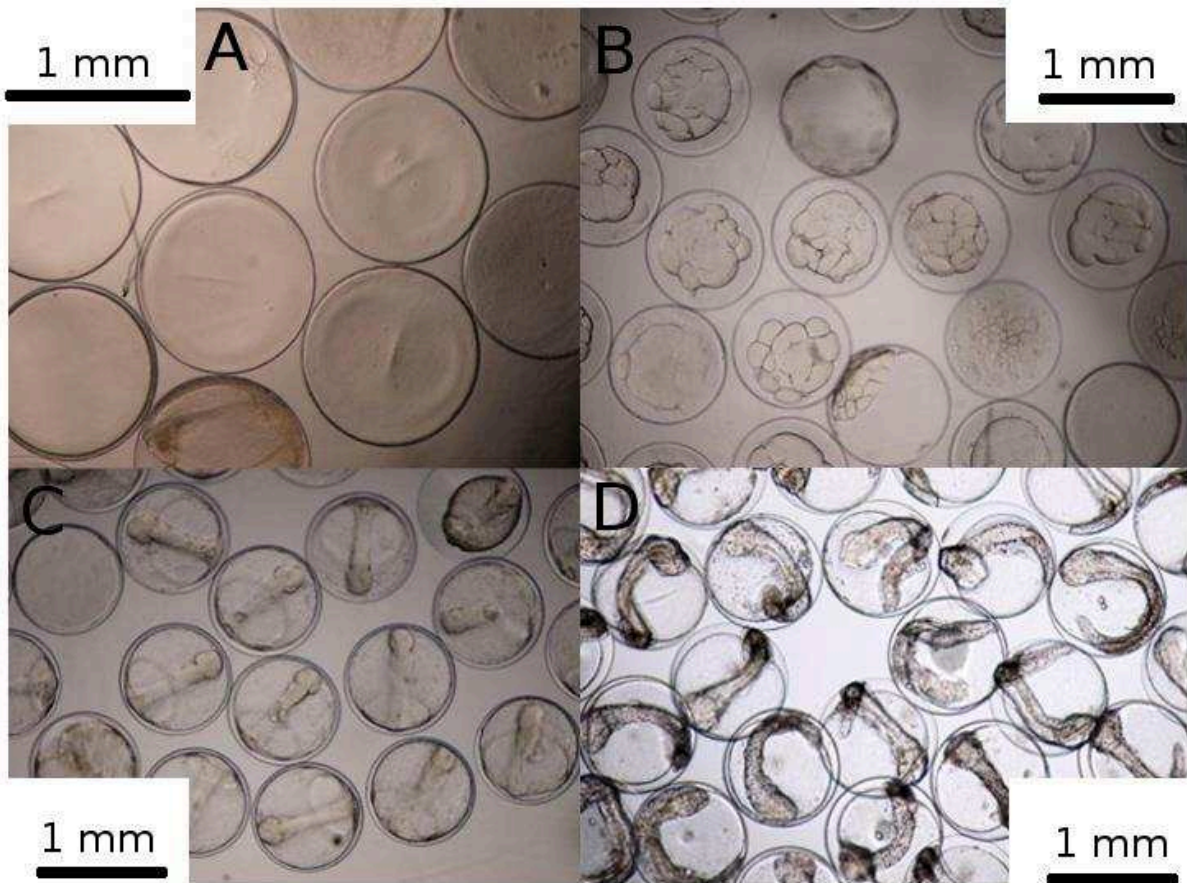


Figure 10: Embryons de flets à 3h (A), 12h (B), 40h (C) et 65h (D) après fertilisation (température : 10 °C, photos : Nicolas Pedron)

La production de F1 a été expérimentée à 10 °C. Pour *Platichthys flesus*, l'éclosion se produit à 21 degrés-jours post-fertilisation (PF) (Fig. 11), la résorption du vitellus à 39 degrés-jour PF en moyenne. A partir du stade alécithe, différents essais de nourriture ont été menés pour alimenter la larve. Les artémies sont rapidement apparues comme étant de trop grosses tailles pour de premières proies. Des essais ont donc été conduits avec de la lécithine de soja et de la levure, mais c'est finalement un mélange de rotifères (*Brachionus* sp.) et de microalgues de fourrage (*Isochrysis galbana*) qui nous a permis de détecter les premières prises alimentaires.

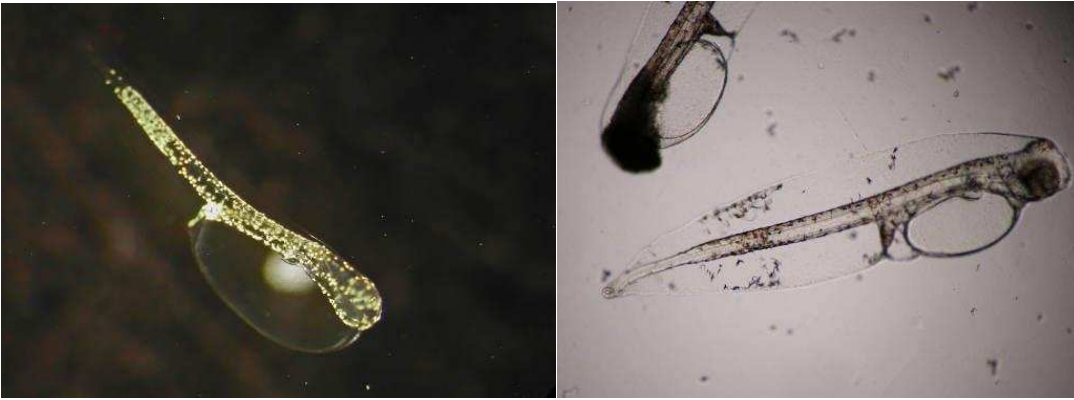


Figure 11: Larves lécithotrophes à 21 degrés-jours PF (à gauche, taille : 2,3mm) et 30 degrés-jours PF (à droite, taille : 2,8 mm)

A 170 degré-jours PF, les larves alécithes ont pu s'alimenter en artémie, puis progressivement en micro-granulés (MarinStart, LeGouessant, France). La majorité des métamorphoses s'est déroulée vers 450 degré-jours post-éclosion (Fig. 12).

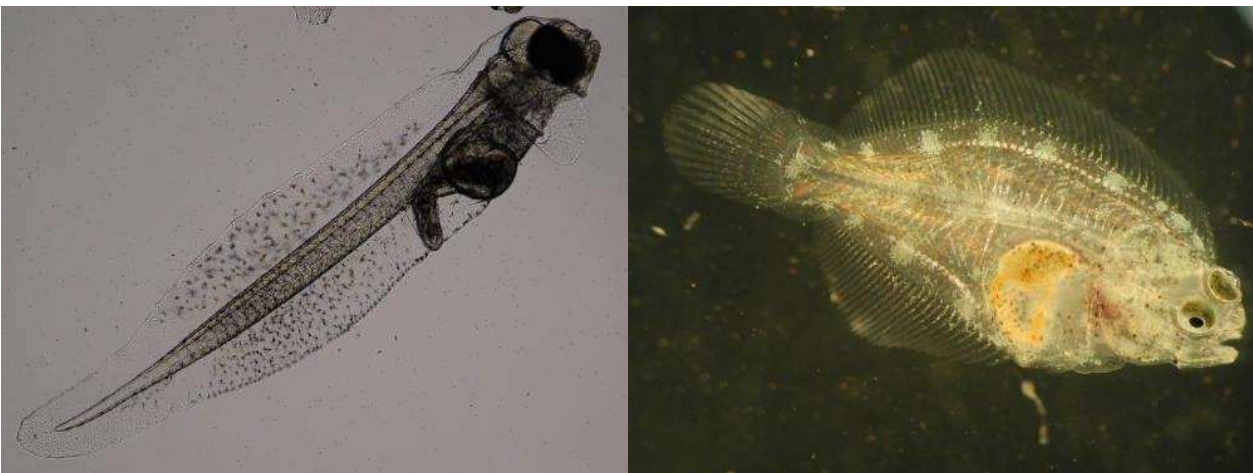


Figure 12 : Larve alécithe à 170 degré-jours au tube digestif plein et opaque (à gauche, taille : 4mm) et juvéniles fraîchement métamorphosés à 430 degré-jours (à droite, taille : 13 mm)

Au final, 300 juvéniles ont dépassé l'âge de cinq mois (longueur totale :  $6.3 \pm 2.3$  cm). La mise au point zootechnique a montré que l'obtention de juvéniles était donc possible. Cependant, de nombreuses malformations ont été observées dans cette production de juvéniles au laboratoire (Fig. 13).





Figure 13: Exemple de malformations observées lors de la production de juvéniles de flet. A gauche, l'oeil n'a pas migré complètement et un sillón reste ouvert au dessus de l'orbite. A droite, la colonne est partiellement déformée et la partie postérieure du poisson est atrophiée (taille : 4cm).

Au final cette première expérience de production au laboratoire de jeunes stades F1 issus d'adultes sauvages a conduit à développer un savoir-faire qui a été mis en oeuvre dans une deuxième expérience l'année suivante. Nous avons privilégié la production et l'expérimentation sur des larves F1, nettement moins risquée que celle potentiellement envisagée sur des juvéniles F1.

#### Deuxième expérience de production de larves (Janvier-Avril 2014)

Fin 2013, des géniteurs des estuaires de Boulogne-sur-Mer (18/12/2013, N= 63), Vilaine (11/12/2013, N=42) et Lima (07/12/2013, N=49) ont été ramenés au laboratoire pour acclimatation. L'objectif était de sélectionner 6-8 femelles et 6-8 mâles par estuaire, de les croiser, et d'incuber à 3 températures différentes (9, 11 et 13°C) les œufs de quarante à cinquante familles de pleins frères ; les températures expérimentales retenues correspondent aux températures hivernales communément observées en période de production larvaire dans les trois environnements, de la Manche au Portugal. Le projet était ici d'explorer les normes de réaction à la thermie du développement embryo-larvaire du flet, sur les trois populations.

Les premiers stripping de poissons adultes sexuellement matures ont démarré au laboratoire pour Boulogne le 20 février, pour Vilaine le 13 Février et pour Lima le 20 Mars. Cette maturation tardive pour Lima nous a incité à nous interroger sur la pertinence de la température d'élevage pour cette population portugaise.

Les œufs considérés comme non viables (opaques) ont été séparés des œufs considérés comme viables (hyalins) en laissant décanter le produit du stripping de chaque femelle dans de l'eau de mer ; ceci permettant aux œufs opaques de couler et aux œufs viables de flotter (Hutchinson & Hawkins 2004). La fécondation a donc été réalisée en prélevant les œufs flottants avec le protocole défini précédemment. La production de chaque famille a été déposée dans un incubateur individuel à raison de 300 œufs par famille. Les incubateurs utilisés étaient constitués d'un cylindre en PVC de 10 cm de diamètre présentant un filtre dans le fond (Figure 14); la circulation d'eau dans ces incubateurs étant assurée par un système de marnage. Dans ces dispositifs, les mortalités larvaires se sont révélées trop lourdes pour mener l'expérimentation à son terme. Elle atteignait 100% pour plus de la moitié des familles, et presque aucune ne contenaient assez de larves pour en prélever 30 à l'ouverture de la bouche.



Figure 14: Incubateur en PVC, avec une maille en plastique de 0.8 mm collée au fond

A notre connaissance, peu d'élevages de flets conduisant à la production de F1 flet ont été décrits dans la littérature. Engell-sorensen et al. (2004) ont décrit au Danemark un système semi-extensif de production de juvéniles destiné au repeuplement des populations locales. Les taux de survie à l'éclosion y sont relativement forts (entre 10 et 50%), le système consistant en une mare artificielle de 1200 m<sup>2</sup> en « eau verte », avec un mélange de phytoplancton et de copépodes auto-entretenu, ce qui n'a rien de comparable en terme d'échelle à nos micro-systèmes. O'Neill et al. (2011) décrivent une expérimentation sur l'impact de salinité sur des post-larves non métamorphosées prélevées dans le milieu naturel. Bien que 25% des post-larves meurent dans les deux premiers jours d'acclimatation, la mortalité passe ensuite à 2% pour les quatre semaines suivantes. Cela semble montrer que les flets en élevage présentent une certaine robustesse si les manipulations sont limitées. Nous suggérons que nos manipulations sur les cylindres liées aux opérations de comptage et nettoyage entraînent très probablement de fortes mortalités larvaires. Nous avons utilisé le reste de la saison de reproduction pour mettre au point une expérimentation plus simple, avec des fertilisations séparées puis un regroupement des embryons issus d'une même provenance géographique (pool d'embryons).

### Troisième expérience de production de larves (Décembre 2014-Mai 2015)

Début 2015, des géniteurs des trois mêmes estuaires (Boulogne-sur-mer, N=30, 12/02/2015; Vilaine, N=30, 29/01/2015 ; Lima, 05/12/2014, N=69) ont de nouveaux été prélevés in natura et ramenés au laboratoire. Pour tenter de compenser la maturation tardive des flets de Lima observée au printemps 2014, 27 des 69 flets de Lima ont été immédiatement placés dans un autre bac pour maturer

à une température moins basse, relativement à celle des eaux d'élevage issues de la Rade de Brest. Le 18 Janvier, alors que la température de l'eau de mer naturelle était descendue à 10.6°C, la température du bac contenant les 27 flets de Lima fut progressivement remontée vers 13°C (+0.1°C par jour). Pour les autres bacs, la température la plus basse (9.3°C) fut atteinte le 09 février. Malgré cette tentative, seulement 5 femelles atteignent la maturité dans le bac à température ambiante parmi les 42, et seulement 3 dans le bac maintenu à 13 °C minimum. Cela correspond à une proportion globalement similaire entre les deux environnements thermiques.

De plus, ces quelques femelles furent les plus tardives parmi les trois estuaires (Boulogne-sur-mer et Vilaine : stripage à partir du 05 Mars ; Lima : à partir du 25 Mars). Ces résultats nous permirent de conduire les expérimentations à partir de fin mars (Chapitre V) ; nous observons cependant une faible capacité des flets de Lima à maturer au laboratoire, à une température entre 10°C et 13°C. Dans la mesure où l'élevage par famille était remplacé par une expérimentation en pool, nous avons choisis des incubateurs de 35 litres (Fig. 15), avec une entrée d'eau par le fond, un renouvellement d'eau de l'ordre d'un litre par minute, et une évacuation par surverse permettant de limiter le développement bactérien en surface, là où les œufs stagnent. La mortalité s'en est retrouvée partiellement améliorée. Les normes de réaction du développement embryon-larvaire ont été estimées sur les températures de 8, 10, 12 et 14 °C, pour mieux prendre en compte la gamme de température environnementale à laquelle l'espèce peut être soumise. Les mesures biologiques se sont concentrées sur un prélèvement des larves (1) à l'éclosion et (2) à l'ouverture de la bouche.



Figure 15: Disposition expérimental du common garden embryo-larvaire, avec dans le fond les châteaux d'eau permettant une distribution constante de l'eau de mer aux incubateurs, localisés au premier plan. (Photo : Nicolas Pedron)

## Bilan sur les difficultés de la production de larves de flet au laboratoire

En résumé, les problèmes rencontrés sont une combinaison :

- de surmortalité larvaire dans les mini-incubateurs, cependant nettement réduite dans les incubateurs de grande taille
- du déséquilibre généralement observé dans les groupes de poissons adultes en terme de sex-ratio
- de la difficulté à définir un pic de ponte pour un groupe d'individus issus d'une même localité
- du nombre d'œufs viables relativement faible produit par poisson, au cours des expérimentations.

Nous avons constaté une mortalité larvaire importante, en raison de la taille très faible des larves, associée à une dégradation rapide des larves mortes. Par ailleurs, il a été difficile d'estimer avec précision de possibles différentiels de vitesses de développement entre populations, du fait la brièveté du développement embryo-larvaire du flet, particulièrement aux températures les plus élevées de l'expérimentation. Au final nous nous sommes donc concentrés sur des mesures de taille et de vitesse de développement sur un lot de larves fraîchement écloses (lorsque plus de 50% des larves étaient parfaitement écloses) et un autre lot de larves prélevées à l'ouverture de la bouche (lorsque plus de 50% des larves survivantes avaient une bouche visiblement ouverte au microscope).

### Common Garden sur juvéniles sauvages

Contrairement à l'élevage des adultes et des larves, le savoir-faire sur l'élevage des flets juvéniles capturés in natura et leur maintien au laboratoire, avait été développé par Nicolas Le Bayon (IFREMER-ARN, Plouzané) lors d'expériences de common garden antérieures à cette thèse, développées dans le cadre du projet ANR EVOLFISH. Ainsi, le sevrage des juvéniles vis-à-vis des vers de vase vivants (chironome) pour aller vers une alimentation de type granulés (NeoSupra, LeGouessant, France) s'est effectué en deux à trois semaines. Ce savoir-faire a donc permis de limiter la mortalité des flets juvéniles sauvages au laboratoire (Fig. 16), et de conduire différents challenges expérimentaux avec succès sur des poissons issus de Boulogne, Vilaine et Lima (Chapitre IV).



Figure 16: Bac d'expérimentation sur juvéniles sauvages (Photo : Nicolas Pedron)



## Chapitre III : Structure génétique de populations de flet le long des côtes Européennes



## Résumé du chapitre

### Introduction

Les poissons marins inféodés aux eaux tempérées, présentent à l'échelle du Nord-Est Atlantique, des populations périphériques en limite Sud d'aire de répartition particulièrement exposées aux effets du réchauffement climatique, relativement aux populations centrales. Ces populations périphériques sont soumises à des changements environnementaux rapides pouvant se traduire par des goulots d'étranglements et une réduction probable des flux de gènes entre elles. On observe actuellement un intérêt croissant pour l'étude et la conservation de ces populations périphériques, dont la réponse au changement global conditionne le maintien ou la modification de la répartition de toute une espèce (Hampe & Petit 2005, Alberto et al. 2013).

La diversité génétique du flet européen a été étudiée ici sur l'ensemble de son aire de répartition. Cette espèce d'eau froide a vu son abondance fortement diminuer durant les 30 dernières années dans le Golfe de Gascogne, et particulièrement le long des côtes Portugaises qui constituent la limite Sud de sa distribution. De nombreuses études suggèrent que les réponses moléculaires et physiologiques observées chez certaines populations de flet seraient potentiellement liées à des adaptations locales aux facteurs environnementaux, en particulier à des conditions de salinité contrastées (Larsen et al. 2007, 2013), comme aux effets de l'eutrophisation voire de la contamination chimique (Laroche et al. 2013; Dupuy et al. 2015; Lavergne et al. 2015). Ces observations sont renforcées par des études de génétique de populations considérant des marqueurs neutres et des gènes candidats, qui décrivent une structuration génétique significative du flet sur son aire de répartition, et de possibles adaptations locales ancrées génétiquement (Hemmer-Hansen et al. 2007a,b; Marchand et al. 2010, 2013; Calvès et al. 2013).

**Les deux travaux qui seront présentés ici, ont donc visé à produire de nouveaux marqueurs génétiques sur le flet (neutres et potentiellement sous sélection) et à approfondir nos connaissances sur la variabilité génétique de cette espèce, avec un focus particulier sur les populations périphériques Sud vs les populations centrales.**

Le génotypage de 956 flets adultes a été réalisé à partir d'échantillons de nageoires prélevés entre 2003 et 2015 dans le Nord-Est Atlantique, du Portugal à la Norvège, en incluant la Mer Baltique. Quinze populations, dont certaines possèdent deux à trois répliques temporels, ont été analysées sur 12 marqueurs microsatellites, et 6 marqueurs SNP liés à des gènes candidats. Ces gènes sont (1) l'AMP déaminase (AMPD), qui joue un rôle important dans le métabolisme énergétique en équilibrant la charge énergétique au niveau cellulaire, (2) la bêtaïne homocystéine méthyltransferase (BHMT3 et BHMT4), jouant un rôle multiple dans la détoxification, le stress oxydant et la régulation des méthylations, (3) le P53, un gène impliqué dans le contrôle de la multiplication cellulaire et dans l'apoptose, (4) la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) qui catalyse la 6<sup>ème</sup> étape de



la glycolyse, et (5) la lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) qui joue un rôle dans le transport de molécules lipophiles, la détoxification et les réponses inflammatoires.

### Résultats et discussion

La diversité génétique des populations a été analysée dans un premier temps au niveau des marqueurs microsatellites. Une baisse de la diversité allélique a été détectée chez les populations de flet du Nord et du Sud de la distribution, relativement aux populations centrales. Ce résultat confirme que les populations périphériques sont plus susceptibles que les populations centrales aux événements stochastiques (dérive génétique) pouvant conduire à une baisse de leur diversité génétique. La population du Mondego, en limite Sud d'aire de répartition, présente une variabilité temporelle significative de ses fréquences alléliques (indice de différenciation génétique  $F_{st}$  temporel significativement différent de 0 ;  $p < 0.001$ ) ; ce résultat reflète une dérive génétique soutenue dans cette population considérée comme a priori fonctionnelle (Martinho et al. 2009, 2010), mais qui présente probablement de fréquents goulets d'étranglement démographiques.

Sur l'ensemble des populations européennes, une différenciation génétique significative a été détectée ( $F_{st}$  estimé à partir des 11 loci neutres = 0.014,  $p < 0.001$ ). L'analyse de type MDS (multi-dimensional scaling) et les résultats de l'AMOVA confirment le statut particulier des populations de la Péninsule Ibérique par rapport à celles du Golfe de Gascogne, confirmant les résultats de Calvès et al. (2013). Les populations de la Manche sont génétiquement proches de celles de la Mer du Nord, et l'isolation des populations de Baltique est cohérente avec les observations de Hemmer-Hansen et al. (2007a).

Dans l'ensemble, ces résultats sont convergents avec une étude phylogéographique du gobie des sables (*Pomatoschistus minutus*), une espèce démersale côtière, pour laquelle trois grands groupes génétiques sont identifiés le long des côtes européennes, avec une séparation entre Péninsule Ibérique, Atlantique Nord et Baltique (Larmuseau et al. 2009, 2010a). Ces études suggèrent un refugium Ibérique au cours du Pléistocène, qui n'aurait pas participé à la recolonisation post-glaciaire vers le Nord de l'Europe, et identifient donc 2 unités évolutives majeures localisées en Péninsule Ibérique et en Atlantique Nord.

Parmi les SNP étudiés, deux marqueurs sont particulièrement structurants au niveau des populations de flet ; l'analyse MDS basée sur la GAPDH indique une séparation nette entre les populations Portugaises vs les autres populations. La GAPDH jouant un rôle majeur dans la glycolyse, et se situant à l'interface entre de multiples voies de la bioénergétique, nous suggérons que de nombreux paramètres de l'environnement puissent exercer des pressions sélectives différentielles sur ce gène. Le second gène (PGDS) ségrège les populations les plus polluées (Seine, Pologne, Hollande) relativement aux autres populations.

Cette étude confirme la structure génétique marquée des populations de flet dans l'Atlantique Nord-Est. Les analyses à partir des marqueurs microsatellites soulignent à nouveau le statut génétique particulier des populations Ibériques, dont l'histoire évolutive pourrait être précisée par une étude phylogéographique plus poussée, afin de leur attribuer plus clairement le statut d'ESU (Evolutionarily Significant Units).



## **New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to anthropogenic stress and contrasted environments**

Pédron N<sup>a,b</sup>, Morvezen R<sup>a</sup>, Le Moan A<sup>a</sup>, Guinand B<sup>c</sup>, Zambonino-Infante JL<sup>a,b</sup>, Laroche J<sup>a</sup>, Charrier G<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Bretagne Occidentale, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifrémer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzane, France

<sup>b</sup> Ifremer, Laboratoire d'Adaptation, Reproduction et Nutrition des Poissons ARN, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins PFOM, Plouzané, France

<sup>c</sup> Université de Montpellier, UMR 5554, Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM), Place E. Bataillon, 34095 Montpellier CEDEX 5, France

### **Abstract**

Six candidate gene SNP assays and 12 new microsatellites were developed in the European flounder (*Platichthys flesus*), in order to provide new tools to (1) further investigate signatures of selection suspected on candidate genes, and (2) better depict the neutral evolutionary background shaping the differentiation of populations. All markers were successfully tested in two populations from contrasted estuaries, and should be helpful to better understand the possible adaptive responses of flounder populations to anthropogenic pressures (e.g. global warming, eutrophication, pollutions), over the whole distribution range of the species.

Publié dans: Conservation Genetics Resources 7 : 823-826 (2015)

DOI: 10.1007/s12686-015-0492-9

The preservation of estuaries is a major concern for the conservation of numerous marine fishes, since they constitute important nursery grounds (Vasconcelos et al. 2011). However, estuaries are particularly exposed to anthropogenic pressures such as global warming, eutrophication or chemical pollution (Rabalais et al. 2009). The European flounder (*Platichthys flesus*), is a flatfish which is largely studied to understand the impact of multiple stresses on estuarine populations. Notably, signatures of selection have been suspected at several candidate genes in populations from contaminated estuaries (Marchand et al. 2010; Calvès et al. 2013; Marchand et al. 2013). However, the possible role of these genes in the adaptive response of flounder populations remains to be investigated. New genotyping methods are especially required to analyze samples from both contaminated and uncontaminated estuaries over species' distribution range. Additionally, the respective role of selective and neutral processes in shaping the phenotypic and genetic differentiation of populations among estuaries remains to be clarified.

The present study aimed at (1) developing candidate gene SNP (Single Nucleotide Polymorphism) assays that would enable the high-throughput genotyping of genes of interest, and (2) developing new microsatellite multiplexes to depict the neutral evolutionary background shaping the population structure in flounder. Levels of variability of all markers were evaluated on 48 individuals sampled in 2003 in a chronically contaminated estuary (Vilaine, N = 24) and a pristine estuary (Ster, N = 24), previously analyzed in Marchand et al. (2010).

Allele sequences of five candidate genes were obtained from Marchand et al. (2010): glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), betaine homocysteine methyltransferase exon 3 (BHMT-3) and exon 4 (BHMT-4), prostaglandin D synthase (PGDS) and a tumor repressor (p53). Allele sequences for the AMP-deaminase isoform 1 (AMPD) were available from Calvès et al. (2013). Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays were designed by Applied Biosystems (table 1). For loci displaying more than two alleles (GAPDH, PGDS, BHMT-4 and AMPD), allele specific probes were designed to target a single SNP showing the largest differences in allele frequencies among contrasted estuaries. Quantitative PCR reactions were performed in a 4 µl reaction volume containing 2µl LightCycler® 480 Probes Master 2x (Roche), 0.1µl assay 40x (Applied Biosystems), 0.4 µl purified water, and 1.5µl DNA (10 ng/µl). PCRs were run on a LightCycler® 480 II (Roche) as follow: 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles of (92°C for 10 sec, 60 °C for 15 sec). SNP alleles were called using the Lightcycler® 480 software v.1.5.1.62 (Roche).

Microsatellites sequences were obtained by GS-FLX Titanium pyrosequencing (Malausa et al. 2011). The QDD pipeline (Megléczy et al. 2010) was used to identify 850 sequences containing microsatellites with  $\geq 5$  repeats, and design primers according default parameters. Sixty di- tri- tetra- and pentanucleotide microsatellites with a melting temperature around 59 °C were selected for

testing. Each forward primer was tailed with a universal M13 primer (Schuelke 2000). Four tails were used, corresponding to four distinct fluorescent dyes: FAM-TGTAAAACGACGCCAGT, DO-TAGAAGGCACAGTCGAGG, YY-CCGCTCTAGAAGTAGTG and PET-GCAGGAAACAGCTATGAC. Primer pairs were tested following Morvezen et al. (2013). Finally, 12 microsatellites were successfully amplified and assembled in three multiplex sets. PCRs were run with the Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen TM) in a 10 µl reaction volume according to the manufacturer protocol: 5 µl of Type-it Multiplex PCR Master Mix 2x, 1µl Q-solution 5x, 2µl RNase-free water, 1 µl of primer mix (see table 2 for concentrations), and 1 µl genomic DNA (10 ng). Nested PCRs were run as follow: 95°C for 2 min, 35 cycles of (95°C for 30s, 59°C for 90s, 72°C for 90s), then eight cycles of (95°C for 30s, 55°C for 90s, 72°C for 90s). PCR products were electrophoresed on a capillary sequencer ABI 3130 (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analysed with GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems), and were blindly scored by several readers in order to minimize genotyping errors.

For all markers, levels of observed heterozygosity ( $H_o$ ), as well as the number of alleles ( $N_a$ ) for microsatellites, and departure from Hardy-Weinberg equilibrium ( $F_{IS}$ ) were assessed in GENEPOP'007 (Rousset 2008). The significance of  $F_{IS}$  values was tested with the Markov chain method (5000 dememorisation steps, 1000 batches, 5000 iterations) and Fisher's exact test, and a false discovery rate (FDR) correction for multiple testing was applied (Bioconductor "qvalue" R package). SNP assays displayed  $H_o$  values varying between 0.176 (locus GAPDH in Vilaine) and 0.600 (locus P53 in Ster), without any significant  $F_{IS}$  values (table 1). These results were similar to those obtained with SSCP, except for GAPDH, for which a strong  $F_{IS}$  was found only for SSCP data due to possible technical artefacts (Marchand et al. 2010). Microsatellites displayed a moderate to high variability, with  $N_a$  ranging from 3 (locus Nplaf\_30) to 15 (locus Nplaf\_33), and  $H_o$  comprised between 0.212 (NplaF\_14 in Ster) and 0.960 (NplaF\_33 in Vilaine) (table 2). A significant heterozygote deficiency was found only for locus NplaF\_28 in each population. No linkage disequilibrium was detected for microsatellites using GENEPOP'007 (details not shown). To conclude, this new set of SNPs and microsatellites appears as valuable tools that should help to evaluate the role of selection and neutral evolutionary forces underpinning the responses of flounder populations to anthropogenic pressures. This work was supported by the ANR program VMCS-EVOLFISH (Paris) and the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19).

### Chapitre III : Structure génétique des populations

Table 1 : Details of the six SNP assays (Fis with \* means  $p < 0.05$  after FDR correction)

Locus	Primer	Sequence	Fluo	TaqMan	Acc. num.	Ho Ster/Vilaine	Fis	Ho (Marchand <i>et al.</i> 2010)	Fis (Marchand <i>et al.</i> 2010)
AMPD	F	5'-GTACATGAGGCTGGCCTATCAG-3'	FAM	CATGTACTGCGAGGCC	AY660016	Ster : 0.300	-0.160	NA	NA
	R	3'-AAGCTCTCCCCTTCCATTTAC-5'	VIC	CATGTACTGGGAGGCC		Vil. : 0.470	-0.280	NA	NA
PGDS	F	5'-ACCTCCTCAGCCGTACCAA-3'	FAM	CAGTGCCGCCCTGCAG	FN432391	Ster : 0.366	0.114	0.400	-0.006
	R	3'- CTGGGTAAGAGGAGGATGTTTTCAG- 5'	VIC	CAGTGCCGTCCTGCAG		Vil. : 0.235	-0.103	0.235	-0.103
GAPDH	F	5'-GAGTCCACCGGTGTCTTCAC-3'	FAM	AGAGGCCTTCTCAATGGT	AJ937521	Ster : 0.200	-0.094	0.233	-0.115
	R	3'- ACTACATGTTGAGGACTGAGTACGT-5'	VIC	AGAGGCCTTCTCGATGGT		Vil. : 0.176	-0.067	0.117	0.689*
BHMT3	F	5'-CAGGGCCGGATCCAATGT-3'	FAM	TAGAACGTAAATGCCTGCATG	FN432389	Ster : 0.266	0.057	0.266	0.057
	R	3'-CCTGTTCTCCAGTTTGTCACTACT-5'	VIC	TAGAACGTAAATGCTTGCATG		Vil. : 0.176	-0.067	0.117	-0.032
BHMT4	F	5'-GTCCTACCTGAGCTGCAAGA-3'	FAM	CCTTCACTTCGGTCTCAC	FN432389	Ster : 0.533	-0.132	0.466	-0.033
	R	3'-GAACACTTCCAGCTGTTTCTTGAA-5'	VIC	CCTTCACTTCTGTCTCAC		Vil. : 0.352	0.179	0.411	0.089
P53	F	5'-GAGGTGTTGCTGAGCAAGGA-3'	FAM	TCTGAGCACAGCCC	Y08919	Ster : 0.600	-0.234	0.533	-0.132
	R	3'-CCACATGCTCAGTCTTCTGTAGA-5'	VIC	TCTGAGGACAGCCC		Vil. : 0.499	-0.185	0.705	-0.391

### Chapitre III : Structure génétique des populations

Table 2: Details of the three microsatellite multiplexes (Fis with \* means  $p < 0.05$  after FDR correction)

Multiplex	Acc.num.	Dye		Conc ( $\mu$ M)	Size range	Pattern	Na	H <sub>obs</sub>	F <sub>is</sub>
Nplaf_8	KT354907	YY(VIC)	F:CATCCACAACCCCTCATTCA	F:0.020 / M13:0.083	217-231	(AC) <sub>2</sub> C(AC) <sub>10</sub>	5	Ster : 0.361	0.056
			R:CAGTCTTGATGGATTCCGGCT	0.100					
Nplaf_27	KT354912	DO(NED)	F:ATTCCTGTTTCATCATTACAGTATTTTC	F:0.020 / M13:0.083	339-359	(AC) <sub>11</sub>	9	Ster : 0.684	0.075
			R:TCGTCTGTCTCACTCTCCTGTGC	0.100					
Nplaf_35	KT354916	FAM	F:AGCTGAGTGGAACAAAGCC	F:0.010 / M13:0.042	145-220	(TTC) <sub>16</sub>	14	Ster : 0.944	-0.061
			R:CATCAAGCACCTCGTCTGTG	0.050					
Multiplex 2									
Nplaf_15	KT354918	DO(NED)	F:GGTTTTCTATTCCTCCCAA	F:0.020 / M13:0.083	235-245	(TG) <sub>10</sub>	6	Ster : 0.344	0.375*
			R:ACCAGTAAGCGGATAAAAACA	0.100					
Nplaf_23	KT354909	FAM	F:TCTCTGCATGTCTCACCTG	F:0.010 / M13:0.042	213-225	(CA) <sub>8</sub>	5	Ster : 0.611	-0.160
			R:AACGCAAAGAAAGATACAACCTGC	0.050					
Nplaf_33	KT354915	FAM	F:CTATCCCTGATCGTTCTG	F:0.020 / M13:0.083	448-523	(CTAT) <sub>11</sub>	15	Ster : 0.871	0.049
			R:AGACGAATGGCTGCTGATCT	0.100					
Nplaf_51	KT354917	PET	F:CGTGCATTCATGTTAACGCT	F:0.030 / M13:0.125	391-414	(AC) <sub>8</sub>	7	Ster : 0.677	0.010
			R:GCAGAAAACATCCGCAAAT	0.150					
Multiplex 3									
Nplaf_14	KT354908	FAM	F:ACACCCTATAGCAACACTTGA	F:0.010 / M13:0.042	111-115	(AC) <sub>9</sub>	5	Ster : 0.212	0.409*
			R:TCAGCTCCGGATATTTCTGA	0.050					
Nplaf_24	KT354910	DO(NED)	F:GCTGCCAATTATGCAGGAGT	F:0.010 / M13:0.042	148-166	(TTC) <sub>7</sub>	9	Ster : 0.786	-0.151
			R:CAATAACCTTGGCTGCTTGT	0.050					
Nplaf_25	KT354911	YY(VIC)	F:AAAATGTGTTACCAACGGACG	F:0.010 / M13:0.042	93-99	(AC) <sub>13</sub>	8	Ster : 0.667	-0.104
			R:ATTAGGTGCAATCTGCTGCC	0.050					
Nplaf_28	KT354913	FAM	F:TTGTCCCTCAAAAATCCAG	F:0.030 / M13:0.125	220-253	(GAG) <sub>7</sub>	10	Ster : 0.516	0.271*
			R:TTGTGTTGTTGAACAGGGA	0.150					
Nplaf_30	KT354914	DO(NED)	F:GTGCACCAATTCATGCCATA	F:0.030 / M13:0.125	285-291	(AC) <sub>11</sub>	3	Ster : 0.276	0.069
			R:GCAAAGGTCATTAAGATAAAGTATTT	0.150					



## **Bibliography**

- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, et al (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser* **472**:257–273.
- Malausa T, Gilles A, Megléc E, et al (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol Ecol Resour* **11**:638–44.
- Marchand J, Evrard E, Guinand B, et al (2010) Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Mar Environ Res* **70**:201–9.
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013) Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *J Xenobiotics* **3**:14.
- Megléc E, Costedoat C, Dubut V, et al (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* **26**:403–4.
- Rabalais NN, Turner RE, Diaz RJ, Justic D (2009) Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES J Mar Sci* **66**:1528–1537.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* **8**:103–6.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* **18**:233–4.
- Vasconcelos RP, Reis-Santos P, Costa MJ, Cabral HN (2011) Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecol Indic* **11**:1123–1133.

## Genetic variation across the geographical range of the European flounder, with a focus on southern peripheral populations

Pédron N <sup>(a,b)</sup>, Laroche J <sup>(a)</sup>, Aboim MA <sup>(c)</sup>, Tanner SE <sup>(c)</sup>, Reis-Santos P <sup>(c,d)</sup>, Vasconcelos RP <sup>(c)</sup>, Cabral H <sup>(c)</sup>, Le Moan A <sup>(a)</sup>, Bidault A <sup>(a)</sup>, G. Charrier <sup>(a)</sup>

(a) Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer IUEM, Plouzané, France

(b) Ifremer, Laboratoire Adaptation, Reproduction et Nutrition des Poissons ARN, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins PFOM, Plouzané, France

(c) MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Portugal

(d) Southern Seas Ecology Laboratories, School of Biological Sciences, The University of Adelaide, SA 5005, Australia

### In prep for Marine Ecology Progress Series

#### Abstract

In contrast to expansion edges, contraction edges of the species distribution range remain largely unexplored, despite their importance as long term stores of genetic diversity. In the present study we explored the genetic diversity of European flounder *Platichthys flesus*, a cold-temperate fish species, at 16 sampling sites across its geographical range from Portugal to Norway, including the Baltic Sea. Microsatellite data showed a loss of allelic diversity and temporal genetic variability for the southern peripheral population of the Mondego estuary (Portugal), which has been submitted to frequent demographic bottlenecks and thus to genetic drift. Multilocus genetic differentiation (considering 12 microsatellite loci) among sites across Europe was highly significant ( $F_{st} = 0.022$ ), with four major groups: Iberian Peninsula (IP), Bay of Biscay, Eastern Channel - North Sea and Baltic Sea. Within the IP group, significant differentiation between the Mondego estuary (Portugal) and Northern Iberian populations could be linked to genetic drift and limited gene flow towards the Mondego. Differentiation based on single-nucleotide polymorphism (SNP) of five candidate genes involved in bioenergetics and stress response was of the same order of magnitude as detected by microsatellites but with divergent patterns of differentiation, like the isolation of marginal populations (Norway, Gironde estuary in Southern Bay of Biscay and IP group) with contrasting thermal regimes. Results also suggest that the IP population might contain endemic genetic variation that is threatened by global climate changes.

**Keywords:** distribution limits, range shift, equatorward-boundary contraction, poleward-boundary expansion, leading edge, trailing edge

## 1) Introduction

Marine ectotherms occupy latitudes within their thermal tolerance limits (thermal niche), and their distributions are expected to expand at the poleward boundary and contract at the equatorward boundary in response to anthropogenic climate warming (Sunday et al. 2012). In the North-East Atlantic, global warming has resulted in shifts (latitude, depth) in the distribution and abundance. The abundance of boreal species has declined at the southern limit of their distribution ranges (e.g. cod, plaice, dab) but increased at their northern limits (e.g. cod) (Rijnsdorp et al. 2009). These climate-induced shifts may deeply impact socio-economical systems by inducing stock collapses, especially at the southern edge of current species' distributions (Beaugrand et al. 2008).

Peripheral populations are spatially distant from central populations and in many cases experience dissimilar ecological conditions (e.g. different biotic and abiotic environments and frequency of stressful conditions). In such contexts, bottlenecks, restricted gene flow and new selection regimes act in concert and can enhance genetic reorganization by breaking down co-adapted genes (Lesica & Allendorf 1994). There is presently a growing interest in assessing the genetic structure of populations across species' geographical ranges to understand why species might exhibit stable range limits and to define the conservation value of peripheral populations (Eckert et al. 2008). Responses of terrestrial and aquatic species to changing environment are probably largely determined by population responses at range margins (Hampe & Petit 2005, Alberto et al. 2013). In contrast to the expanding edge (or leading, or cold), the contracting edge (or trailing, or rear, or warm) of species distribution ranges are less studied, despite the importance of the latter populations as long-term repositories of genetic diversity. Yet, long-isolated populations in peripheral habitats may contain genotypes that confer resilience to future warming, thus emphasizing the need to protect small peripheral populations as well as larger central ones (Moritz et al. 2012).

Genetic variation across species' ranges is structured by historical factors (e.g.. range fragmentation caused by glaciations and sequential founder events during postglacial expansions) and contemporary factors (e.g..seasonal changes, human activities). Determining the contributions of these factors is a mandatory step to identify centres of relict diversity. Phylogeography of numerous north-eastern Atlantic coastal species have so far shown that contraction-edge populations harbour a significant level of genetic diversity, mainly linked to the presence of southern refugia during the Last Glacial Maximum located in Northwestern Iberia - Portugal (Provan 2013, Maggs et al. 2008). Also the phylogeography of coastal demersal fishes in the North-East Atlantic highlights that the post-glacial expansion in northern Europe originated primarily from a refugium in the English Channel or in the southern North Sea, with sometimes a reduced contribution from the Iberian refugium (Larmuseau et al. 2009, 2010a). Finally, considering terrestrial, freshwater and marine ecosystems, it seems that most southern relict fish populations have not been the source of major post-glacial

recolonizations of northern Europe, contrary to a common belief, thereby preserving their high genetic distinctiveness (Hampe & Petit 2005).

Along the North-East Atlantic a clear latitudinal cline in annual mean sea surface temperature is observed (from 8°C in Bergen - Norway to 15°C in Lisbon - Portugal; Bigg et al. 2007). The Portuguese coast is at the interface between cold- and warm-water faunas and floras, and a considerable number of cold water species (abundant in Northern Europe) have their southern distribution limits along this coast (Lima et al. 2007). Southern limits of some cold-water species have shifted north in this region, possibly linked to recent warming associated with a sharp latitudinal gradient in sea surface temperature along this coast (Assis et al. 2013). This latitudinal gradient is further accentuated during the warm season by intense upwelling in Northern Portugal (Lima et al. 2007).

In the present study, *Platichthys flesus* (European flounder) is used as a biological model. This is a northern temperate fish species that inhabits marine, estuarine and freshwater ecosystems throughout the NE Atlantic from Portugal to Norway, and also the Baltic Sea. Over two decades, its decrease in abundance in the Bay of Biscay has been negatively correlated to mean water temperature raise in its birth's year (Hermant et al. 2010). Furthermore, the Portuguese coast corresponds to the southern distribution limit of *P. flesus* which is currently rare in the surroundings of Lisbon, where it was abundant a few decades ago (Cabral et al. 2001). Several studies have strongly suggested that molecular and physiological responses in flounder populations could be shaped by adaptation to local environmental conditions, particularly to salinity regimes and pollution-eutrophication (Larsen et al. 2007, 2013; Laroche et al. 2013; Dupuy et al. 2015; Lavergne et al. 2015). Furthermore, flounder population genetic studies with neutral markers and candidate genes have underlined: (1) a highly significant genetic differentiation among populations along the North-East Atlantic coasts, (2) the particular genetic status of a southern peripheral population in Portugal and (3) probable local population adaptive evolution of genes involved in stress response, bioenergetics and detoxification processes (Hemmer-Hansen et al. 2007a,b; Marchand et al. 2010, 2013; Calvès et al. 2013).

As previously underlined by Munday et al. (2013), the impact of climate change on marine populations can only be understood in an evolutionary perspective. Therefore, in this study we explore levels of genetic differentiation among numerous *P. flesus* samples over a latitudinal cline, from Norway to Portugal. Considering neutral and potentially selected molecular markers, we investigate the evolutionary forces that have shaped (or are shaping) the temporal and spatial dynamics of the genetic structure over the species distribution range. Results should allow a better understanding of the importance of peripheral vs central populations for the long-term conservation of the species genetic diversity and evolutionary potential. This is especially relevant as there is a strong need to understand whether local adaptation exists in such peripheral and endangered

populations, increasing their conservation value (Assis et al. 2013).

## 2) Material and methods

### Biological model and sampling

A total of 965 *Platichthys flesus* individuals were caught between 2003 and 2015 from 16 locations along the North-East Atlantic from Norway to Portugal and in the Baltic Sea (Table 1; Fig. 1). Most samples were collected at the mouth of estuaries and adults were normally selected, with the exception of the Unxtin estuary, where only juveniles could be sampled. Samples of Dorsal fin clips were stored individually in 100% ethanol.

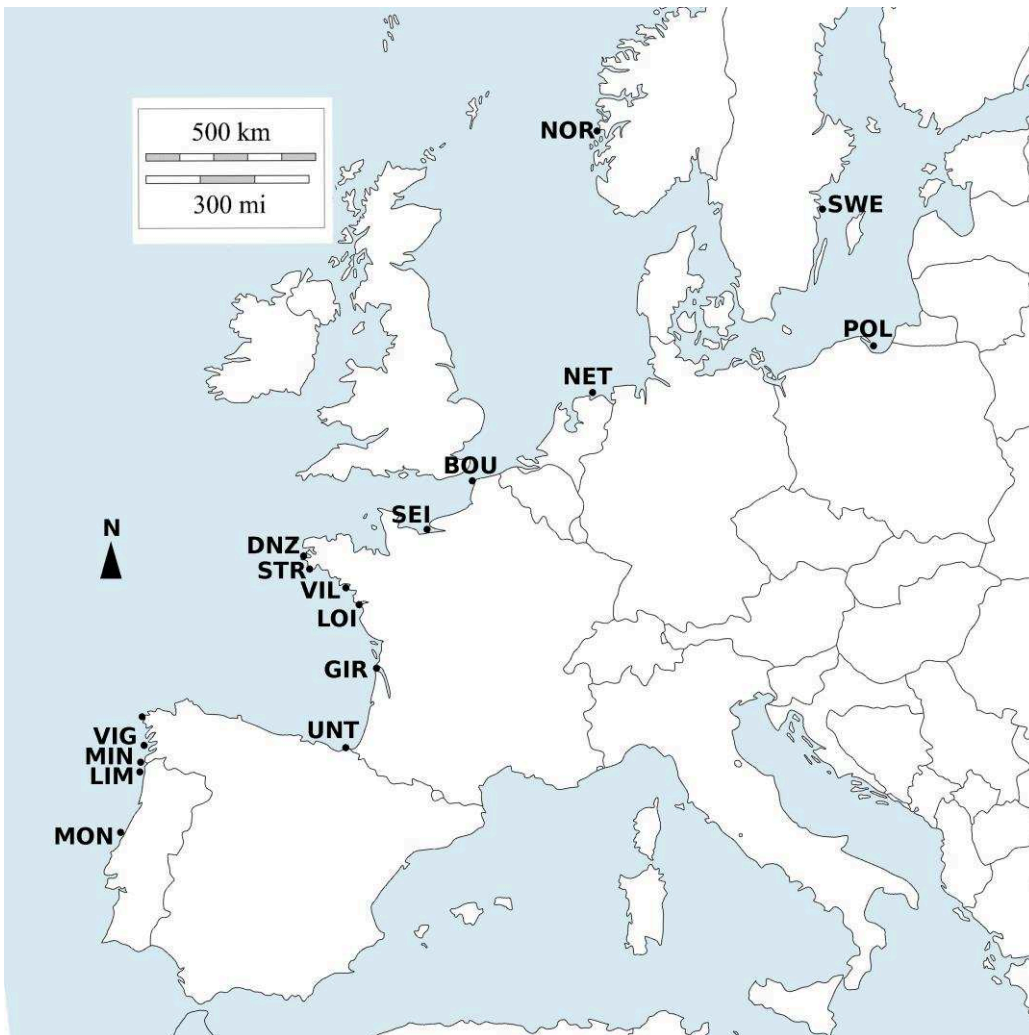


Figure 1: Populations location from North to South: NOR Norway, SWE Sweden, POL Poland, NET Netherlands, BOU Boulogne, SEI Seine, DNZ Bay of Douarnenez, STR Ster de Lesconil, VIL Vilaine, LOI Loire, GIR Gironde, UNT Untxin, VIG Vigo, MIN Minho, LIM Lima, MON Mondego)

Table 1: Description of the sampling sites

Sample location	ID	Latitude	Longitude	Year	Sample size
Norway	NOR	60,3	5,2	2012	27
Sweden	SWE	58,5	16,7	2012	30
Poland	POL	54,5	19,5	2012	50
Netherlands	NET	54,1	7	2013	42
Boulogne	BOU	50,7	1,57	2012	22
				2013	24
Seine	SEI	49,4	0,1	2003	38
				2005	36
				2013	30
Bay of Douarnenez	DNZ	48,1	-4,5	2013	39
Ster de Lesconil	STR	47,8	-4,2	2003	38
				2006	23
Vilaine	VIL	47,5	-2,5	2003	28
				2005	35
				2013	24
Loire	LOI	47,2	-2,2	2003	37
				2005	35
Gironde	GIR	45,6	-1,4	2003	33
				2005	35
Untxin	UNT	43,4	-1,7	2013	30
Vigo	VIG	42,2	-9,3	2013	36
Minho	MIN	41,8	-8,9	2013	35
Lima	LIM	41,6	-8,9	2013	15
				2015	68
Mondego	MON	40,1	-8,9	2010	34
				2013	64

### Genetic markers and genotyping

Total DNA was extracted from fins using a standard phenol-chloroform extraction protocol adapted from Sambrook et al. (1989). A Nanodrop® was used to determine DNA concentration and quality, and each sample was diluted to an average concentration of 10ng/ml. A set of 12 microsatellites and 6 candidate gene SNPs were developed to explore neutral and selective processes shaping the genetic variability of European flounder populations over Europe (see details in Pédrón et al. 2015).

Briefly, 12 microsatellite loci were amplified using the Type-it Microsatellite PCR Kit

(Qiagen TM) in a 10 µl reaction volume according to the manufacturer's protocol: 5 µl of Type-it Multiplex PCR Master Mix 2x, 1µl Q-solution 5x, 2µl RNase-free water, 1 µl of primer mix (see Table 2 for concentrations), and 1 µl genomic DNA (10 ng). Nested PCRs were run as follows: 95°C for 2 min, 35 cycles of (95°C for 30 s, 59°C for 90 s, 72°C for 90 s), then eight cycles of (95°C for 30s, 55°C for 90s, 72°C for 90s). PCR products were run on a capillary sequencer ABI 3130 (Applied Biosystems): 1µL PCR product, 10µL Hi-Di Formamide, 0.15 µL GeneScan 500-LIZ size standard (Applied Biosystems<sup>TM</sup> Carlsbad, CA, USA), Electrophoregrams were analysed with GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems), and were blindly scored by several readers to minimize genotyping errors.

We explored the polymorphism of six Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) located on 5 genes related to bioenergetics and response to stress. AMP deaminase (AMPD) has shown robust genetic structure (Calvès et al. 2013). This gene plays a major role in (1) bioenergetics, stabilizing the adenylate energy charge (Yoshino & Murakami 1981) and (2) cold adaptation both in vertebrates and invertebrates (Dieny & Storey 2008; Marotta et al. 2009). Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) may provide a link between detoxification, antioxidant defenses and methylation deregulation and is implicated in the response to several environmental stressors: hypoxia, thermal stress and contamination (Richards et al. 2010; Everett et al. 2012; Galland et al. 2015). P53 acts as a transcription factor which inhibits cell growth and promotes apoptosis in response to DNA damage (Cachot et al. 2004, Berghmans et al. 2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) catalyzes the sixth step of glycolysis and thus plays a major role in carbohydrate metabolism and energy production. In vertebrates, lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) is a multifunctional enzyme, with a role in prostaglandin synthesis and in the transport of lipophilic molecules in cells (Fujimori et al. 2006); furthermore, this gene can be activated by environmental chemicals and thus could metabolize organic pollutants (Vogel 2000). It could be also involved in the modulation of inflammation induced by stressors (Ricciotti & Fitzgerald 2011).

For the SNP loci, quantitative PCR reactions were performed in a 4 µl reaction volume containing 2 µl LightCycler® 480 Probes Master 2x (Roche), 0.1 µl assay 40x (Applied Biosystems), 0.4 µl purified water, and 1.5 µl DNA (10 ng/µl). PCRs were run on a LightCycler® 480 II (Roche) as follows: 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of (92°C for 10 s, 60 °C for 15 s). SNP alleles were called using the Lightcycler® 480 software v.1.5.1.62 (Roche).

### **Data analysis**

Linkage disequilibrium between all pairs of loci was assessed with Genepop'007 software (Rousset 2008). Both microsatellites and SNPs loci were tested with the Lositan workbench (Antao



et al. 2008) for possible influence of selection.

Observed/expected heterozygosities and  $F_{IS}$  (indicating heterozygote deficiency/excess) were assessed in Genepop'007 (Rousset 2008). The significance of  $F_{IS}$  values was tested with the Markov chain method (5000 dememorisation steps, 1000 batches, 5000 iterations) and a Fisher's exact test. A false discovery rate (FDR) correction for multiple testing was applied in R. The presence of null alleles was verified with the Microchecker 2.2.3 software (Van Oosterhout et al. 2004). Multilocus allelic richness and its significance were determined with Fstat v.2.9.3 (Goudet, 1995). Effective population size was estimated with LDNe (Waples & Do 2010) using recommended parameters.

Global and pairwise  $F_{ST}$  (index of genetic differentiation by Weir & Cockerham 1984) were estimated using Genetix 4.0.4 (10000 permutations) (Belkhir et al 2004). Exact tests of genetic differentiation were performed in Genepop 4.2 (5000 dememorisation, 500 batches and 5000 iterations). When multiple testing occurred, q-values were estimated from the p-value using the FDR correction package Qvalue (Storey & Bass 2015) in R (R core team, 2013). Graphical representations of genetic differentiation were produced using multidimensional scaling (MDS) with Slatkin's linearized  $F_{ST}$ : ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ). Isolation by distance (IBD), was tested based on a matrix of geographical distances. Mantel tests of correlation between genetic and geographical distances were performed in Genetix 4.0.4. An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed in Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) to identify population clusters.

## Results

### *Microsatellites (Tables S1& S2 in supplementary data)*

#### Genetic diversity within populations

No linkage disequilibrium between the different pairs of loci and no null alleles were detected. Microsatellite variability appeared to be quite heterogeneous, with the total number of alleles per locus ranging from 5 (Nplaf\_14) to 38 (Nplaf\_33) (Table S1), and allelic richness significantly differing among samples; The populations of the northern (Norway-NOR12) and southern (Portugal, Mondego-MON10) edge showed the lowest values (5.7 and 5.6 respectively,  $p < 0.002$  after 5000 permutations; Fig 2).



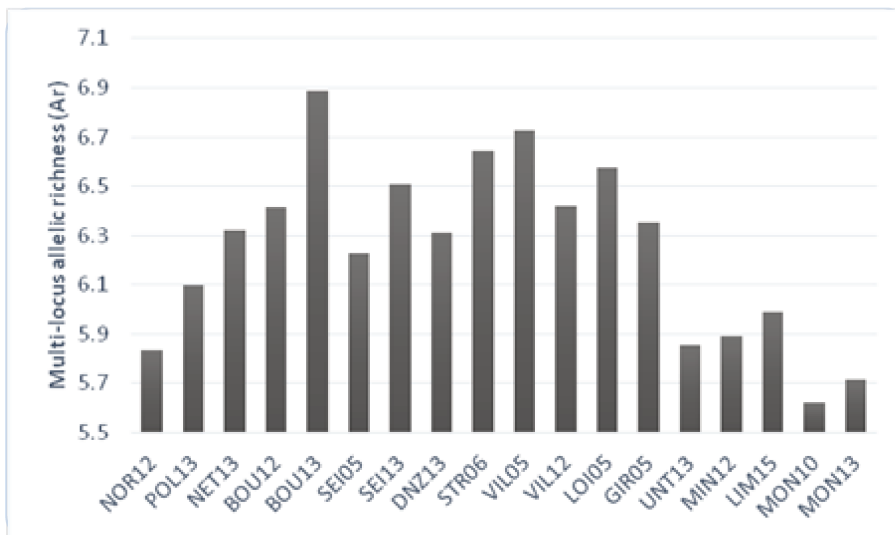


Figure 2: Multi-locus allelic richness for 18 of the populations. Seven populations were removed from this analysis because of missing data that prevented correct computing of the multi-locus allelic richness

The mean observed heterozygosity in populations did not vary significantly along the latitudinal gradient (from 0.41 for VIG13 to 0.63 for SEI13; Table S1). Considering multilocus statistics, two samples departed highly from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ( $F_{IS}=0.149$  for LOI05,  $F_{IS}=0.292$  for VIG13 with  $p<0.001$ ) but not any locus appeared to be recurrently responsible for the observed positive  $F_{IS}$ , i.e. for heterozygote deficiency. Confidence intervals of all  $N_e$  estimates included infinity, which hindered assessing the effective size of flounder populations over the whole data set.

#### Genetic structure

The estimated  $F_{ST}$  (Table 2) showed significant multilocus differentiation over the entire data set: 12 microsatellites / 25 samples ( $F_{ST} = 0.022$ ,  $p<0.001$ ), confirmed by the multilocus exact test of genetic differentiation ( $p<0.001$ ). Pairwise estimations of  $F_{ST}$  showed significant differentiation between numerous pairs of populations, and on the other hand, limited differentiation within the Biscay Bay, the East Channel, and the Iberian Peninsula with the exception of the southernmost populations of the Mondego-Portugal (Table S2).

Among the 12 loci, probable selection on the locus Nplaf\_33 was identified with the  $F_{ST}$  outlier test as implemented in Lositan (Figure 3). Considering the other 11 neutral microsatellites (Table 2), the global level of differentiation was lower but still significant ( $F_{ST} = 0.014$ ,  $p<0.001$ ), and the locus Nplaf\_33 produced a high global  $F_{ST}$  ( $F_{ST} = 0.061$ ,  $p<0.001$ ) (Table 2).

The MDS plot based on the 11 neutral microsatellites (Figure 4) underlined a clear latitudinal gradient along the first axis, from northern samples (Baltic Sea, North Sea - East Channel) on the left of the plot, to Biscay Bay samples in the center, and Iberian Peninsula samples on the right. Furthermore the second axis clearly separated between the Baltic samples, with the Swedish sample

on the top of the plot and Polish sample on the bottom.

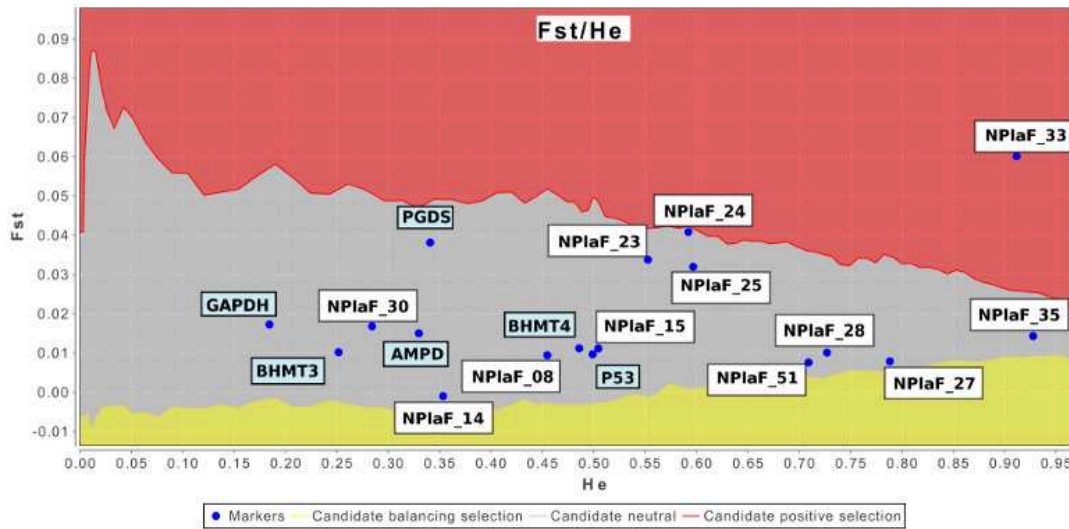


Figure 3: Lositan graph illustrating the Nplaf\_33 as a gene under possible selection

The MDS including the full marker set, i.e. the 12 microsatellites (Figure 5) showed similar patterns but allowed for a better separation of the referred groups: Iberian Peninsula (Mondego, Lima, Minho, Vigo, Untxin) vs Bay of Biscay (Gironde, Loire, Vilaine, Ster, Douarnenez) vs East Channel-North Sea (Seine, Boulogne, Netherlands) vs a less marked group characterized by the Baltic and Norwegian samples. AMOVA confirmed an existing structure between these four groups with 1.97% of the genetic variation explained by the variation between these groups ( $F_{CT} = 0.0197$ ,  $p < 0.001$ ). Furthermore, the comparison of the genetic diversity within these four groups showed a significant differentiation in their allelic richness ( $p < 0.001$ ), with central populations (Bay of Biscay and East Channel-North Sea) displaying on average 0.6 more alleles than peripheral populations (Iberian Peninsula, Baltic Sea and Norway).

A Mantel test conducted over the whole data set showed a strong correlation between genetic differentiation and geographical distance (IBD,  $r = 0.081$ ,  $p < 0.001$ ) suggesting an isolation by distance of flounder populations throughout Europe.

The temporal variability of the genetic diversity within populations was assessed considering the 12 microsatellites, and estimating  $F_{ST}$  on two or three temporal replicates when available per estuary (Table 3; the populations from Vigo, Minho and Lima were separated by only 50 kilometers and were considered as a single deme in this analysis). Two flounder populations (Loire and Mondego) displayed temporal genetic variability (Table 3), whereas genetic stability was detected for all the other populations with temporal replicates (Boulogne, Seine, Ster, Vilaine, Gironde, Vigo-Minho-Lima).

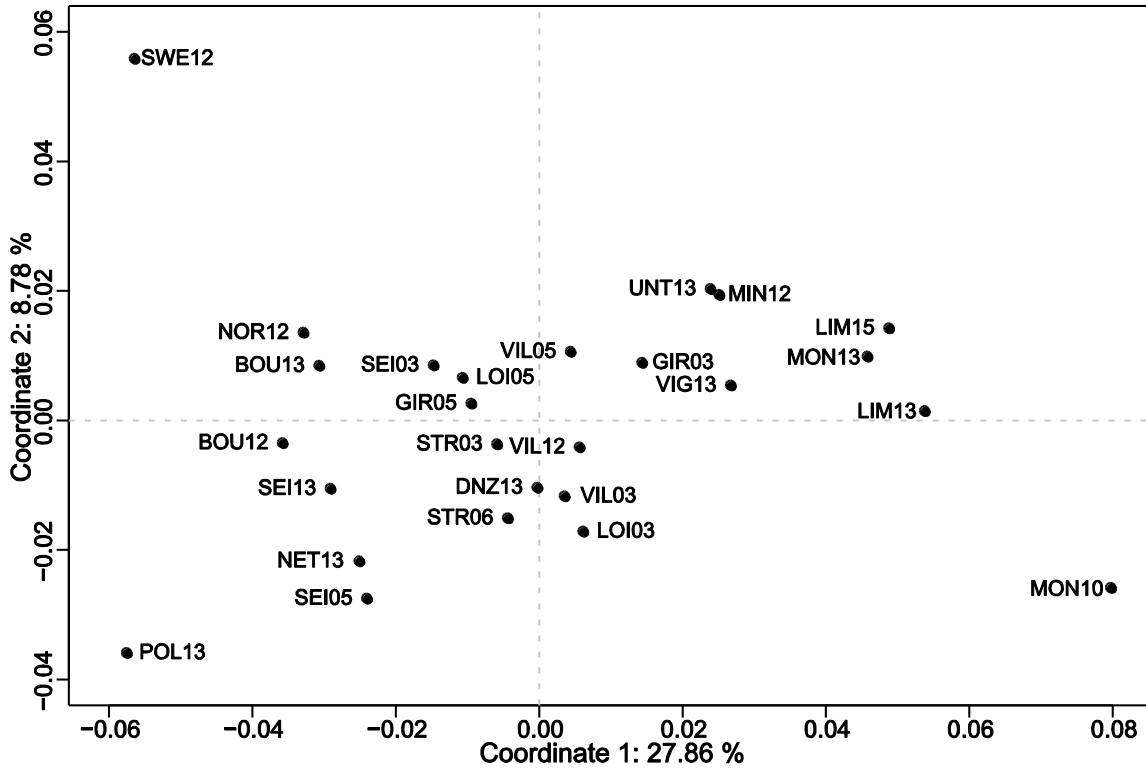


Figure 4: Multidimensional scaling (MDS) on pairwise  $F_{st}$  (11 neutral microsatellites loci, without Nplaf\_33)

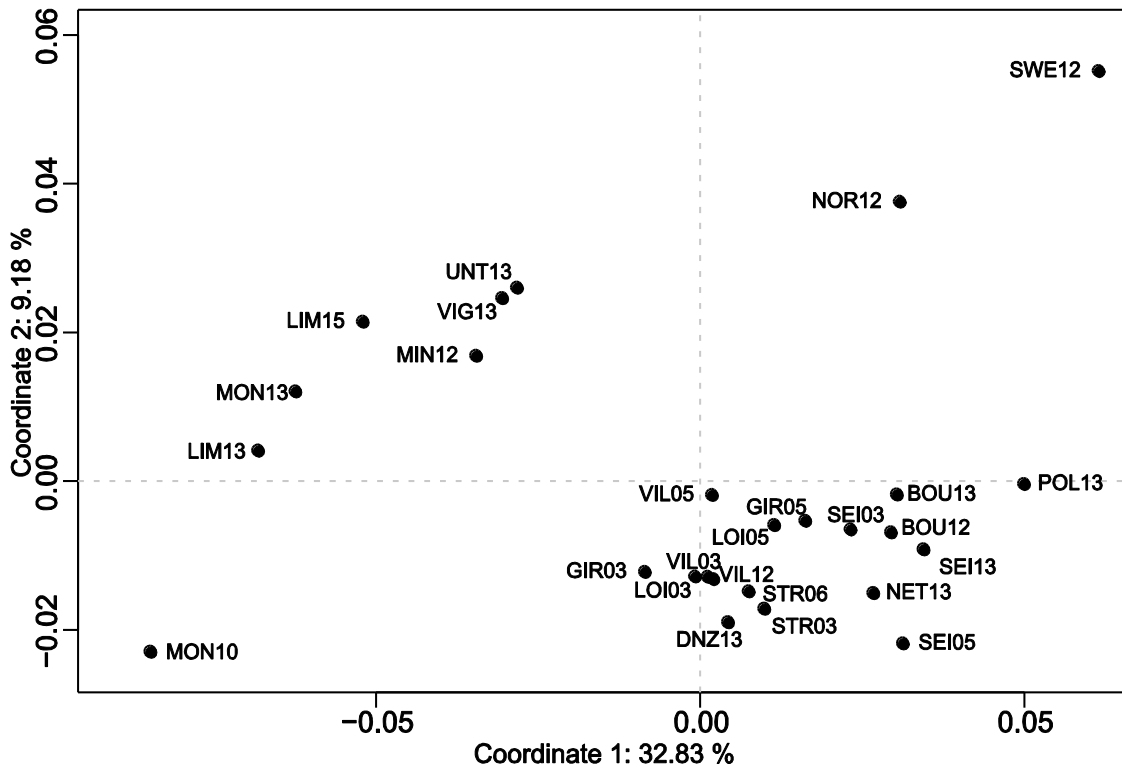


Figure 5: Multidimensional scaling (MDS) on pairwise  $F_{st}$  (all 12 microsatellites)

**SNP analysis (Table S3 and S4 in supplementary)**

Genetic diversity within populations

Significant linkage disequilibrium was found only between BHMT3 and BHMT4, with these two loci located respectively in the third and fourth exon of the same gene, separated by approximately 200 bp (Pédron et al. 2015). The SNP data for the whole data set showed no major disequilibrium from HWE for the six SNP loci, with only four substantial departures from HWE detected (Table S3): for Poland (GAPDH  $F_{IS}=0.401$ ), Vilaine (VIL05: AMPD  $F_{IS}=0.408$ , GAPDH  $F_{IS}=0.447$ ) and Lima (BHMT4  $F_{IS}=-0.258$ ). The frequency of the main allele varied greatly between loci: for BHMT3 and GAPDH, the predominant allele represented more than 85% of the allelic frequencies in the majority of populations. For BHMT4, P53, PGDS and AMPD the frequencies of the two alleles were more balanced.

Genetic structure

The estimated  $F_{ST}$  per locus showed significant differentiation over the whole data set (Table 2) for five of the loci, with BHMT3 not a structuring locus. The level of differentiation was moderate for AMPD, BHMT4 and P53 ( $F_{ST} \approx 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) and more pronounced for PGDS and GAPDH ( $0.023 < F_{ST} < 0.038$ ,  $p < 0.001$ ). Significant differentiation was found over the entire data set ( $F_{ST} = 0.017$ ,  $p = 0.008$ ) considering the only structuring loci (all SNPs, excluding BHMT3). The MDS analysis based on the same loci (Figure 6, Table S4) underlined the separation of the Norwegian population along the first axis relatively to the other populations. Additionally, three groups were separated along the second axis of the MDS: Iberian Peninsula populations (without Untxin) on the top of the plot, a mixture of populations from Baltic Sea, East Channel, Bay of Biscay in the center, and Gironde samples at the bottom.

MDS analysis was also carried out for the two most structuring loci (GAPDH and PGDS) individually. MDS based on GAPDH (Figure 7) showed a separation of the Iberian Peninsula populations scattered on the left side of the diagram, from other populations in the center, and the Swedish population on the upper right side. On the other hand, MDS based on PGDS (Figure 8) showed no evident geographical distribution of samples, with many populations, mainly from the southern part of the distribution (Bay of Biscay and Iberian Peninsula), concentrated in the upper left part of the diagram.

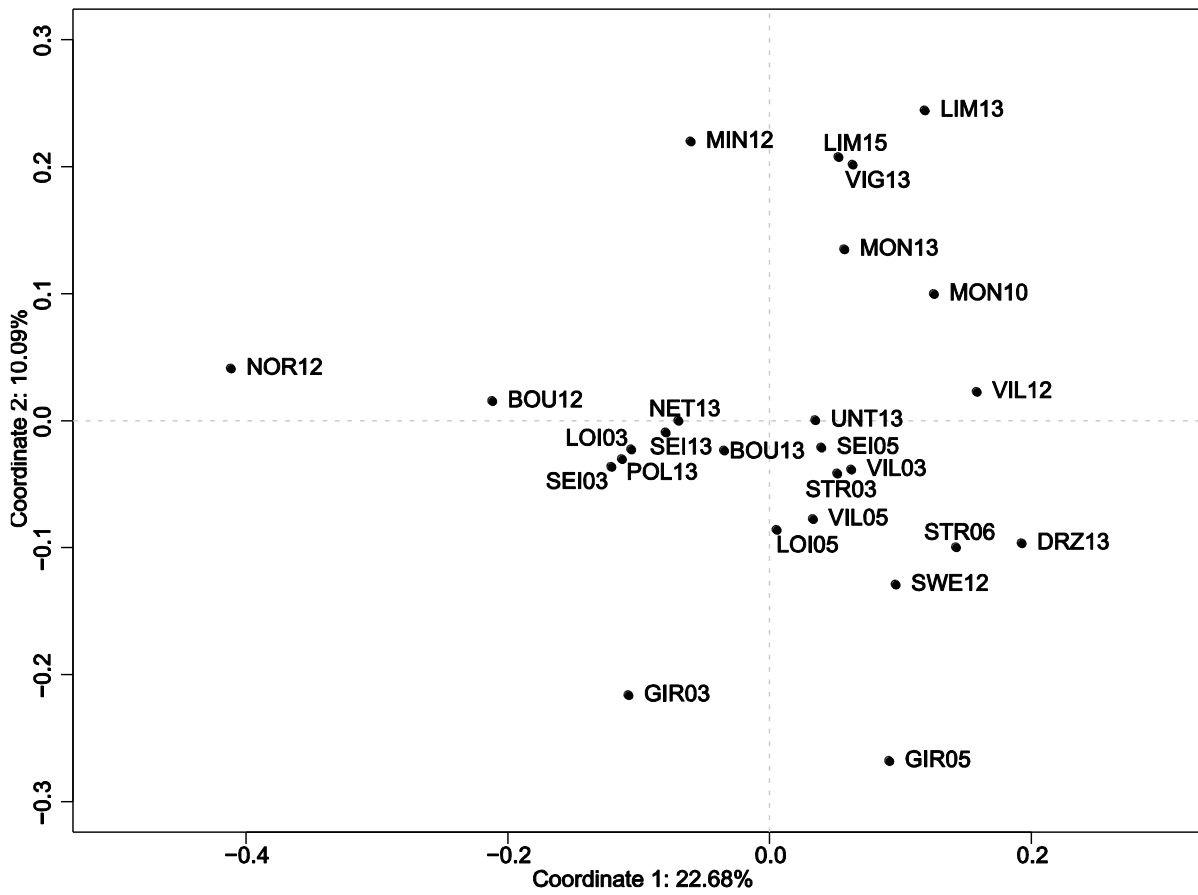


Figure 6: Multidimensional scaling (MDS) on 5 SNPs (BHMT4, AMPD, PGDS, GAPDH, P53)

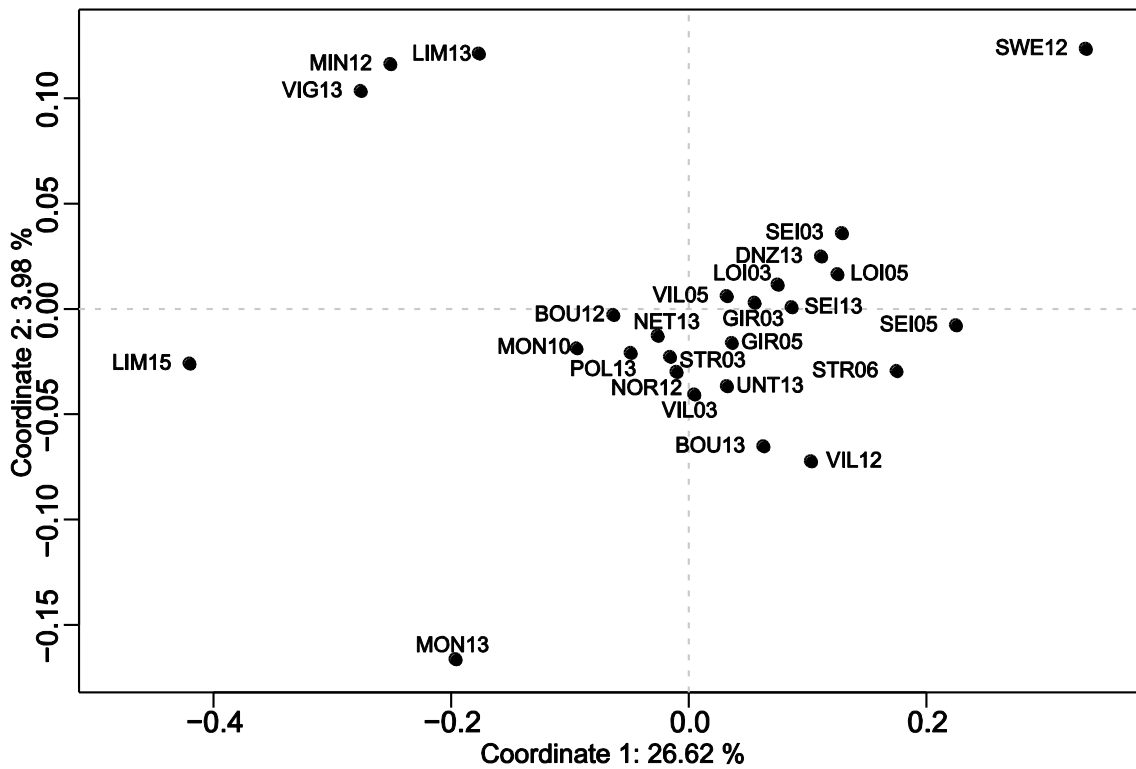


Figure 7: Multidimensional scaling (MDS) on pairwise  $F_{st}$  (GAPDH)

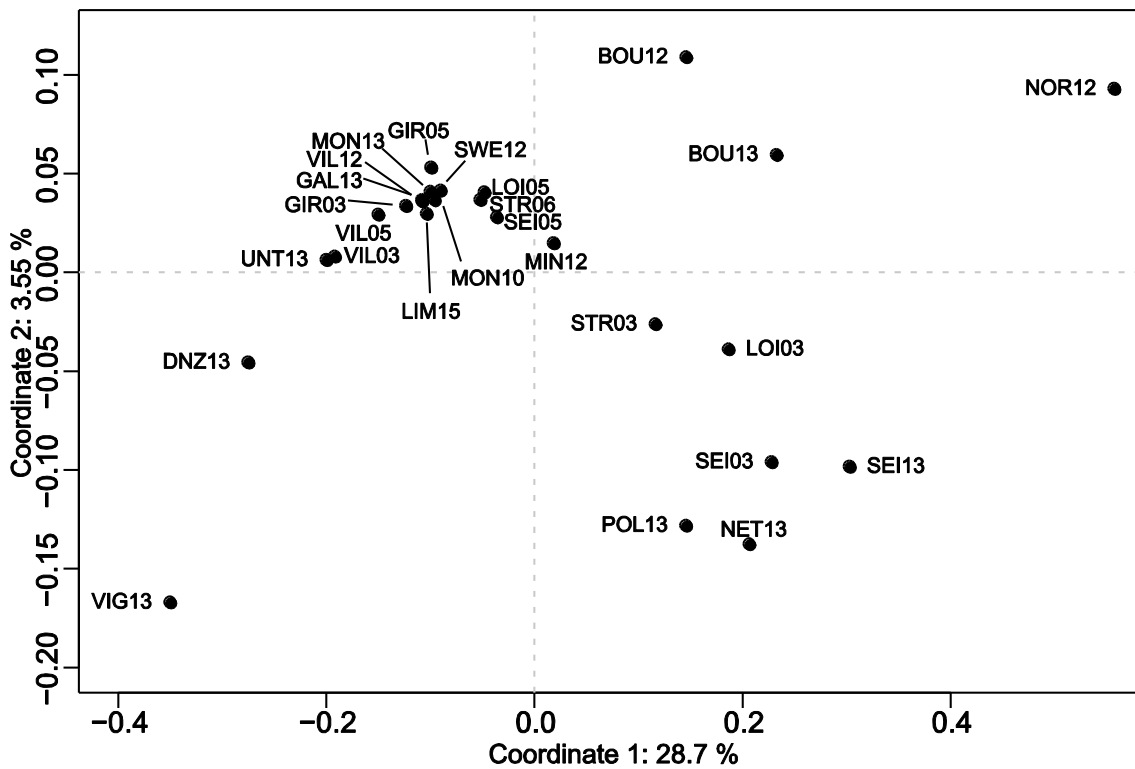


Figure 8: Multidimensional scaling (MDS) on pairwise Fst (PGDS)

Table 2: Differentiation among the 16 populations (Fst: genetic differentiation / Exact test: genic differentiation)

Locus tested	Global Fst	Fst p value	Exact test p value
12 microsatellites	0.022	<0.001***	<0.001***
11 microsatellites (no 33)	0.016	<0.001***	<0.001***
Nplaf_33	0.061	<0.001***	<0.001***
AMPD	0.011	0.012*	0.025*
BHMT3	0.007	0.052	0.086
BHMT4	0.009	0.019*	0.013*
P53	0.009	0.027*	0.046*
PGDS	0.038	<0.001***	<0.001***
GAPDH	0.023	0.001**	<0.001***
Five structuring SNP (no BHMT3)	0.017	0.008**	0.011*

Table 3: Summary of the temporal Fst

Estuary	Years	Fst	p-value
Boulogne-s-Mer	2012-13	0.00	>0.05
Seine	2003-05-13	0.002	>0.05
Ster	2003-06	0.00	>0.05
Vilaine	2003-05-12	0.008	>0.05
Loire	2003-05	0.011*	0.03
Gironde	2003-05	0.005	>0.05
Vigo-Minho-Lima	2012-2013-2015	0.002	>0.05
Mondego	2010-2013	0.007***	<0.001

## Discussion

### **Flounder life-history traits, distribution limits and regional-scale climate changes**

The European flounder is a catadromous boreal species, (1) spawning in moderate water depths (20-50 m), often at the mouth of estuaries, (2) homing back to the natal spawning site, (3) displaying a 2.5 yr juvenile stage within estuaries (Dando 2011). The previous flounder life-history traits, coupled with a limited average annual migration distance (<32 km in Summers (1979) and a reduced ability to migrate over deep seas (Aro 1989) could be major factors structuring the populations over Europe.

Over the North-East Atlantic flounder distribution range, from the Black Sea (72° N) to Portugal (40° N), a latitudinal cline was classically observed considering average sea surface temperature (SST) monitored nearest to different estuaries (OSPAR Commission 1997; Martinho et al. 2013); the highest thermal amplitude was observed in the northern area near Sørøfjord (Norway) and the Dutch Wadden Sea, ranging from 3.5 °C to 15.2 °C and from 3.9 °C to 17.4 °C, respectively. Milder winter conditions and higher summer temperatures were observed in the southern areas, with SST ranging from 8.7 °C to 17.9 °C near the Vilaine estuary, between 12 °C and 21 °C near the Gironde estuary, and finally between 13.3 °C and 18.0 °C near the Mondego estuary. The last three decades, the decrease of the European flounder abundance in the Southern part of its distribution area, in the Bay of Biscay (Hermant et al. 2010) and in the Gironde estuary (Chaalali et al. 2013) was mainly related to the effects of global warming. The flounder is becoming very rare along the Basque coast (Marigómez I., Univ. of the Basque Country, personal communication). Thus it was particularly difficult to sample this region (the Untxin sample collected on juveniles).

Along the Portuguese coast, several functional flounder populations are monitored in the Northern part of the coast, particularly in the Minho and Lima estuaries (Freitas et al. 2009, Ramos et al. 2010, Morais et al. 2011), their persistence being probably linked to the presence of an intense

upwelling during summer (Lima et al. 2007); whereas the Portuguese flounder southern limit has shifted north to the Mondego estuary, linked to recent warming of SST in this region (Cabral et al. 2007; Nicolas et al. 2011).

Thus, the current distribution and abundance of the European flounder in the southern part of its distribution (from Bay of Biscay to Portugal) is not described by a simple latitudinal gradient as a proxy for temperature, but is highly related to regional-scale climate changes.

### **Genetic structure of European flounder populations assessed by microsatellites**

In summary, over the whole data set (12 microsatellite loci), 11 loci were considered as neutral markers whereas one locus (Nplaf\_33) was possibly/likely submitted to a selective pressure. A low number of significant deficits in heterozygotes were observed for particular microsatellite loci. And no significant departure from HWE linked to null alleles was detected. Thus globally, in this study, the flounder populations reflected equilibrium between migration vs drift.

A loss of allelic diversity was clearly detected in peripheral populations, both northern (Norway) and southern (Mondego), compared to central ones. This trend was not detected in a previous study on *P. flesus*, comparing Mondego to more northern populations (Calvès et al. 2013), with the higher number of loci used in the present study (from 8 to 12) likely significantly improving the estimation of the genetic diversity level within populations. Hemmer-Hansen et al. (2007a) also highlighted a decline in allelic richness of flounder in the extreme part of the sampled area (Lake Pulmanki in Finland and Faeroe Islands).

The loss of allelic diversity in the peripheral populations agrees with the assumption that ends of species' range tend to be less genetically variable than central areas due to stochastic processes (founder effects, genetic drift, low gene flow) (Hardie & Hutchings, 2010). The Mondego area harbours the most southern functional flounder population in Europe (Martinho et al. 2009, 2010) and is probably submitted to frequent demographic bottlenecks and genetic drift. Nevertheless, if true, these putative bottlenecks in the Mondego, and possibly in the Untxin populations, don't seem to have significantly reduced their effective population sizes since our  $N_e$  estimations, show a general trend for infinity for all populations of the data set.

A highly significant temporal variability ( $p < 0.001$ ), was detected only for the Mondego population, whereas temporal stability was observed for the Boulogne, Seine, Ster, Vilaine, Gironde and Northern Portugal populations. This result must be considered cautiously since the analysed temporal scale differed between sampling locations (from 1 to 10 years). However, the observed pattern could confirm the possible effect of demographic bottlenecks and thus of genetic drift in the southern peripheral population of the Mondego.

In the present study, the genetic differentiation among populations over the whole data set



was highly significant regardless of the considered loci ( $F_{st}$  (12 microsatellites) = 0.022,  $F_{st}$  (11 neutral loci) = 0.014). The general level of differentiation among flounder populations was less pronounced in Calvès et al. (2013) with  $F_{st}$  = 0.01 for a narrower part of the species' distribution range (Portugal to the Eastern Channel); whereas the differentiation level was similar ( $F_{st}$  = 0.024) for populations covering a larger part of the flounder distribution (from Bay of Biscay to Finland, including Baltic Sea and Faroe Islands) in Hemmer-Hansen et al. 2007a. Furthermore the present results underlined a significant isolation by distance for the flounder populations along the European coast, which indicates that the geographical distance could be an important factor for structuring populations; even if isolation by distance may sometimes be induced by peripheral populations (Hemmer-Hansen et al. 2007a).

Locus Nplaf\_33 exhibited the highest  $F_{st}$  value over the whole data set (0.061) and was indicated as under selection. The genetic patterns observed in MDS and AMOVA analysis were consistent considering either the whole data set (12 loci) or the 11 neutral loci. Inclusion of the locus under putative selection improved the separation between several groups of populations over a latitudinal cline: Iberian Peninsula vs the Bay of Biscay vs Eastern Channel - North Sea vs northern scattered populations including Norway and Baltic samples. Thus the present study confirms: (1) the particular genetic status of the Iberian populations of flounder, firstly detected by Calvès et al. (2013), (2) the differentiation between Bay of Biscay vs North Sea and also the particularity of the East Baltic samples, as previously observed by Hemmer-Hansen et al. (2007a).

Turbot *Scophthalmus maximus*, a marine flatfish species also distributed in North-East Atlantic with some similar life history traits with flounder (spawning site fidelity, restricted movement of adults within a spawning season), shows a somewhat similar population structure: with a clear division between Atlantic vs Baltic Sea, and a subtle break within the North Sea but no major structure along the Iberian Peninsula, Bay of Biscay, and Eastern Channel continuum (Vandamme et al. 2014). It is possible that the higher genetic structure in European flounder results from its stricter links to estuarine systems.

A convergent genetic structure is also detected within the sand goby *Pomatoschistus minutus*, a small marine demersal fish common in shallow waters along European coasts and estuaries (Nicolas et al. 2011). Phylogeographical patterns of *P. minutus* inferred with mitochondrial DNA and microsatellites, highlighted a clear separation between Iberian, North Atlantic and Baltic groups (Larmuseau et al. 2009, 2010a). Those studies suggest an Iberian refuge for the sand goby during the Pleistocene that did not contribute to the post-glacial expansion in Northern Europe, and thus the presence of two major evolutionary significant units: the Iberian Peninsula and the North Atlantic Groups. A similar phylogeographic story to sand goby can be hypothesized for European flounder, and maybe confirmed via thorough analysis of mitochondrial DNA, since haplotypic diversity in

flounder's cytochrome c oxidase was too limited to draw conclusions (Calvès et al. 2013).

In the present study, the Iberian population group detected by all loci comprised Portuguese and Spanish sampling sites (including the Untxin site in the Basque Country). Within this group, the more northern populations (Lima, Minho, Vigo and Untxin) do not show as genetically differentiated, which can be due to the prevalent surface current in the Cantabrian Sea. Flowing eastward in winter and early spring (Ruiz-Villareal et al. 2006), this current can influence larval dispersal during winter reproduction, and thus gene flow between these populations. On the other hand, the southern population (Mondego) differentiation from the rest of the Iberian group can be associated with the western Iberian buoyant plume (WIBP), a recurrent lens of less saline waters, that is the result of winter discharges of several rivers in the NW Iberian coast and consists of a suitable environment for larval survival, and may be associated with strong poleward transport over the shelf (Santos et al. 2007; Peliz et al. 2005). This northward current can be a limiting factor for the larval flow between demographically active northern populations and the relict Mondego population. Therefore, we suggest that the differentiation between Mondego and northern Iberian populations could result from (1) possible genetic drift in Mondego linked to demographic bottlenecks, and (2) limited possibilities of southward gene flow along the Portuguese coast.

The genetic break between the Untxin and Gironde populations (Bay of Biscay) could be explained by a major disruption in flounder habitat in the southern area of the bay linked to the Cap Breton canyon (Gonthier et al. 2006), and to the limited capacity of the Arcachon – Bayonne coast as a nursery area.

The present study also underlined significant differentiation within the northern flounder populations, namely between northern North Sea vs Baltic Sea. Similar differentiation along the transition between these two seas has been described in numerous studies on fish population genetics in this area (Hemmer-Hansen et al. 2007; Lamichhaney et al. 2012; Limborg et al. 2012; Vandamme et al. 2014), revealing complex patterns of spatial genetic variation. Within the Baltic Sea, the present study revealed a significant differentiation between southern (Poland) and central (Sweden) regions ( $F_{ST}$  multilocus = 0.039,  $p < 0.001$ ), similar to the microsatellite differentiation detected by Florin & Höglund (2008) on flounder populations sampled close by ( $F_{ST} = 0.035$ ,  $p < 0.001$ ). Those authors attributed this pattern to spawning behavior: demersal spawning in the northern and central Baltic, and pelagic spawners in the southern Baltic.

### **Genetic structure of European flounder populations assessed by SNPs**

In this study, the polymorphism of six SNPs, located on candidate genes involved in bioenergetics and response to environmental stress, was explored over the geographical range of European flounder. Highly significant differentiation over the whole data set was detected for two

loci (GAPDH & PGDS, with  $0.023 < F_{ST} < 0.038$ ,  $p < 0.001$ ), whilst more limited or no differentiation was observed for the other loci (P53, BHMT4, AMPD with  $F_{ST} < 0.01$ ,  $p < 0.05$  / BHMT3 with insignificant  $F_{ST}$ ). Thus, the general level of SNP differentiation over the whole populations is of the same order of magnitude of that detected via microsatellites.

The MDS based on the five structuring SNPs highlighted the isolation of the northern population (Norway) and a clear separation of two clusters: Gironde and Iberian Peninsula. This pattern contrasts with the pattern based on the microsatellites. Thus we suggest that the patterns of differentiation are divergent between the two types of markers, i.e. a possible local selection-adaptation is shaping the genetic variability of SNPs, particularly in ecologically marginal populations (“cold and variable” environment in Norway / “warm and variable” environment in Gironde). The evident separation of the Iberian Peninsula cluster regardless of the considered markers could support our previous hypothesis of a flounder Iberian refugium with no contribution to the post glacial expansion. This is, a persisting population experiencing a particular “warm and stable” environment in this putative southern refuge adapting and evolving isolated from the rest of the northern populations.

The MDS based on GAPDH showed a clear isolation of the Iberian Peninsula group, as well as Sweden (central Baltic) from the rest of samples of diversified origins. The pronounced differentiation between the two Baltic sites (Sweden and Poland, previously included in the same group) could be linked to different life history traits of flounder in central vs southern Baltic. As mentioned previously, contrasting abiotic conditions (central and northern Baltic have harsher conditions of salinity, temperature and eutrophication) can potentially explain a flounder’s decline in this area (Jokinen et al. 2015). Differential modes of selection have been suggested for Northern vs Southern Baltic Sea fish populations considering distinctive candidate genes (Larmuseau et al. 2010b; Teacher et al. 2013). For example, GAPDH is related to bioenergetics through glycolysis, and numerous environmental stressors can induce a selective pressure on this gene, particularly in harsh environments: low salinity and temperature in the Swedish site (central Baltic) vs high salinity and temperature in sampled estuaries of Iberian Peninsula.

The MDS based on PGDS displayed a mixture of weakly differentiated samples mainly collected in Bay of Biscay and Iberian Peninsula, and two isolated groups: Boulogne/ Norway-weakly polluted populations vs Seine/Netherlands/Poland-heavily polluted populations. PGDS is potentially involved in the metabolization of organic pollutants and in the modulation of inflammations induced by stressors (Vogel 2000; Marchand et al. 2010, 2013; Ricciotti & Fitzgeralds 2011) and thus could be submitted to a differential selective pressure linked to contamination in northern estuaries.

## 5) Conclusion

The present study on genetic variation across the European flounder geographic range confirmed the highly significant differentiation of populations over the whole data set. Four major groups of populations were identified by the full microsatellites set (Iberian Peninsula, Bay of Biscay, Eastern Channel, North Sea, Baltic Sea), with the inclusion of one putatively selected microsatellite significantly improving the differentiation between groups. The genetic structure based on five SNP loci (submitted to selective pressure according to previous studies), showed a level of structuring similar to the microsatellites data set, but exhibited clear divergent patterns probably linked to environmental selection. Thus, the SNPs multilocus analysis displayed a robust differentiation between ecologically marginal groups of populations (Iberian Peninsula, Gironde, Norway) with contrasting thermal regimes. The genetic structure based on specific SNPs loci: (1) confirmed the relative isolation of the Iberian Peninsula flounder populations possibly linked to a selective pressure on a gene involved in bioenergetics (GAPDH), and (2) highlighted a differentiation possibly between populations in more and less polluted areas, related to a potential selective pressure on the PGDS gene involved in detoxification processes and inflammation. This study confirms that the combined use of neutral and non-neutral loci allows for deeper insights in genetic structuring of fish populations, in this case across the North-East Atlantic and Baltic Sea (Limborg et al. 2012; Teacher et al. 2013; Hemmer-Hansen et al. 2014; Pampoulie et al. 2015).

Globally this work reveals new insights into the genetic structure of the European flounder across the North-East Atlantic, particularly the clear differentiation of the Iberian Peninsula group compared to northern groups. The contraction-edge populations of flounder in Iberian Peninsula probably contain endemic genetic variation that is under immediate threat from ongoing climate-induced range shifts with signatures of demographic bottlenecks and genetic drift detected in the species southern distribution limit, i.e. the Mondego estuary in Portugal. Appropriate conservation strategies need to be designed considering the specificity of contraction edge of fish populations, directed towards the maintenance of the greatest possible number of local populations (Hampe & Petit, 2005).

### Acknowledgements:

This work was supported by the ANR program VMCS-EVOLFISH (Paris) and the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19).

## Bibliography

- Alberto FJ, Aitken SN, Alia R, González-Martínez C, Hänninen H, Kremer A, Lefèvre F, Lenormand T, Yeaman S, Whetten R, Savolainen O (2013) Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology* **19**: 1645-1661
- Antao T, Lopes A, Lopes RJ, et al (2008) LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics* **9**:323.
- Aro E (1989) A review of fish migration patterns in the Baltic. *Rapp P-V Cons Int Explor Mer* **190**: 72-96
- Assis J, Castilho Coelho N, Alberto F, Valero M, Raimondi P, Reed D, Alvares Serrão E (2013) High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE* **8**(7): e68646
- Beaugrand G, Edwards M, Brander K, Luczak C, Ibanez F (2008) Causes and projections of abrupt climate-driven ecosystem shifts in the North Atlantic. *Ecol Lett* **11**: 1157-1168
- Berghmans S, Murphey RD, Wienhods E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD, Morris JP, Liu TX, Schulte-Merker S, Kanki JP, Plasterk R, Zon LI, Look AT (2005). tp5" Mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *PNAS* **102**: 407-412
- Bigg GR, Cunningham CW, Ottersen G, Pogson GH, Wadley MR, Williamson P (2008) Ice-age survival of Atlantic cod: agreement between palaeology models and genetics. *Proc R Soc B* **275**: 163-172
- Cabral HN, Costa MJ, Salgado JP (2001) Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes ? *Clim Res* **18**:119-126
- Cabral HN, Vasconcelos RP, Vinagre C, França S, Maia A, Reis-Santos P, Lopes M, Ruano M, Campos J, Freitas V, Santos PT, Coasta MJ (2007) Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *J Sea Res* **57**: 209-217
- Cachot J, Flaman JM, Frébourg T, Leboulanger F (2004) The european flounder (*Platichthys flesus*) TP53 functions as a temperature-sensitive transcription factor which inhibits cell growth in yeast. *Gene* **324**: 97-104
- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser* **472**: 257-273
- Chaalali A, Beaugrand G, Boët P, Sautour B (2013) Climate-caused abrupt shifts in a European macrotidal estuary. *Estuaries and Coasts* **36**: 1193-1205
- Dando PR (2011) Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar Ecol Prog Ser* **430**: 183-196
- Dieni CA, Storey KB (2008) Regulation of 5'-adenosine monophosphate deaminase in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *BMC Biochemistry* **9**:12
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, Amara R, Charrier G, Fournier M, Laroche J (2015) Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Poll Bull* **95**: 634-645
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* **17**: 1170-1188

- Everett M V, Antal CE, Crawford DL (2012) The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **317**: 9–23
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under linux and windows. *Mol Ecol Resources* **10**(3): 564-567
- Florin A-B, Höglund J (2008) Population structure of flounder (*Platichthys flesus*) in the Baltic Sea: differences among demersal and pelagic spawners. *Heredity* **101**: 27–38
- Freitas V, Costa-Dias S, Campos J, Bio A, Santos P, Antunes C (2009) Patterns in abundance and distribution of juvenile flounder, *Platichthys flesus*, in Minho estuary (NW Iberian Peninsula). *Aquat Ecol* **43**: 1143-1153
- Fujimori K, Inui T, Uodome N, et al (2006) Zebrafish and chicken lipocalin-type prostaglandin D synthase homologues: Conservation of mammalian gene structure and binding ability for lipophilic molecules, and difference in expression profile and enzyme activity. *Gene* **375**: 14-25
- Galland C, Dupuy C, Loizeau V, Danion M, Auffret M, Quiniou L, Laroche J, Pichereau V (2015) Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Mar Pollut Bull* **95**: 646-657
- Gonthier E, Cirac P, Faugeres JC, Gaudin M, Cremer M, Bourillet JF (2006) Instabilities and deformation in the sedimentary cover on the upper slope of the southern Aquitaine continental margin, north of the Capbreton canyon (Bay of Biscay). *Sci Mar* **70** (Suppl 1): 89-100
- Hampe A, Petit RJ (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett* **8**: 461-467
- Hardie DC, Hutchings JA (2010) Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environ Rev* **18**: 1-20
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Gronkjaer P, Loeschcke V (2007a) Evolutionary mechanisms shaping the genetic structure of marine fishes: lessons from the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol* **16**: 3104-3118
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Frydenberg J, Loeschcke V (2007b) Adaptive divergence in a high gene flow environment: *Hsc70* variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity* **99**:592–600
- Hemmer-Hansen J, Overgaard Therkildsen N, Meldrup D, Nielsen EE (2014) Conserving marine biodiversity: insights from life-history trait candidate genes in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Conserv Genet* **15**: 213-228
- Hermant M, Lobry J, Bonhommeau S, Poulard JC, Le Pape O (2010) Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J Sea Res* **64**: 45–53
- Jokinen H, Wennhage H, Lappalainen A, Ádjers K, Rask M, Norkko A (2015) Decline of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the margin of the species' distribution range. *J Sea Res* **105**: 1-9
- Lamichhaney S, Martinez Barrio A, Rafati N, Sundström G, Rubin CJ, Gilbert ER, Berglund J, Wetterbom A, Laikr L, Webster M, Grabherr M, Ryman N, Anderson L (2012) Population-scale sequencing reveals genetic differentiation due to local adaptation in Atlantic herring. *PNAS* **109**(47): 19345-19350
- Larmuseau MHD, Van Houdt JKJ, Guelinckx J, Hellemans B, Volckaert FAM (2009) Distributional and



- demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *J Biogeogr* **36**: 1138-1151
- Larmuseau MHD, Raeymaekers JAM, Hellemans B, Van Houdt JKJ, Volckaert FAM (2010a) Mito-nuclear discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. *Heredity* **105**: 532-542
- Larmuseau MHD, Vancampenhout K, Raeymaekers JAM, Van Houdt JKJ, Volckaert FAM (2010b) Differential modes of selection on the rhodopsin gene in coastal Baltic and North Sea populations of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Mol Ecol* **19**: 2256-2268
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 738-748.
- Larsen PF, Nielsen EE, Hansen MM, Wang T, Meier K, Pertoldi C, Loeschcke V (2013) Tissue specific haemoglobin gene expression suggests adaptation to local marine conditions in North Sea flounder (*Platichthys flesus* L.). *Genes Genom* **35**: 541-547
- Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD, Hemmer-Hansen J, Chipman JK, Kruhøffer M, Grønkjær P, George SG, Dyrskjøt L, Loeschcke V (2007) Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol* **16**: 4674-4683
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, et al (2015) Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Pollut Bull* **95**:658–64.
- Lesica P, Allendorf FW (1994) When are peripheral populations valuable for conservation ? *Conserv Biol* **9**(4): 753-760
- Lima FP, Ribeiro PA, Queiroz N, Hawkins SJ, Santos AM (2007) Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern ? *Global Change Biology* **13**: 2592-2604
- Limborg MT, Helyar SJ, De BRUYN M, Taylor MI, Nielsen EE, Ogden R, Carvalho GR, FPT Consortium, Bekkevold D (2012) Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*) *Mol Ecol* **21**: 3686-3703
- Maggs, C. A., R. Castilho, D. Foltz, C. Henzler, M. Taimour Jolly, J. Kelly, J. Olsen et al. (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* **89**:S108–S122.
- Marchand J, Evrard E, Guinand B, Cachot J, Quiniou L, Laroche J (2010) Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Mar Environ Res* **70**: 201-209
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013) Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *J Xenobiotics* **3**(s1):e14
- Marotta R, Parry BR, Shain DH (2009) Divergence of AMP Deaminase in the ice worm *Mesenchytraeus solifugus* (Annelida, Clitellata, Enchytraeidae). *Int J Evol Biol*, volume 2009, Article ID715086, 10 pages
- Martinho F, Dolbeth M, Viegas I, Baptista J, Cabral HN, Pardal MA (2010) Does the flatfish community of

- the Mondego estuary (Portugal) reflect environmental changes ? *J Appl Ichthyol* **26**: 843-852
- Martinho F, Dolbeth M, Viegas I, Teixeira CM, Cabral HN, Pardal MA (2009) Environmental effects on the recruitment variability of nursery species. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **83**: 460-468
- Martinho F, van der Veer HW, Cabral HN, Pardal MA (2013) Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *J Sea Res* **84**: 61-69
- Morais P, Dias E, Babaluk J, Antunes C (2011) The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *J Sea Res* **65**: 235-246
- Moritz C, Langham G, Kearney M, Krockenberger A, VanDerWal J, Williams S (2012) Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**:1680-1687
- Munday PL, Warner RR, Monro K, Pandolfi JM, Marshall DJ (2013) Predicting evolutionary responses to climate change in the sea. *Ecol Lett* **16**: 1488-1500
- Nicolas D, Chaalali A, Drouineau H, Lobry J, Uriarte A, Borja A, Boët P (2011) Impact of global warming on European tidal estuaries: some evidence of northward migration of estuarine fish species. *Reg Environ Change* **11**: 639-649
- Pampoulie C, Slotte A, Óskarsson GJ, Helyar SJ, Jónsson Á, Ólafsdóttir G, Skírnisdóttir S, Libungan LA, Jacobsen JA, Joensen H, Nielsen HH, Sigurðsson SK, Danielsdóttir AK (2015) Stock structure of Atlantic herring *Clupea harengus* in the Norwegian Sea and adjacent waters. *Mar Ecol Prog Ser* **522**: 219-230
- Pédrón N, Morvezen R, Le Moan A, Guinand B, Zambonino-Infante JL, Laroche J, Charrier G. (2015) New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to anthropogenic stress and contrasted environments. *Cons Genet Resour*, Technical note DOI 10.1007/s12686-015-0492-9
- Peliz Á, Dubert J, Santos AMP, Oliveira PB, Le Cann B (2005) Winter upper ocean circulation in the Western Iberian Basin-Fronts, Eddies and Poleward Flows: an overview. *Deep-Sea Res* **52**: 621-646
- Provan J (2013) The effects of past, present and future climate change on range-wide genetic diversity in northern North Atlantic marine species. *Frontiers of Biogeography* **5**: 60-66
- Ramos S, Ré P, Bordalo AA (2010) Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *J Sea Research* **64**: 473-486
- Richards RC, Short CE, Driedzic WR, Ewart KV (2010) Seasonal changes in hepatic gene expression reveal modulation of multiple processes in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *Mar Biotechnol (NY)* **12**: 650-663
- Ricciotti E, Fitzgerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 986-1000
- Rijnsdorp AD, Peck MA, Engelhard GH, Möllmann C, Pinnegar JK (2009) Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES Journal of Marine Science* **66**: 1570-1583
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and



Linux. *Mol Ecol Resour* **8**:103-106

- Ruiz-Villareal M, Gonzalez-Pola C, Diaz del Rio G, Lavin A, Otero P, Piedracoba S, Cabanas JM (2006) Oceanographic conditions in North and Northwest Iberia and their influence on the Prestige oil spill. *Mar Poll Bull* **53**: 220-238
- Sambrook J, Fritscher EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santos AMP, Chicharro A, Dos Santos A, Moita T, Oliveira PB, Peliz Á, Ré P (2007) Physical-biological interactions in the life history of small pelagic fish in the Western Iberia Upwelling Ecosystem. *Progress in Oceanography* **74**: 192-209
- Summers RW (1979) Life cycle and population ecology of the flounder *Platichthys flesus* (L.) in the Ythan estuary, Scotland. *J Nat Hist* **13**: 703-723
- Sunday JM, Bates AE, Dulvy NK (2012) Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change* **2**: 686-690
- Teacher AGF, André C, Jonsson PR, Merilä J (2013) Oceanographic connectivity and environmental correlates of genetic structuring in Atlantic herring in the Baltic Sea. *Evolutionary Applications* **6**: 549-567
- Vandamme SG, Maes GE, Raeymaekers JAM, Cottenie K, Imsland AK, Hellemans B, Lacroix G, Mac Aoidh E, Martinsohn JT, Martínez P, Robbens J, Vilas R, Volckaert FAM (2014) Regional environmental pressure influences population differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mol Ecol* **23**: 618-636
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* **4**: 535-538
- Vogel C (2000) Prostaglandin H synthases and their importance in chemical toxicity. *Current Drug Metabolism* **1**: 391-404
- Waples RS, Do C (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* **3**: 244-262
- Weir BS, Cokerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**(6): 1358-1370
- Yoshino M, Murakami K (1981) In situ studies on AMP deaminase as a control of the adenylate charge in yeasts. *Biochim Biophys Acta* **672**: 16-20

Supplementary data

Table S1: Genetic diversity (microsatellites): number of alleles (Na), expected (He) and observed (Ho) heterozygosities, heterozygote deficiency/excess (FIS). Bold indicates values that remained significant after FDR correction

		Nplaf_35	Nplaf_27	Nplaf_08	Nplaf_51	Nplaf_33	Nplaf_23	Nplaf_15	Nplaf_30	Nplaf_28	Nplaf_25	Nplaf_24	Nplaf_14	Multilocus
POL13	Na	16	10	6	6	18	5	5	4	8	4	8	3	7.75
n = 35	He	0.876	0.821	0.512	0.714	0.859	0.539	0.474	0.250	0.670	0.699	0.647	0.246	0.61
	Hobs	0.820	0.667	0.438	0.771	0.940	0.592	0.380	0.280	0.640	0.580	0.660	0.200	0.58
	FIS	0.065	<b>0.190**</b>	0.147	-0.081	-0.095	-0.099	<b>0.200*</b>	-0.120	0.045	0.172	-0.021	0.188	<b>0.047*</b>
SWE12	Na	10	10	4	5	7	4	4	2	5	4	4	3	5.17
n = 39	He	0.837	0.801	0.224	0.672	0.668	0.336	0.531	0.033	0.643	0.542	0.644	0.477	0.53
	Hobs	0.846	0.857	0.207	0.700	0.750	0.310	0.571	0.033	0.577	0.633	0.571	0.241	0.52
	FIS	-0.011	-0.071	0.079	-0.043	-0.127	0.077	-0.079	0.000	0.104	-0.172	0.114	<b>0.499**</b>	0.017
NOR12	Na	15	10	3	8	13	4	4	2	7	3	5	3	6.42
n = 28	He	0.907	0.788	0.419	0.723	0.805	0.459	0.340	0.230	0.689	0.637	0.680	0.322	0.58
	Hobs	0.889	0.778	0.482	0.500	0.808	0.385	0.385	0.259	0.692	0.667	0.741	0.259	0.57
	FIS	0.020	0.013	-0.152	<b>0.313**</b>	-0.004	0.165	-0.134	-0.130	-0.004	-0.048	-0.091	0.198	0.023
NET13	Na	15	11	3	8	22	4	5	4	7	6	6	3	7.83
n = 50	He	0.881	0.826	0.376	0.633	0.884	0.510	0.577	0.417	0.768	0.677	0.667	0.367	0.63
	Hobs	0.919	0.722	0.350	0.585	0.825	0.537	0.537	0.513	0.730	0.675	0.641	0.250	0.61
	FIS	-0.043	0.127	0.070	0.076	0.067	-0.054	0.071	-0.234	0.051	0.002	0.039	<b>0.322*</b>	0.040
BOU12	Na	16	9	4	6	17	4	5	3	4	4	5	3	6.67
n = 24	He	0.933	0.781	0.354	0.720	0.930	0.411	0.611	0.320	0.672	0.681	0.651	0.213	0.61
	Hobs	0.955	0.727	0.318	0.818	0.905	0.500	0.619	0.227	0.636	0.682	0.636	0.227	0.60
	FIS	-0.023	0.071	0.104	-0.140	0.028	-0.222	-0.014	0.295	0.055	-0.002	0.023	-0.071	0.004
BOU13	Na	14	11	4	8	20	3	5	4	6	4	4	4	7.25
n = 22	He	0.924	0.800	0.345	0.756	0.915	0.369	0.576	0.253	0.736	0.660	0.555	0.404	0.61
	Hobs	1.000	0.783	0.304	0.714	0.857	0.364	0.546	0.273	0.682	0.652	0.682	0.364	0.60
	FIS	-0.085	0.022	0.120	0.057	0.065	0.015	0.054	-0.082	0.075	0.012	-0.235	0.102	0.010
SEI03	Na	16	15	6	8	20	4	5	3	7	4	4	2	7.83
n = 38	He	0.939	0.830	0.431	0.729	0.845	0.457	0.619	0.240	0.669	0.670	0.530	0.352	0.61
	Hobs	0.941	0.757	0.474	0.694	0.811	0.568	0.667	0.263	0.619	0.539	0.450	0.296	0.59
	FIS	-0.002	0.089	-0.101	0.048	0.041	-0.245	-0.078	-0.098	0.076	0.200	0.153	0.161	0.033
SEI05	Na	17	10	5	6	18	5	4	3	7	4	6	4	7.42
n = 30	He	0.925	0.794	0.547	0.761	0.837	0.513	0.619	0.252	0.786	0.624	0.605	0.419	0.64
	Hobs	0.833	0.714	0.444	0.686	0.833	0.417	0.694	0.167	0.750	0.611	0.583	0.278	0.58
	FIS	<b>0.100*</b>	0.101	0.189	0.100	0.004	0.190	-0.125	<b>0.342*</b>	0.046	0.021	0.035	<b>0.34*</b>	<b>0.088*</b>
SEI13	Na	15	9	5	8	17	5	5	4	7	5	5	4	7.42
n = 36	He	0.907	0.832	0.461	0.746	0.854	0.536	0.621	0.296	0.701	0.674	0.596	0.348	0.63
	Hobs	0.862	0.897	0.467	0.750	0.929	0.500	0.607	0.267	0.700	0.800	0.567	0.233	0.63
	FIS	0.050	-0.079	-0.012	-0.005	-0.089	0.069	0.023	0.099	0.001	-0.191	0.049	<b>0.332*</b>	-0.001
DNZ13	Na	19	11	5	7	21	5	5	2	6	4	4	2	7.58
n = 39	He	0.915	0.824	0.452	0.669	0.926	0.523	0.449	0.281	0.747	0.600	0.578	0.298	0.61
	Hobs	0.750	0.778	0.342	0.595	0.857	0.487	0.378	0.282	0.711	0.615	0.513	0.359	0.56
	FIS	<b>0.182**</b>	0.057	0.245	0.112	0.076	0.069	0.159	-0.002	0.049	-0.026	0.114	-0.206	<b>0.082**</b>
STR03	Na	12	7	5	7	19	4	6	3	8	4	6	2	6.92
n = 38	He	0.892	0.738	0.382	0.683	0.915	0.528	0.547	0.296	0.704	0.605	0.684	0.357	0.61
	Hobs	0.944	0.684	0.361	0.677	0.871	0.611	0.344	0.276	0.516	0.667	0.786	0.212	0.58

### Chapitre III : Structure génétique des populations

	FIS	-0.061	0.075	0.056	0.010	0.049	-0.160	<b>0.375*</b>	0.069	<b>0.271*</b>	-0.104	-0.151	<b>0.409*</b>	<b>0.052*</b>
STR06	Na	16	8	5	6	19	5	5	2	6	4	5	2	6.92
n = 28	He	0.940	0.804	0.488	0.694	0.918	0.608	0.462	0.296	0.679	0.677	0.614	0.348	0.63
	Hobs	0.842	0.850	0.478	0.739	0.913	0.591	0.455	0.350	0.455	0.522	0.476	0.348	0.58
	FIS	0.107	-0.059	0.020	-0.067	0.005	0.028	0.016	-0.187	<b>0.335*</b>	0.234	0.229	0.000	<b>0.069*</b>
VIL03	Na	14	9	5	7	19	5	5	3	8	3	3	3	7.00
n = 36	He	0.926	0.829	0.591	0.692	0.924	0.604	0.593	0.317	0.674	0.587	0.552	0.360	0.64
	Hobs	0.818	0.895	0.464	0.615	0.960	0.500	0.636	0.364	0.480	0.440	0.539	0.296	0.58
	FIS	0.119	-0.081	0.217	0.113	-0.040	0.175	-0.075	-0.151	<b>0.292*</b>	0.254	0.025	0.179	<b>0.085**</b>
VIL05	Na	18	9	4	8	20	4	5	4	10	5	7	3	8.08
n = 35	He	0.923	0.760	0.437	0.658	0.928	0.605	0.521	0.234	0.732	0.580	0.550	0.352	0.61
	Hobs	1.000	0.607	0.441	0.714	0.971	0.629	0.471	0.200	0.800	0.571	0.514	0.343	0.61
	FIS	-0.085	<b>0.204*</b>	-0.009	-0.087	-0.048	-0.040	0.098	0.145	-0.095	0.015	0.066	0.027	0.002
VIL12	Na	14	10	3	7	15	4	5	4	9	4	4	3	6.83
n = 24	He	0.908	0.748	0.441	0.745	0.898	0.590	0.521	0.415	0.774	0.554	0.597	0.305	0.62
	Hobs	0.957	0.739	0.375	0.667	0.958	0.417	0.591	0.375	0.696	0.696	0.682	0.348	0.62
	FIS	-0.054	0.012	0.152	0.107	-0.069	<b>0.298*</b>	-0.137	0.098	0.103	-0.264	-0.145	-0.143	-0.001
LOI03	Na	15	5	4	8	20	4	5	3	8	5	5	3	7.08
n = 38	He	0.925	0.695	0.437	0.718	0.922	0.558	0.519	0.371	0.767	0.590	0.617	0.413	0.63
	Hobs	0.960	0.720	0.514	0.667	0.714	0.541	0.600	0.393	0.700	0.500	0.517	0.361	0.60
	FIS	-0.039	-0.037	-0.177	0.073	<b>0.228***</b>	0.032	-0.159	-0.061	0.088	0.154	0.163	0.127	0.046
LOI05	Na	16	13	5	6	20	4	5	2	9	5	5	3	7.75
n = 35	He	0.931	0.815	0.437	0.694	0.902	0.574	0.514	0.083	0.783	0.644	0.546	0.420	0.61
	Hobs	0.788	0.800	0.371	0.486	0.857	0.400	0.457	0.086	0.686	0.606	0.485	0.235	0.52
	FIS	<b>0.156**</b>	0.019	0.152	<b>0.303**</b>	0.050	<b>0.307*</b>	0.111	-0.030	0.126	0.060	0.113	<b>0.443**</b>	<b>0.149***</b>
GIR03	Na	18	8	5	9	20	6	5	3	8	4	4	3	7.75
n = 38	He	0.927	0.789	0.439	0.735	0.932	0.596	0.602	0.381	0.764	0.452	0.522	0.343	0.62
	Hobs	0.920	0.810	0.500	0.517	0.926	0.625	0.679	0.333	0.484	0.484	0.500	0.323	0.59
	FIS	0.008	-0.027	-0.143	<b>0.300*</b>	0.007	-0.050	-0.130	0.127	<b>0.371**</b>	-0.071	0.042	0.061	<b>0.051*</b>
GIR05	Na	20	11	4	6	17	4	5	4	9	5	5	3	7.75
n = 35	He	0.935	0.801	0.516	0.719	0.888	0.532	0.444	0.163	0.730	0.607	0.588	0.347	0.61
	Hobs	0.909	0.788	0.543	0.765	0.794	0.529	0.382	0.171	0.771	0.657	0.429	0.286	0.59
	FIS	0.028	0.016	-0.052	-0.065	0.107	0.004	0.140	-0.054	-0.057	-0.085	<b>0.275*</b>	0.180	0.034
UNT13	Na	15	11	5	7	10	5	5	3	6	4	5	3	6.58
n = 30	He	0.906	0.776	0.499	0.678	0.829	0.573	0.414	0.310	0.609	0.578	0.492	0.396	0.59
	Hobs	0.867	0.767	0.333	0.700	0.867	0.600	0.345	0.300	0.667	0.600	0.467	0.167	0.56
	FIS	0.044	0.012	<b>0.336**</b>	-0.033	-0.046	-0.047	0.169	0.033	-0.097	-0.039	0.053	<b>0.583***</b>	<b>0.054*</b>
LIM13	Na	11	6	2	6	6	3	3	2	4	5	5	3	4.67
n = 69	He	0.928	0.680	0.254	0.754	0.719	0.561	0.393	0.239	0.701	0.453	0.533	0.384	0.55
	Hobs	1.000	0.667	0.286	0.750	0.889	0.714	0.333	0.267	0.357	0.333	0.467	0.267	0.53
	FIS	-0.083	0.020	-0.130	0.005	-0.255	-0.287	0.157	-0.120	<b>0.500**</b>	0.271	0.129	0.313	0.041
VIG13	Na	4	5	5	7	8	3	3	2	7	4	7	3	4.83
n = 40	He	0.867	0.893	0.512	0.736	0.809	0.551	0.304	0.222	0.707	0.377	0.529	0.311	0.57
	Hobs	0.667	0.250	0.438	0.455	0.667	0.500	0.167	0.250	0.400	0.412	0.448	0.303	0.41
	FIS	0.273	<b>0.750**</b>	0.147	<b>0.388**</b>	0.181	0.094	0.463	-0.127	<b>0.438**</b>	-0.095	0.154	0.027	<b>0.292***</b>
MIN12	Na	18	10	5	6	12	5	4	2	6	5	5	3	6.75
n = 35	He	0.934	0.702	0.571	0.685	0.842	0.598	0.474	0.307	0.750	0.558	0.488	0.347	0.60
	Hobs	0.914	0.655	0.594	0.710	0.933	0.706	0.515	0.314	0.618	0.486	0.486	0.314	0.60
	FIS	0.021	0.067	-0.041	-0.036	-0.111	-0.183	-0.088	-0.025	<b>0.178*</b>	0.131	0.005	0.097	0.002
LIMA15	Na	20	12	5	7	18	5	4	2	11	5	7	3	8.25

### Chapitre III : Structure génétique des populations

n = 68	He	0.927	0.825	0.536	0.702	0.811	0.634	0.424	0.381	0.768	0.412	0.457	0.403	0.51
	Hobs	0.895	0.803	0.508	0.731	0.815	0.626	0.403	0.292	0.661	0.409	0.515	0.318	0.502
	FIS	0.035	0.027	0.053	-0.042	-0.005	0.013	0.05	0.236	0.14	0.009	-0.128	0.213	0.500
FIG10	Na	19	8	5	7	11	4	4	2	5	5	5	2	6.42
n = 35	He	0.933	0.793	0.499	0.692	0.769	0.506	0.397	0.403	0.718	0.431	0.408	0.433	0.58
	Hobs	0.906	0.800	0.588	0.655	0.630	0.576	0.424	0.424	0.515	0.382	0.394	0.382	0.56
	FIS	0.029	-0.009	-0.182	0.054	<b>0.184*</b>	-0.141	-0.069	-0.054	0.286	0.114	0.034	0.119	0.044
FIG13	Na	20	11	5	7	16	5	4	2	7	5	6	2	7.50
n = 65	He	0.929	0.763	0.511	0.704	0.742	0.626	0.347	0.321	0.725	0.484	0.430	0.244	0.57
	Hobs	0.936	0.694	0.578	0.613	0.836	0.563	0.375	0.365	0.656	0.453	0.444	0.219	0.56
	FIS	-0.007	0.092	-0.132	0.130	-0.127	0.103	-0.081	-0.140	0.096*	0.063	-0.035	0.103	0.014
Total	Na	27	21	8	13	36	8	6	6	16	8	9	5	

### Chapitre III : Structure génétique des populations

Table S2: Estimation of genetic differentiation  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, above diagonal) and exact test of genic differentiation (under diagonal) considering the 12 microsatellites. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

FST	POL13	SWE12	NOR12	NET13	BOU12	BOU13	SEI03	SEI05	SEI13	DNZ13	STR03	STR06	VIL03	VIL05	VIL12	LOI03	LOI05	GIR03	GIR05	UNT13	LIML13	VIG13	MIN12	LIM15	MON10	MON13		
POL13	0	<b>0.0396***</b>	<b>0.0220***</b>	<b>0.0158***</b>	<b>0.0140**</b>	<b>0.0220***</b>	<b>0.0259***</b>	<b>0.0177***</b>	<b>0.0129***</b>	<b>0.0236***</b>	<b>0.0272***</b>	<b>0.0165***</b>	<b>0.0224***</b>	<b>0.0294***</b>	<b>0.0253***</b>	<b>0.0282***</b>	<b>0.0241***</b>	<b>0.0380***</b>	<b>0.0207***</b>	<b>0.0414***</b>	<b>0.0659***</b>	<b>0.0387***</b>	<b>0.0477***</b>	<b>0.0567***</b>	<b>0.0755***</b>	<b>0.0614***</b>		
SWE12	<b>0.00***</b>	0	<b>0.0419***</b>	<b>0.0310***</b>	<b>0.0358***</b>	<b>0.0223***</b>	<b>0.0321***</b>	<b>0.0362***</b>	<b>0.0266***</b>	<b>0.0446***</b>	<b>0.0401***</b>	<b>0.0392***</b>	<b>0.0395***</b>	<b>0.0399***</b>	<b>0.0425***</b>	<b>0.0455***</b>	<b>0.0396***</b>	<b>0.0415***</b>	<b>0.0309***</b>	<b>0.0442***</b>	<b>0.0781***</b>	<b>0.0474***</b>	<b>0.0545***</b>	<b>0.0602***</b>	<b>0.0946***</b>	<b>0.0749***</b>		
NOR12	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0	<b>0.0273***</b>	<b>0.0191***</b>	<b>0.0270***</b>	<b>0.0267***</b>	<b>0.0324***</b>	<b>0.0276***</b>	<b>0.0256***</b>	<b>0.0250***</b>	<b>0.0224***</b>	<b>0.0288***</b>	0.0213	<b>0.0272***</b>	<b>0.0267***</b>	<b>0.0225***</b>	<b>0.0365***</b>	<b>0.0281***</b>	<b>0.0249***</b>	<b>0.0530***</b>	<b>0.0321***</b>	<b>0.0321***</b>	<b>0.0497***</b>	<b>0.0754***</b>	<b>0.0532***</b>		
NET13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0	0.0005	0.0051	<b>0.0082*</b>	0.0015	-0.0005	0.0058	<b>0.0108*</b>	0.0043	<b>0.0088*</b>	<b>0.0154***</b>	0.0081	<b>0.0103*</b>	<b>0.0145**</b>	<b>0.0116*</b>	<b>0.0071*</b>	<b>0.0277***</b>	<b>0.0418***</b>	<b>0.03042**</b>	<b>0.0309***</b>	<b>0.0373***</b>	<b>0.0503***</b>	<b>0.0440***</b>		
BOU12	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.57	0	-0.0033	-0.0000	0.0044	0.0012	0.0037	0.0071	0.0034	0.0060	<b>0.0120*</b>	0.0052	<b>0.0100*</b>	<b>0.0097*</b>	0.0076	0.0060	<b>0.0212**</b>	<b>0.0466***</b>	<b>0.0259**</b>	<b>0.0203***</b>	<b>0.0394***</b>	<b>0.0603***</b>	<b>0.0377***</b>		
BOU13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.12	0.81	0	0.0000	0.0001	0.0019	0.0082	0.0065	0.0037	0.0074	<b>0.0138*</b>	0.0084	<b>0.0145*</b>	0.0084	0.0077	0.0043	<b>0.0253***</b>	<b>0.0439***</b>	<b>0.0253**</b>	<b>0.0235***</b>	<b>0.0379***</b>	<b>0.0581***</b>	<b>0.0432***</b>		
SEI03	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.18	0.60	0.55	0	0.0020	0.0006	0.0065	0.0068	0.0036	0.0011	0.0061	<b>0.0109*</b>	<b>0.0115*</b>	<b>0.0098*</b>	0.0040	0.0047	<b>0.0154**</b>	<b>0.0438***</b>	<b>0.0240***</b>	<b>0.0199***</b>	<b>0.0359***</b>	<b>0.0531***</b>	<b>0.0408***</b>		
SEI05	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.07	0.08	0.19	0.29	0	-0.0022	<b>0.0107**</b>	<b>0.0122*</b>	0.0049	0.0023	0.0201	<b>0.0113*</b>	<b>0.0111**</b>	0.0176	<b>0.0136**</b>	0.0053	<b>0.0315***</b>	<b>0.0490***</b>	<b>0.0241***</b>	<b>0.0298***</b>	<b>0.0432***</b>	<b>0.0552***</b>	<b>0.0496***</b>		
SEI13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.42	0.62	0.39	0.27	0.57	0	<b>0.0095**</b>	0.0142	0.0058	0.0046	0.0184	<b>0.0102*</b>	<b>0.0172**</b>	<b>0.0131**</b>	<b>0.0103*</b>	0.0043	<b>0.0259***</b>	<b>0.0485***</b>	<b>0.0297***</b>	<b>0.0312***</b>	<b>0.0413***</b>	<b>0.0579***</b>	<b>0.0459***</b>		
DNZ13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.04*</b>	<b>0.00**</b>	0.07	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0	-0.0011	-0.0074	-0.0029	0.0010	-0.0050	0.0026	-0.0031	-0.002	-0.0011	<b>0.0136**</b>	<b>0.0290**</b>	<b>0.0148**</b>	<b>0.0166**</b>	<b>0.0256***</b>	<b>0.0372***</b>	<b>0.0268***</b>		
STR03	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	0.06	<b>0.04*</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.76	0	-0.0052	-0.0035	0.0010	-0.0013	0.0049	0.0058	-0.0009	0.0071	0.0146	<b>0.0312***</b>	<b>0.0260**</b>	<b>0.0199***</b>	<b>0.0316***</b>	<b>0.0419***</b>	<b>0.0372***</b>		
STR06	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	0.11	0.26	0.38	<b>0.00**</b>	<b>0.01*</b>	0.83	0.88	0	-0.0122	-0.0028	0.0018	-0.0064	-0.0014	0.0007	-0.0039	0.0088	<b>0.0311***</b>	0.0114	<b>0.0174***</b>	<b>0.0245***</b>	<b>0.0350**</b>	<b>0.0268***</b>		
VIL03	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	0.09	0.08	0.11	<b>0.01*</b>	<b>0.00**</b>	0.69	0.65	0.97	0	-0.0005	0.0000	-0.0027	0.0051	-0.0028	-0.0019	0.0066	<b>0.0292**</b>	0.0061	<b>0.0114*</b>	<b>0.0192***</b>	<b>0.0322***</b>	<b>0.0259***</b>		
VIL05	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.02*</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.07	0.46	0.81	0.67	0	0.0033	-0.0012	-0.0015	0.0037	0.0062	0.0064	<b>0.0266**</b>	<b>0.0214**</b>	<b>0.0146**</b>	<b>0.0250***</b>	<b>0.0403***</b>	<b>0.0285***</b>		
VIL12	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.01*</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.32	0.19	0.13	0.55	0.29	0	0.0063	0.0009	-0.0055	0.0015	<b>0.0116*</b>	<b>0.0266**</b>	<b>0.0168*</b>	<b>0.0127**</b>	<b>0.0207***</b>	<b>0.0360***</b>	<b>0.0256***</b>		
LOI03	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.06	0.11	0.66	0.63	0.86	0.05	0	<b>0.0119*</b>	0.0035	<b>0.0110*</b>	<b>0.0117*</b>	<b>0.0258**</b>	<b>0.0153*</b>	<b>0.0142**</b>	<b>0.0247***</b>	<b>0.0354***</b>	<b>0.0309***</b>		
LOI05	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.24	<b>0.00**</b>	0.20	0.13	0.40	<b>0.03*</b>	<b>0.00***</b>	0	0.0071	-0.0009	<b>0.0158**</b>	<b>0.0348***</b>	<b>0.0236***</b>	<b>0.0180***</b>	<b>0.0306***</b>	<b>0.0470***</b>	<b>0.0339***</b>		
GIR03	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.09	0.26	0.16	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	0.60	0.47	0.75	0.78	0.27	0.65	0.32	<b>0.01*</b>	0	0.0052	<b>0.0095*</b>	<b>0.0199*</b>	0.0119	0.0059	<b>0.0144**</b>	<b>0.0292***</b>	<b>0.0200***</b>		
GIR05	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.01*</b>	0.07	<b>0.04*</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.01*</b>	0.81	0.19	0.96	0.84	0.35	0.25	<b>0.01*</b>	0.43	0.33	0	<b>0.0147**</b>	<b>0.0432***</b>	<b>0.0161***</b>	<b>0.0204***</b>	<b>0.0273***</b>	<b>0.0457***</b>	<b>0.0310***</b>		
UNT13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0	0.0061	0.0005	-0.0002	0.0057	<b>0.0182**</b>	<b>0.0051***</b>
LIM13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.05	<b>0.00***</b>	0.45	0	0.0102	0.0069	0.0058	-0.0064	<b>0.0024***</b>
VIG13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.20	0.16	0	0.0054	-0.0010	<b>0.0173**</b>	<b>0.0064***</b>	
MIN12	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.19	0.41	0.13	0	0.0045	<b>0.0178**</b>	<b>0.0022***</b>
LIM15	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	0.27	0.24	0.14	0	<b>0.0066*</b>	<b>0.0027***</b>
MON10	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	0.69	<b>0.00**</b>	<b>0.00***</b>	0.06	0	<b>0.0077***</b>
MON13	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00**</b>	0.64	0.07	0.31	0.10	0.05	0

Table S3: Genetic diversity (SNPs) with dominant allele frequencies, expected (He) and observed (Ho) heterozygosities. Bold indicates values that remained significant after FDR correction

		<b>AMPD</b>	<b>BHMT3</b>	<b>BHMT4</b>	<b>P53</b>	<b>PGDS</b>	<b>GAPDH</b>
Nor12	<b>All. Freq.</b>	0.7143	0.9107	0.3929	0.3148	0.5179	0.9107
	<b>He</b>	0.4156	0.1656	0.4857	0.4396	0.5084	0.1656
	<b>Hobs.</b>	0.4286	0.1786	0.5	0.5556	0.6071	0.1786
	<b>FIS</b>	-0.0318	-0.0800	-0.0300	-0.2704	-0.1984	-0.0800
Swe12	<b>All. Freq.</b>	0.7571	0.7895	0.6081	0.6538	0.8333	0.75
	<b>He</b>	0.3731	0.3368	0.4832	0.4585	0.2817	0.38
	<b>Hobs.</b>	0.4286	0.3684	0.5135	0.5897	0.2778	0.4474
	<b>FIS</b>	-0.1512	-0.0951	-0.0638	-0.2910	0.0141	-0.1801
Pol12	<b>All. Freq.</b>	0.6455	0.8426	0.5288	0.4898	0.7	0.9167
	<b>He</b>	0.4619	0.2677	0.5032	0.5049	0.4247	0.1542
	<b>Hobs.</b>	0.5273	0.2778	0.6346	0.5714	0.5111	0.0926
	<b>FIS</b>	-0.1431	-0.0379	-0.2645	-0.1332	-0.2062	<b>0.401*</b>
Net13	<b>All. Freq.</b>	0.8163	0.86	0.58	0.4891	0.6596	0.9082
	<b>He</b>	0.303	0.2432	0.4921	0.5053	0.4539	0.1685
	<b>Hobs.</b>	0.2857	0.24	0.36	0.413	0.383	0.1429
	<b>FIS</b>	0.0575	0.0134	0.2705	0.1842	0.1577	0.1537
Bou12	<b>All. Freq.</b>	0.8125	0.9091	0.5208	0.625	0.7143	0.9348
	<b>He</b>	0.3145	0.1691	0.5098	0.4787	0.4233	0.1246
	<b>Hobs.</b>	0.375	0.1818	0.4583	0.4167	0.5714	0.1304
	<b>FIS</b>	-0.2	-0.0769	0.1028	0.1321	-0.3684	-0.0476
Bou13	<b>All. Freq.</b>	0.7727	0.8182	0.3864	0.4762	0.6591	0.8864
	<b>He</b>	0.3594	0.3044	0.4852	0.511	0.4598	0.2061
	<b>Hobs.</b>	0.3636	0.3636	0.5909	0.4762	0.5	0.2273
	<b>FIS</b>	-0.012	-0.2000	-0.2242	0.0698	-0.0896	-0.1053
Sei03	<b>All. Freq.</b>	0.7297	0.8919	0.5921	0.4595	0.6528	0.8378
	<b>He</b>	0.3999	0.1955	0.4895	0.5035	0.4597	0.2755
	<b>Hobs.</b>	0.3784	0.2162	0.5	0.4865	0.5278	0.2162
	<b>FIS</b>	0.0544	-0.1077	-0.0218	0.0343	-0.1505	0.2174
Sei05	<b>All. Freq.</b>	0.8621	0.7	0.5862	0.5172	0.8103	0.8103
	<b>He</b>	0.242	0.4271	0.4936	0.5082	0.3128	0.3128
	<b>Hobs.</b>	0.2069	0.4	0.5517	0.5517	0.3793	0.3103
	<b>FIS</b>	0.1472	0.0645	-0.1200	-0.0874	-0.2174	0.0079
Drz13	<b>All. Freq.</b>	0.7703	0.7703	0.697	0.6053	0.8947	0.8462
	<b>He</b>	0.3588	0.3588	0.4289	0.4842	0.1909	0.2637
	<b>Hobs.</b>	0.3514	0.4054	0.4848	0.5263	0.2105	0.3077
	<b>FIS</b>	0.0209	-0.1321	-0.1327	-0.0882	-0.1045	-0.1692
Str03	<b>All. Freq.</b>	0.8289	0.8333	0.6389	0.5789	0.7206	0.9079
	<b>He</b>	0.2874	0.2817	0.4679	0.494	0.4087	0.1695

Chapitre III : Structure génétique des populations

	<b>Hobs.</b>	0.2895	0.2778	0.4444	0.5789	0.3824	0.1842
	<b>FIS</b>	-0.0074	0.0141	0.0508	-0.1746	0.0654	-0.0882
Str06	<b>All. Freq.</b>	0.8393	0.8654	0.6481	0.6071	0.82	0.8333
	<b>He</b>	0.2747	0.2376	0.4647	0.4857	0.3012	0.283
	<b>Hobs.</b>	0.25	0.2692	0.5556	0.5	0.36	0.2593
	<b>FIS</b>	0.0913	-0.1364	-0.2000	-0.0300	-0.2000	0.0854
Vil03	<b>All. Freq.</b>	0.74	0.9231	0.6905	0.4423	0.88	0.9091
	<b>He</b>	0.3927	0.1448	0.4379	0.503	0.2155	0.1691
	<b>Hobs.</b>	0.44	0.1538	0.3333	0.6538	0.24	0.1818
	<b>FIS</b>	-0.1234	-0.0638	0.2432	-0.3077	-0.1163	-0.0769
Vil05	<b>All. Freq.</b>	0.7353	0.8971	0.629	0.5429	0.8594	0.8857
	<b>He</b>	0.3951	0.1874	0.4744	0.5035	0.2455	0.2054
	<b>Hobs.</b>	0.2353	0.1471	0.3548	0.5714	0.2813	0.1143
	<b>FIS</b>	<b>0.408*</b>	0.2180	0.2551	-0.1371	-0.1481	<b>0.447*</b>
Vil12	<b>All. Freq.</b>	0.7917	0.9167	0.7292	0.5	0.8478	0.8696
	<b>He</b>	0.3369	0.156	0.4034	0.5106	0.2638	0.2319
	<b>Hobs.</b>	0.4167	0.1667	0.375	0.5	0.3043	0.2609
	<b>FIS</b>	-0.2432	-0.0698	0.0717	0.0213	-0.1579	-0.1282
Loi03	<b>All. Freq.</b>	0.8088	0.9219	0.5789	0.5	0.6765	0.8649
	<b>He</b>	0.3139	0.1463	0.494	0.5077	0.4442	0.2369
	<b>Hobs.</b>	0.3824	0.0938	0.5263	0.4545	0.3529	0.2162
	<b>FIS</b>	-0.2222	0.3630	-0.0663	0.1061	0.2080	0.0886
Loi05	<b>All. Freq.</b>	0.7286	0.8571	0.5571	0.6029	0.8143	0.8429
	<b>He</b>	0.4012	0.2484	0.5006	0.486	0.3068	0.2687
	<b>Hobs.</b>	0.3714	0.2286	0.5429	0.5	0.2571	0.2571
	<b>FIS</b>	0.0753	0.0811	-0.0857	-0.0294	0.1639	0.0437
Gir03	<b>All. Freq.</b>	0.8	0.8243	0.6081	0.5132	0.8485	0.875
	<b>He</b>	0.3246	0.2936	0.4832	0.5063	0.2611	0.2218
	<b>Hobs.</b>	0.2857	0.2432	0.5135	0.6053	0.303	0.1944
	<b>FIS</b>	0.1214	0.1735	-0.0638	-0.1986	-0.1636	0.1250
Gir05	<b>All. Freq.</b>	0.6857	0.8182	0.6324	0.6515	0.8382	0.8857
	<b>He</b>	0.4373	0.3021	0.4719	0.4611	0.2752	0.2054
	<b>Hobs.</b>	0.3429	0.303	0.4412	0.3333	0.2059	0.2286
	<b>FIS</b>	0.2184	-0.0031	0.0660	0.2802	0.2548	-0.1148
Unt13	<b>All. Freq.</b>	0.8667	0.8103	0.56	0.537	0.8793	0.8929
	<b>He</b>	0.235	0.3128	0.5029	0.5066	0.216	0.1948
	<b>Hobs.</b>	0.2667	0.3103	0.64	0.4815	0.2414	0.2143
	<b>FIS</b>	-0.1373	0.0079	-0.2800	0.0506	-0.1200	-0.1020
Vig13	<b>All. Freq.</b>	0.75	0.8333	0.4487	0.5125	0.9194	0.9875
	<b>He</b>	0.381	0.2814	0.5012	0.506	0.1507	0.025
	<b>Hobs.</b>	0.375	0.3333	0.5897	0.475	0.1613	0.025

Chapitre III : Structure génétique des populations

	<b>FIS</b>	0.0159	-0.1875	-0.1795	0.0620	-0.0714	0
Min12	<b>All. Freq.</b>	0.8382	0.8714	0.5469	0.4143	0.7794	0.9857
	<b>He</b>	0.2752	0.2273	0.5035	0.4923	0.349	0.0286
	<b>Hobs.</b>	0.3235	0.2571	0.4688	0.5429	0.3235	0.0286
	<b>FIS</b>	-0.1786	-0.1333	0.0700	-0.1043	0.0740	0
Lim13	<b>All. Freq.</b>	0.7953	0.8752	0.6145	0.4355	0.8425	0.9751
	<b>He</b>	0.2144	0.1455	0.4022	0.5575	0.2748	0.0244
	<b>Hobs.</b>	0.2752	0.1675	0.3927	0.4954	0.3013	0.0244
	<b>FIS</b>	-0.2836	-0.1512	0.0236	0.1114	-0.0964	0
Lim15	<b>All. Freq.</b>	0.8456	0.7985	0.5074	0.5368	0.8309	0.9926
	<b>He</b>	0.2631	0.3242	0.5036	0.501	0.2831	0.0147
	<b>Hobs.</b>	0.2794	0.3134	0.6324	0.5441	0.2794	0.0147
	<b>FIS</b>	-0.0626	0.0335	<b>-0.2581*</b>	-0.0868	0.0132	0
Mon10	<b>All. Freq.</b>	0.8704	0.9091	0.6912	0.5	0.8393	0.9412
	<b>He</b>	0.2299	0.1678	0.4333	0.5072	0.2747	0.1124
	<b>Hobs.</b>	0.2593	0.1818	0.5	0.4857	0.3214	0.1176
	<b>FIS</b>	-0.1304	-0.0847	-0.1567	0.0430	-0.1739	-0.0476
Mon13	<b>All. Freq.</b>	0.7712	0.8468	0.6053	0.4655	0.8306	0.9615
	<b>He</b>	0.3559	0.2616	0.4821	0.5019	0.2836	0.0745
	<b>Hobs.</b>	0.3898	0.2742	0.4737	0.5172	0.2419	0.0769
	<b>FIS</b>	-0.0961	-0.0485	0.0175	-0.0307	0.1480	-0.0323



### Chapitre III : Structure génétique des populations

Table S4: Estimation of genetic differentiation  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, above diagonal) and exact test of genic differentiation (under diagonal, considering the 5 structuring SNP (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ))

	NOR12	SWE12	POL12	NET13	BOU13	BOU14	SEI03	SEI05	SEI13	DRZ13	STR03	STR06	VIL03	VIL05	VIL12	LOI03	LOI05	GIR03	GIR05	UNT13	VIG13	MIN12	LIM13	LIM15	MON10	MON13
NOR12	0	<b>0.00**</b>	0.31	<b>0.04*</b>	<b>0.02*</b>	<b>0.01*</b>	0.17	<b>0.00**</b>	0.0298	-0.0018	0.0339	<b>0.0589*</b>	<b>0.1298***</b>	<b>0.1006**</b>	<b>0.1177*</b>	<b>0.1346***</b>	<b>0.0548*</b>	0.0261	<b>0.0656**</b>	0.0304	<b>0.0362*</b>	<b>0.0712**</b>	<b>0.0976*</b>	0.0144	<b>0.1180***</b>	<b>0.0530*</b>
SWE12	<b>0.1148***</b>	0	0.0399	0.0069	-0.0018	-0.0190	0.0202	-0.0123	0.0129	<b>0.0546*</b>	0.0101	-0.0062	-0.0164	-0.0170	-0.0179	-0.0186	-0.0029	<b>0.1658***</b>	<b>0.1892***</b>	-0.0137	0.0126	-0.0065	-0.0193	0.0314	-0.0153	0.0053
POL12	0.0065	0.08	0	-0.0009	0.0064	0.0344	-0.0132	0.0265	-0.0082	-0.0108	0.0067	0.0049	<b>0.0514*</b>	0.0285	0.0431	<b>0.0524*</b>	0.0021	<b>0.1049**</b>	<b>0.0807*</b>	0.0149	-0.0049	0.0113	0.0297	-0.0100	<b>0.0408*</b>	0.0014
NET13	<b>0.0472*</b>	0.24	0.43	0	-0.0083	0.0031	-0.0125	-0.0004	-0.0109	0.0067	-0.0111	-0.0114	0.0145	0.0000	0.0090	0.0147	-0.0111	<b>0.1142**</b>	0.0120	<b>0.0719*</b>	-0.0096	-0.0076	0.0001	-0.0019	0.0075	-0.0082
BOU13	<b>0.0638*</b>	0.45	0.23	0.84	0	-0.0053	-0.0087	-0.0068	-0.0085	0.0162	-0.0094	-0.0141	0.0043	-0.0072	-0.0004	0.0043	-0.0127	<b>0.1504**</b>	<b>0.0628*</b>	0.0292	-0.007	-0.0111	-0.0078	0.0040	-0.0010	-0.0082
BOU14	<b>0.1046***</b>	1	0.12	0.31	0.43	0	0.0156	-0.0149	0.0084	<b>0.0485*</b>	0.0058	-0.009	-0.0185	-0.0203	-0.0202	-0.0218	-0.0068	<b>0.0928*</b>	0.0074	<b>0.0994**</b>	0.0088	-0.0095	-0.0217	0.0265	-0.017	0.0017
SEI03	0.0177	0.23	0.81	0.80	0.62	0.35	0	-0.0085	-0.0097	0.0292	0.0160	0.0274	-0.0142	0.0006	-0.0146	-0.0122	0.0266	<b>0.1975**</b>	<b>0.0832***</b>	0.0193	<b>0.0782*</b>	-0.0044	0.0434	-0.0137	0.0207	-0.0110
SEI05	<b>0.0974***</b>	0.77	0.11	0.38	0.64	1	0.60	0	-0.0172	0.0018	-0.0055	-0.0002	-0.0036	-0.0128	-0.0180	-0.0161	-0.0002	<b>0.0565*</b>	<b>0.0537*</b>	<b>0.0360*</b>	-0.0152	-0.0103	-0.0125	0.0204	-0.0114	-0.0014
SEI13	0.10	0.20	0.67	0.83	0.67	0.27	0.61	1	0	0.0021	-0.0055	-0.0005	-0.0064	-0.0134	-0.0199	-0.0169	-0.0000	<b>0.0413*</b>	<b>0.0337*</b>	<b>0.0601**</b>	-0.0142	-0.0064	-0.013	-0.0083	0.0136	-0.0097
DRZ13	0.42	<b>0.03*</b>	0.84	0.24	0.16	0.07	0.10	0.38	0.31	0	-0.0101	-0.0147	0.0392	-0.004	0.0061	0.0080	-0.0132	<b>0.0791**</b>	-0.0002	0.0074	-0.0039	0.0222	-0.0132	-0.0078	<b>0.0558*</b>	0.0097
STR03	0.09	0.29	0.53	1	0.67	0.28	0.19	0.47	0.50	0.86	0	-0.0122	0.0245	-0.0090	-0.0028	-0.001	-0.011	<b>0.0984**</b>	-0.0140	-0.0141	-0.0122	-0.0077	0.0023	-0.007	0.0109	-0.0101
STR06	<b>0.04*</b>	0.54	0.35	0.81	1	0.53	0.11	0.35	0.36	1	0.85	0	0.0381	-0.0063	0.0038	0.0057	-0.0160	-0.0112	-0.0081	-0.0064	-0.0095	-0.0145	-0.0117	0.0015	-0.0056	-0.0114
VIL03	<b>0.00**</b>	1	0.05	0.21	0.29	1	0.85	0.45	0.47	0.07	0.14	0.12	0	0.0068	-0.0105	-0.0094	<b>0.0366**</b>	0.0231	0.0294	0.0351	0.0215	-0.0010	-0.0181	<b>0.0411*</b>	-0.0148	0.0125
VIL05	<b>0.00**</b>	1	0.11	0.37	0.48	1	0.40	0.85	0.86	0.50	0.74	0.47	0.36	0	-0.0128	-0.0109	-0.00	0.0049	0.0092	0.0129	0.0038	-0.0118	-0.0214	0.0224	-0.0155	-0.0009
VIL12	<b>0.00**</b>	1	0.07	0.22	0.42	1	0.71	1	1	0.26	0.46	0.33	0.69	0.70	0	-0.0196	0.0037	0.0161	0.0221	0.0272	0.0153	-0.0052	-0.0201	0.0341	-0.0164	0.0072
LOI03	<b>0.00**</b>	1	<b>0.03*</b>	0.16	0.32	1	0.73	0.85	1	0.23	0.39	0.27	0.58	0.74	1	0	0.0057	0.0235	0.0295	0.0352	0.0211	-0.0022	-0.0216	<b>0.0424*</b>	-0.0164	0.0127
LOI05	<b>0.03*</b>	0.41	0.38	0.83	1	0.55	0.08	0.37	0.30	1	0.86	1	0.09	0.49	0.33	0.29	0	-0.0119	-0.0098	-0.0086	-0.010	-0.013	-0.0095	0.0001	-0.0020	-0.0108
GIR03	<b>0.03*</b>	<b>0.00***</b>	<b>0.03*</b>	0.25	<b>0.03*</b>	0.25	<b>0.00**</b>	<b>0.04*</b>	0.07	0.54	1	0.62	0.11	0.23	0.18	0.12	0.64	0	-0.0157	-0.0165	-0.0129	-0.0060	0.0049	-0.0092	0.0148	0.0094
GIR05	0.10	1	0.21	0.05	0.08	<b>0.00**</b>	0.11	0.06	<b>0.01*</b>	0.53	0.82	0.61	0.11	0.22	0.17	0.11	0.64	1	0	-0.0162	-0.0119	-0.0030	0.0104	-0.0104	0.0201	-0.0083
UNT13	0.20	0.17	0.83	0.66	0.49	0.17	1	0.21	0.81	0.67	0.81	0.45	0.10	0.20	0.16	0.10	0.63	1	1	0	-0.0118	-0.000	0.0144	-0.0123	0.0250	-0.0075
VIG13	0.09	0.21	0.53	1	0.67	0.28	1	0.35	1	0.40	1	0.62	0.18	0.33	0.19	0.13	0.82	1	0.82	0.81	0	-0.0056	0.40	-0.0058	0.0130	-0.0087
MIN12	<b>0.03*</b>	0.57	0.27	0.66	1	0.57	0.59	0.79	0.63	0.13	0.63	1	0.39	0.79	0.55	0.40	1	0.49	0.47	0.46	0.64	0	0.76	0.0074	-0.0059	-0.0079
LIM13	<b>0.01*</b>	1	0.12	0.43	0.58	1	<b>0.00**</b>	<b>0.01*</b>	<b>0.01*</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.01*</b>	<b>0.00**</b>	0.06	0.08	<b>0.02*</b>	<b>0.01*</b>	0.56	0.28	0.27	0.25	0.0054	-0.0116	0	0.0225	-0.0180	-0.0010
LIM15	0.13	0.06	1	0.40	0.23	0.10	0.83	0.09	0.70	0.72	0.58	0.30	<b>0.04*</b>	0.08	0.06	<b>0.02*</b>	0.34	0.71	0.85	1	0.59	0.24	0.11	0	0.0323	0.0001
MON10	<b>0.00**</b>	1	0.06	<b>0.03*</b>	<b>0.02*</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00**</b>	<b>0.00**</b>	0.20	<b>0.03*</b>	0.21	0.55	1	1	1	1	0.42	0.21	0.20	0.12	0.22	0.58	1	<b>0.04*</b>	0	0.0059
MON13	<b>0.02*</b>	0.24	0.33	1	0.85	0.32	0.80	0.40	0.84	0.25	0.84	0.81	0.22	0.38	0.23	0.16	1	0.69	0.68	0.66	0.84	0.67	0.44	0.33	0.26	0

Chapitre IV : Réponses de populations de flets  
à un stress thermique et hypoxique :  
approches bioénergétique et protéomique



## Résumé du chapitre

### Introduction

Les travaux en génétique de populations présentés dans le chapitre précédent de cette thèse, confirment l'existence d'une histoire évolutive spécifique pour les flets de la Péninsule Ibérique relativement à ceux du Nord-Atlantique. **Dans ce deuxième volet de notre travail, nous allons rechercher si des performances physiologiques différentielles peuvent être détectées en situation de multi-stress, entre une population périphérique et deux populations centrales de flet, prélevées respectivement au Portugal et en France.**

Les populations estuariennes sont soumises aux effets croissants de multiples stressseurs de l'environnement, particulièrement à l'impact du réchauffement climatique, et à une eutrophisation se traduisant par un risque hypoxique. L'effet de l'augmentation de la température sur les ectothermes a été largement décrit dans la littérature sur la bioénergétique et les traits d'histoire de vie; des travaux récents suggérant que les tolérances à la thermie et à l'hypoxie pourraient être liées chez les poissons (Anttila *et al.* 2013, McBryan *et al.* 2013).

Nous avons choisi ici de comparer les performances de trois populations de flet face à un stress thermique et hypoxique, en situation de « common garden », afin de rechercher une possible différenciation dans leurs réponses phénotypiques qui pourrait avoir une valeur adaptative. Trois populations ont donc été ciblées : une dans l'estuaire de la Lima (Nord du Portugal), considérée comme une population démographiquement fonctionnelle, et deux populations localisées plus au Nord (dans le Golfe de Gascogne : estuaire de Vilaine, département d'Ille-et-Vilaine, et en Manche : estuaire de la Canche, département du Pas-de-Calais). Des mesures de température de surface (SST) indiquent que la plus forte amplitude thermique est observée face à la Canche (7 à 17°C), puis face à la Vilaine (9 à 18°C) ; la plus faible amplitude étant détectée face à l'estuaire de la Lima (13 à 18.5°C) (Martinho *et al.* 2013).

Des juvéniles 0+ ont été collectés *in natura* en automne, puis ramenés en laboratoire. Après une période d'acclimatation, les poissons ont été soumis à deux conditions : une condition froide et normoxique (température de l'eau de mer 10°C ; saturation en O<sub>2</sub>) et une condition chaude et hypoxique (22°C pendant 60 jours, avec une hypoxie à 40 % de saturation en O<sub>2</sub>, les 6 derniers jours de l'expérimentation). Cette deuxième condition avait pour but de mimer un événement estival estuarien, se traduisant donc par une augmentation progressive de la température du milieu suivie par une hypoxie modérée.

A l'issue des 60 jours du challenge expérimental, des échantillons de foie et de muscle ont été prélevés et congelés pour analyses. Des marqueurs clés du métabolisme énergétique ont été ciblés en mesurant les activités enzymatiques des Cytochrome C oxydase, Citrate synthase, Lactate

deshydrogenase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase sur les deux tissus. Notons que les deux derniers enzymes ont été décrits comme possiblement associés à l'adaptation thermique des populations de poisson sur un gradient latitudinal (Schulte *et al.* 2000, Whitehead & Crawford 2006). Un dosage des lipides, initialement réalisé pour déterminer le contenu en réserve des tissus, a finalement débouché sur une étude plus poussée de différentes classes de phospholipides. Une comparaison du protéome du foie par électrophorèse 2D fut également réalisée, afin d'approfondir sans a priori les protéines impliquées dans les réponses des populations aux conditions expérimentales.

## Résultats et discussion

**Le premier travail ciblé autour de la bioénergétique comparée sur des populations de flet, en situation de common garden, a permis d'identifier des patterns différentiels dans la capacité des populations à répondre aux pressions de l'environnement.**

Le multi-stress infligé aux flets des deux populations du Nord n'a pas impacté leur croissance relativement à la condition froide. Au contraire, en condition froide, les flets du Lima ont présenté une croissance plus faible et un indice hépato-somatique (IHS) réduit, relativement aux autres populations. On a émis l'hypothèse que la condition froide serait clairement stressante pour la population Portugaise.

Quatre classes de phospholipides membranaires ont été quantifiées dans les deux tissus, des différences significatives dans ces teneurs en phospholipides ont été détectées uniquement dans le muscle, entre conditions froide vs chaude et hypoxique. La phosphatidylethanolamine (PE) est un fluidifiant des membranes, alors que la phosphatidylcholine (PC) stabilise les membranes ; les proportions de ces deux phospholipides majoritaires ont évolué, du froid vers le chaud, selon le principe du maintien de la viscosité membranaire (Hazel 1995) pour les trois populations. Par contre, les proportions de phosphatidylinositol (PI) et phosphatidylsérine (PS) ont été modifiées entre les conditions expérimentales, différenciellement suivant les populations de flet. Ces derniers résultats pourraient refléter une possible adaptation locale de ces populations pour maintenir la fonctionnalité de leurs membranes cellulaires, dans leur contexte thermique environnemental particulier.

L'activité des enzymes CS et CCO a été sensiblement modifiée dans le muscle contrairement au foie, de la condition froide à la condition chaude et hypoxique. La population de Lima se distingue par un niveau d'activité bas relativement aux populations du Nord. Plusieurs études suggèrent un trade-off énergétique entre la tolérance aux hautes températures et le taux métabolique, ainsi qu'une meilleure capacité pour les populations nordiques d'ajuster leurs propriétés mitochondriales.

L'activité accrue de la LDH dans les deux organes pour les trois populations confirme une sollicitation plus forte du métabolisme anaérobie, mais avec des variations tissu-spécifiques, en

situation de multi-stress.

Une diminution générale de l'activité enzymatique de la G6PDH a été détectée dans le foie en condition chaude et hypoxique dans les populations du Nord, contrairement à la population de Lima où cette activité reste modérée, quelle que soit la condition expérimentale. Cette enzyme peut être considérée comme un marqueur pertinent de l'anabolisme chez les poissons, sa faible activité en zone Sud est cohérente avec : (1) une étude précédente (Calvès, 2011) montrant un niveau de biosynthèse de protéines plus faible pour les populations de flets du Sud vs Nord, en milieux naturels, et (2) une étude sur *Fundulus heteroclitus* (Whitehead & Crawford 2006) montrant un pattern de variation adaptatif pour cet enzyme, son niveau d'expression baissant avec le gradient de température croissant. Les analyses multimarqueurs ont révélé que globalement les poissons des populations Nord montrent un métabolisme énergétique en anaérobiose plus marquée en condition chaude et hypoxique, relativement à la condition froide caractérisée par un métabolisme énergétique en aérobiose soutenu. De façon contrastée, les poissons du Sud montrent un certain équilibre entre activités en aérobiose et anaérobiose en situation de multistress. Nous suggérons que ce différentiel pour gérer les stress environnementaux pourrait refléter une certaine adaptation locale au sein des populations de flets.

**Le deuxième travail qui sera présenté dans ce chapitre correspond à l'approche en protéomique, sans a priori, qui a été conduite au cours de la même expérience de common garden, comparant les réponses des trois populations de flet en conditions froide vs chaude et hypoxique.**

L'analyse protéomique suggère que l'accroissement du métabolisme énergétique en aérobiose (augmentation de la quantité d'ATP synthase) détecté pour la population du Sud vs Nord en situation de multistress, pourrait refléter sa meilleure capacité à répondre à ces conditions, ce résultat étant convergent avec l'approche en bioénergétique précédente.

Cette approche a également mis en évidence une forte baisse de différents enzymes du cycle de la méthionine en condition de multistress. Ce cycle a été associé à de nombreuses fonctions (défense vis-à-vis des stress thermiques, chimiques, et du stress oxydant). Deux spots d'enzymes associés au stress oxydant, la GST theta et la catalase, ont aussi été détectées avec un différentiel entre les populations.

L'analyse protéomique montre également un plus fort signal pour les Fatty acid-binding proteins (FABP : une famille de protéines associée aux transports des acides gras) pour la population de flet Nord vs Sud, en situation de multi-stress. Nous suggérons que ce différentiel pourrait refléter une plus forte sensibilité de la population Nord à la condition chaude et hypoxique, cette famille de protéines étant fréquemment associée à une réponse des poissons comme des mammifères à des conditions d'hypoxie sévères.

Une baisse de la quantité de G6PDH a été observée dans la population Sud vs Nord par la protéomique, confirmant donc l'activité enzymatique réduite précédemment observée dans l'approche en bioénergétique ; elle témoigne probablement d'une réduction générale du métabolisme standard dans les populations de poissons avec la latitude décroissante (Pörtner *et al.* 2010).

Globalement, l'approche en protéomique a mis en évidence des différences significatives entre les populations de flet sur de nombreuses voies métaboliques (bioénergétique, métabolisme de la méthionine, protéines de transport, catabolisme des acides aminés).

## **Contrasting patterns of energy metabolism, in core vs southern peripheral populations of European flounder, exposed to temperature rising and hypoxia**

Nicolas PEDRON<sup>a,b</sup>, Jessy LE DU<sup>a</sup>, Grégory CHARRIER<sup>a</sup>, José-Luis ZAMBONINO INFANTE<sup>a,b</sup>, Nicolas LE BAYON<sup>a,b</sup>, Rita Pina VASCONCELOS<sup>c</sup>, Vanessa FONSECA<sup>c</sup>, Fabienne LE GRAND<sup>a</sup>, Jean LAROCHE<sup>a</sup>

**a** Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer IUEM, Plouzané, France

**b** Ifremer, Laboratoire Adaptation, Reproduction et Nutrition des Poissons ARN, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins PFOM, Plouzané, France

**c** MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Portugal

**In prep for Comparative biochemistry and physiology: Part B**

### **Abstract**

A two month common garden experiment was carried out to explore the potential differences of energy metabolism in French core vs Portuguese peripheral European flounder populations, submitted to cold condition (CC: sea temperature = 10°C) and to warm and hypoxia condition (WHC: sea temperature = 22°C, with a moderate hypoxia: 40% O<sub>2</sub> saturation, during the last 6 days). Convergent length growth rates were observed by the different populations and conditions, with an exception for the southern peripheral population of Portugal which stopped its growth in cold condition. A general reduction in the liver lipid storage was detected in the different populations in WHC compared to CC, the muscle lipid storage being unaffected; but the thermal and hypoxia challenge induced contrasted differences in the modification of the ratio of particular muscle phospholipids (PL): phosphatidylserine/PL, phosphatidylinositol/PL, between northern and southern populations. The enzymatic activities (mainly concerning LDH and G6PDH in the liver and LDH in the muscle) showed significant differences between French and Portuguese populations in WHC. Over the whole data set, fish from northern estuaries displayed marked anaerobiosis activities in WHC vs marked aerobiosis activities in CC. On the other hand, fish from the southern estuary displayed an equilibrium between anaerobiosis and aerobiosis activities in WHC. Globally, in this study, the inter-population variation detected in bioenergetics suggests that peripheral vs core populations have developed a differential capacity to cope with environmental stressors and that much of this variation is more likely due to local adaptation; alternatively, epigenetic or early developmental effects cannot be ruled out.



## Introduction

Coastal and estuarine waters are shallow systems particularly exposed to the impact of global warming (Rabalais et al. 2009; Gillanders et al. 2011). The fish communities and the biogeographic distribution of species are mainly shaped by water temperature and climatic changes (Genner et al. 2004, Occhipinti-Ambrogi 2007). Marine fish are distributed over latitudes encompassed within their thermal tolerance limits. Thus their distribution responds to climate change, frequently following a poleward expansion and an equatorward contraction (Sunday et al. 2012).

The effect of temperature rising on aquatic ectotherms has been widely described in the literature, considering its possible impacts on bioenergetics and performances (Pörtner 2002, Pörtner & Knust 2007, Pörtner & Peck 2010), disease tolerance (Macnab & Barber 2012), and life-history traits (Ito et al. 2008, Neuheimer et al. 2011, Otero et al. 2012). Furthermore, studies on marine fishes and invertebrates suggest that adaptive divergence among populations are occurring in response to selection imposed by thermal gradient over the distribution area of species, considering gene expression (Oleksiak et al 2005, Whitehead & Crawford 2006, Larsen et al. 2011), energetic metabolism (Sylvestre et al. 2007, Fangue et al. 2009, Schulte 2014) and life history traits (Conover et al. 2006, Harrald et al. 2010a b, Sanford & Kelly 2011).

Natural populations are increasingly submitted to interactive and cumulative effects of multiple human stressors in aquatic systems and significant gaps exist in multiple stressors research (Crain et al. 2008, Todgham & Stillman 2013). In coastal waters, a widespread increase in the number of hypoxic zones and their extension severity and duration has been observed; this general trend is induced by the combined effects of (1) eutrophication leading to excessive production of organic matter that increases the oxygen demand of coastal systems, (2) the increase of temperature caused by climate change enhancing the respiratory oxygen demand of the organisms, and (3) the reduced oxygen solubility (Vaquer-Sunyer & Duarte 2008). Thus, numerous coastal systems are now periodically submitted to temperature rising and hypoxia; these stressors could produce synergistic effects on fish physiology, considering that the maximum oxygen consumption of tissues increases with temperature more than the capacity of the circulatory system to supply oxygen to tissues, leading to anaerobic energy production at high temperature, as suggested in the theory of oxygen and capacity limited thermal tolerance (OCLTT) (Pörtner 2010).

A recent study has suggested that thermal tolerance and hypoxia tolerance might be functionally associated for families of *Salmo salar*, displaying a substantial genetic variation in thermal and hypoxia tolerance (Anttila et al. 2013). The positive correlation between thermal tolerance and tolerance to hypoxia in the families of Atlantic salmon is consistent with the hypothesis that these two tolerances involve similar mechanism linked to oxidative metabolism and to the pathways of oxygen supply or demand, in the context of acute exposure to stressors (critical

maximum temperature protocol, and time until the fish exhibited loss of equilibrium after the 10% air saturation level). Thus, the previous study suggests that plasticity and adaptive evolution may allow the salmon to cope with high temperature and hypoxia, at least on the acute time scales associated with extreme exposures (McBryan et al. 2013). Anttila et al. (2015) have acclimated during 4 weeks two salmonids (*Salmo salar*, *Salvelinus alpinus*), to conditions mimicking naturally occurring temperature changes and diurnal changes in oxygen level, before the thermal and hypoxia challenges. The thermal tolerance of the two species increased with warm acclimation, but decreased when warm temperature was combined with overnight hypoxia, whereas their hypoxia tolerance was increased by the combination of stressors. This study underlined that the combination of stressors can produce antagonistic and synergistic effects on the capacity of fish to tolerate these stressors, and that the complexity of natural environments needs to be considered carefully in the future.

Estuarine fish have developed substantial capacity to cope with different stressors (changing temperature, oxygenation and salinity) at various time scales. Within its life time the organism could compensate using phenotypic plasticity, across a few generations epigenetic changes may allow lineages to adjust to a stressor, and across many generations, evolutionary adaptation may result in genetic changes at the population level that modify the species' sensitivity to a stressor (Schulte 2014); thus, the inter-population variation detected in the sensitivity of estuarine fish populations to environmental stressors suggests that local adaptation can shape the stress response even in organisms that are broadly tolerant and plastic.

The energy-limited tolerance to stress, a concept developed by Sokolova (2013) appears particularly pertinent for estuarine species submitted to multistress. This approach is focusing on the bioenergetic effects of stressors on organisms and their immediate consequences for fitness; it provides tools to investigate the vulnerability of field populations facing multiple stressors, and to improve assessment of ecological risk in complex systems. The energy metabolism is considered as an integrator of the effects of multiple stressors and the energy-limited model of tolerance assumes that basal maintenance takes priority over other processes (growth, reproduction, storage). Thus the tolerance windows of organisms are delimited by the “pessimum ranges” of environmental conditions inducing the disappearance of the aerobic scope of the organism, depletion of energy resources, partial anaerobiosis, and/or metabolic rate depression.

Fish energy metabolism can be monitored by the measurement of maximal activity of particular enzymes to explore (1) the responses to handling stress (DeKoning et al. 2004), pollution (Gauthier et al. 2011), hypoxia (Cooper et al. 2002, Martinez 2006), and (2) the thermal tolerance and intraspecific variation in thermal plasticity (Sylvestre et al. 2007, Fanguie et al. 2009, Orczewska et al. 2010, Dhillon & Schulte 2011). Thus, in the previous studies, the activities of the two mitochondrial enzymes: citrate synthase (CS) and cytochrome C oxidase (COX) were often used as

indicators of aerobic capacity, whereas the glycolytic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) was considered an indicator of anaerobic capacity. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) could be also a pertinent candidate enzyme to explore the fish response to stress. G6PDH is responsible for the first step of the pentose phosphate pathway converting glucose to ribose 5 phosphate and producing NADPH and potentially a good indicator of the anabolism (Grasset et al 2014); thus this enzyme could be involved in fish response to heat stress (Enes et al. 2006) and to temperature adaptation of fish populations over latitudinal clines (Whitehead & Crawford 2006).

Moreover, the proper functioning of many cellular mechanisms relies on the composition of cell membranes. Lipid classes can be separated in storage lipids (mostly triacylglycerol, TAG) and membranes lipids, that are composed of polar (phospholipids) and neutral lipids (free sterols) (Hazel 1995). Among important mechanisms that can modify enzyme specific activities, regulations by membrane phospholipids composition can explain differences in protein catalytic activity (de Kruijff 1997). Studies demonstrate that functioning of mitochondria depends on the structure of specific phospholipids and their fatty acid composition; as an example, the fatty acid composition of the inner-membrane phospholipids in many animals is proposed to explain much of the variation in basal proton leak of the mitochondria (Hulbert and Else 2005). Protein-lipid interactions, which regulate the subcellular localizations and activities of peripheral membrane proteins, are also known to be fundamentally important (Smith 2012).

The effects of environmental variations, such as temperature, pressure, salinity, and pH on phospholipids has been described on various species (Farkas et al. 2001, Beney & Gervais 2001). The roles of phospholipids and their fatty acid compositions on changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of fish and bivalves were described (Kraffe et al. 2007, Pernet et al. 2007, 2008, Grim et al. 2010), but very few studies have investigated the shift in lipid classes related to environmental stress at the population level. Recently Reynolds et al. (2014) showed that populations of wood frog (*Rana sylvatica*) could modify differentially the phospholipids components of their liver membranes, to maintain membrane fluidity in winter.

In the present study, our fish model is the European flounder *Platichthys flesus* which displays an extensive geographic distribution along the north-east Atlantic coasts, from Portugal to Norway, including the Baltic Sea (Bos & Thiel 2006; Larsen et al. 2007). *P. flesus* is a catadromous species commonly found in estuaries and brackish waters (Dando 2011; Morais et al. 2011). This fish species is a pertinent model to investigate the adaptation/vulnerability of populations facing stressors in coastal systems (Hemmer-Hansen et al. 2007, Larsen et al. 2013, Dupuy et al. 2015, Lavergne et al. 2015). From 1987 to 2006, the abundance of northern temperate species such as *P. flesus* decreased in the bay of Biscay, their abundance being negatively correlated to mean water temperature during their year of birth (Hermant et al. 2010). The Portuguese coast corresponds to the southern

distribution limit of the flounder, this species being nowadays very rare at the latitude of Lisbon, whereas it was abundant a few decades ago (Cabral et al. 2001). Numerous other marine species exhibit latitudinal abundance declines along this Portuguese coast towards their distribution limits; the southern limits of some cold-water species shifting north in this region, possibly linked to recent warming (Assis et al. 2013).

A significant genetic differentiation has been highlighted among flounder populations distributed between the English Channel and the Portugal, and the particular genetic status of a southern peripheral population in Portugal, located in the Mondego estuary (Calvès et al. 2013). Furthermore, a preliminary survey conducted on flounders collected in the field in autumn, underlined a general reduction of energy metabolism and protein synthesis in the Mondego population vs two northern populations from the Vilaine and Seine estuaries (France); a common garden experiment showing a reduced capacity of the Mondego vs French populations to cope with acute exposure of hypoxia (Calvès 2011). Thus, the previous studies suggest that peripheral flounder populations of Portugal could be isolated from French populations and could experience different abiotic conditions. The highest amplitude of the sea surface temperature (SST) monitored nearest the estuaries was observed in the Canche and Vilaine estuaries, ranging from 7 °C to 17 °C and from 9 °C to 18 °C respectively; a reduced SST amplitude being detected near the Lima estuary, ranging from 13 °C to 18.5 °C (Martinho et al. 2013; data extracted from : <http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni>, specifically from satellite MODIS-Aqua 4km).

More generally, in the context of global change biology, there is a growing interest in assessing the population structure across geographical ranges of species to understand why species might exhibit unstable or stable range limits and to define the conservation value of peripheral populations (Eckert et al. 2008); however, a limited number of studies have tested whether the genetic differentiation between peripheral and central populations, is reflected by phenotypic variation underlying the adaptive potential of populations across the geographical range.

In the present study, we have developed Common Garden (CG) experiments to explore the genetic contribution to variation in phenotypic traits, mainly considering bioenergetic biomarkers, and identify potential patterns of local adaptation of populations along the latitudinal gradient. Juvenile flounders were sampled in one peripheral population (from the Lima estuary in Portugal) vs two central populations (from the Vilaine and Canche estuaries in France), and acclimated to common laboratory conditions during several weeks, before starting CG experiments. Note that this approach cannot disentangle trait variation among these populations that exists due to phenotypic plasticity induced prior to collection (i.e. linked to maternal, epigenetic, ontogenetic or physiological effects in responses to prenatal or postnatal environment). However, the aim of this approach being to study potentially adaptive variation, this CG experiment offers the opportunity to investigate responses of

individuals which are representative of local selective pressures, i.e. of fish having survived the early phase of high mortality during settlement in the wild (Harrald et al. 2010b).

Individuals from the three previous populations were challenged in two contrasted conditions during two months. The first one was a “cold temperature/high oxygen” condition, whereas the second one was a “warm temperature” condition, for sixty days, with a “mild hypoxia” occurring during the last 6 days (40% O<sub>2</sub> saturation). The aim of this study was to mimic a summer event, with a temperature rising followed by a hypoxia event, and to decipher possible differences in the bio-energetic response of populations faced to multistress.

## Materials and methods

### Fish sampling, study sites and experimental design

European flounder juveniles were sampled in the field by a beam trawl in October 2013. One hundred and twenty young of the year (estimated age: 8 months; 8 cm < total length < 15 cm) were collected by estuary, in France (the Canche and the Vilaine) and Portugal (the Lima) (Fig.1). The Canche estuary is considered as a pristine site, displaying a limited level of contamination by pollutants (Amara et al. 2007, 2009). The Vilaine estuary shows moderate levels of pollutants (Laroche et al. 2013), and exhibits periodically hypoxic conditions during summertime, mainly induced by eutrophication, and by the retention/leak of waters by a dam in the upper part of the estuary favoring water stratification (Menesguen et al. 2001). The moderately polluted Lima estuary is located 200 km north of the southern limit of the flounder distribution area (the Mondego estuary); this system is considered as a functional nursery area for several flatfishes, exhibiting a typical spring estuarine recruitment for *P. flesus*, without inter-annual variations (Ramos et al. 2010).



Figure 1. Map of the sampling locations

Fish were transported by road to IFREMER fish rearing facilities in Plouzané (France), then acclimated to the local temperature and salinity of the sea (9°C, 35 PSU) for two months, and fed with food pellets with a daily ration corresponding to 3% of their biomass. The fish from each population were assigned at random to a cold tank (Cold Condition: CC) or a warm tank (Warm & Hypoxia Condition: WHC); thus each tank (1 m<sup>2</sup>) contained 50 fish from each estuary.

In the CC at T0, the temperature was set at 10 °C, and the water oxygenation was stabilized over 95% of oxygen saturation; these conditions being maintained in this tank along the experiment. In the WHC, at T0, the temperature was raised by 1°C per day, until it reached 22°C. At T53, water oxygenation was lowered to 40% of oxygen saturation in 24 h; this multistress condition being maintained for six days. Fish weight and total length were measured every 15 days for the two tanks, during the experiment.

At T60, 20 fish per estuary and per condition (total n= 120) were sacrificed by cervical dislocation after being left 24h unfed. Total length and weight were measured. One ml of blood was drawn from the caudal vein using a heparinized syringe. A sample of white muscle from the back and liver was collected by fish, weighted, and flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

### **Biometry**

Fish total length and weight were obtained at T0 (start), T12 (end of the warming), T45 and T60 (end of the experiment). Fulton's K index was obtained with the formula  $K=100*(W/L^3)$  with W= total weight, L= total length (Peig & Green 2010). Hepatosomatic index was obtained with the formula  $HSI=100*(LW/W)$  with LW = liver weight.

### **Samples extraction and enzymatic activities**

Samples were crushed with a mixer mill (MM400, RETSCH, Germany) cooled by liquid nitrogen. For liver and muscle, a protein extraction was carried out with approximately 100 mg of tissue adjusted to 1/10 with the corresponding volume of HEPES-EDTA extraction buffer (pH 7.5, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 ). All activity measurements were conducted at 22°C using a 96 well plate spectrophotometer (OMEGA PolarStar, BMG Labtech). Enzyme activities were assessed for the citrate synthase (CS), the cytochrome C oxidase (CCO), the lactate dehydrogenase (LDH) and the glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Enzyme activities were followed at 412 nm for CS, 340 nm LDH and G6PDH, 550 nm for CCO in a final volume of 200µL for all enzymes. The activity of the G6PDH was undetected in the white muscle and was only assessed in the liver. All protocols were adapted from Gauthier et al. (2008) and adjusted for the two tissues. Total protein contents were determined using a DC protein assay kit (biorad) in triplicate, according to the manufacturer instructions. Results were expressed in IU/mg proteins (specific activity).



### **Lipids analysis in muscle and liver**

Six individual per tank and per population were randomly selected. Lipid extraction was carried out on approximately 100 mg of tissue with 6 ml of a chloroform:methanol mixture (2:1, v:v). Neutral and polar lipid classes were analyzed separately by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) on HPTLC glass plates (1010 mm) pre-coated with silica gel (Merck, Darmstadt, Germany) as described in Haberkorn et al. (2010) Each plate was cleaned with a preliminary run to remove impurities, and activated for 30 min at 120 °C. Lipid samples (10µl) were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland). The neutral lipids were separated with a solvent system containing hexane:diethyl ether:acetic acid (20:5:0.5, v:v:v). The polar lipids were separated with a solvent system containing methyl-acetate:isopropanol:chloroform:methanol:KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6). Lipid classes appeared as black spots after dipping plates in a cupric-sulfate, phosphoric-acid solution and heating for 20 min at 160 °C (charring). Five neutral-lipid classes (free fatty acids, sterol esters, alcohol ethers, triacylglycerols (TAG) and free sterols) and five polar lipid classes (cardiolipin, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphonate (PI+CAEP)) (Haberkorn et al. 2010) were identified based upon authentic standards (Sigma–Aldrich, France) and coloring techniques. The charred plates were scanned at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG, Switzerland).

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed with the R software (v3.0.2). For all variables, 20 samples from each condition were analyzed, except for the lipid analysis (n=6). Pairwise Kruskal Wallis tests were performed (pgirmess package with R). Groups characterized by the same letter on the figures were not significantly different ( $p>0.05$ ).

## **Results**

### **Biometric index**

At T0, the average fish total length of the three populations were significantly different ( $p=0.002$ ) (Canche: average total length TL=10.57±1.03cm < Vilaine TL= 12.62±0.82 cm < Lima TL = 13.85±1.24 cm). A significant length growth was observed for all the fish groups along the experiment ( $p<0.01$ ), with an exception for the Lima group in CC, displaying a null growth (Fig. 2). At the end of the experiment, the hepatosomatic index (HSI) was significantly reduced in WHC vs CC (Fig. 3), in the three populations. In CC, The Canche group exhibited a higher HIS compared to the Lima group (Fig. 3).

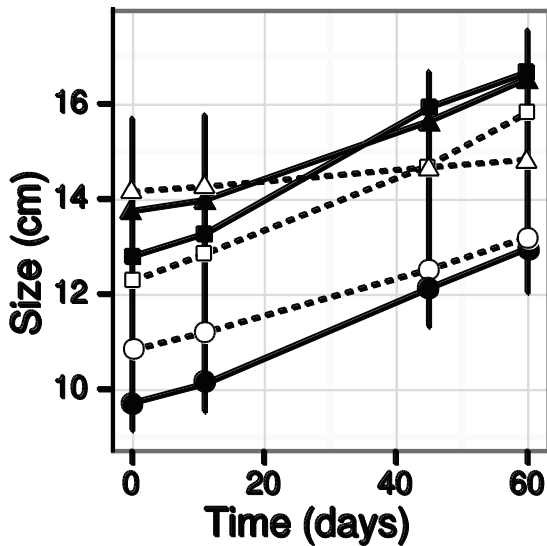


Figure 2. Mean fish size ( $\pm$  s.e.) during the experiment, for the cold condition (CC: dash lines) and the warm and hypoxia condition (WHC: full lines). Populations are Canche (dot), Vilaine (square) and Lima (triangle)

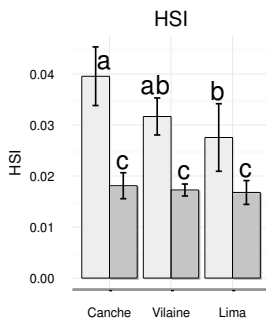


Figure 3. Hepatosomatic index at the end of the experiment (mean  $\pm$  CI 95%). The bars with the same letter indicate that the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Light grey: cold condition, dark grey: warm & hypoxia condition

### Lipid storage and lipid membrane composition

For the three populations, a general decrease of the liver TAG/ST ratio was observed in the WHC vs CC (Fig. 4), this trend being only significant for the Canche group ( $p < 0.05$ ). In the muscle, the TAG/ST ratio did not differ between conditions, but between populations (Fig. 4: Canche  $\approx$  Vilaine > Lima).

In the muscle, a significant decrease in the PE/PC and PI/PL ratios was observed for the three populations, in the WHC vs CC (Fig. 4); the PI/PL decrease being more pronounced in the Lima population. A significant increase of the muscle PS/PL ratio was detected for Canche and Vilaine populations in the WHC vs CC (Fig. 4); a high level of PS/PL being maintained for the Lima population whatever the condition. In the liver, no significant phospholipids changes were detected between conditions and between populations.



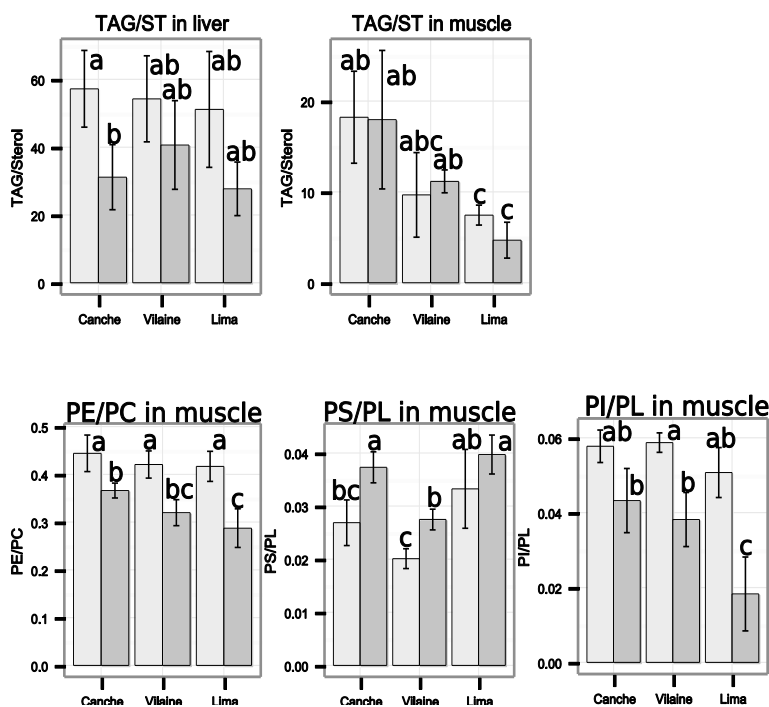


Figure 4. Ratio of lipid classes in liver and muscle at the end of the experiment (mean  $\pm$  CI 95%). The bars with the same letter indicate that the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Light grey: cold condition, dark grey: warm & hypoxia condition. TAG : triacylglycerol, ST : sterol, PS : phospholipids, PE : phosphatidylethanolamine, PC : phosphatidylcholine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylserine

### Enzymatic activities

In the liver, the enzymatic activities of CCO and CS remained unchanged between populations or experimental conditions (Fig. 5). In the WHC, the activity of LDH was significantly increased for the Canche and Vilaine populations, this activity remaining high and stable in both conditions for the Lima population (Fig. 5). The activity of G6PDH decreased significantly for Canche and Vilaine populations, this activity remaining low and stable for Lima fish (Fig. 5).

In the muscle, the activity of CS and CCO were globally lower in the WHC compared to CC, in the three populations (Fig. 5); the decrease of the CCO activity being less marked in the Lima vs the french populations. The activity of these two enzymes was globally higher in the Canche population vs the other populations. The activity of the muscle LDH increased in the WHC, but only significantly for the Lima population (Fig. 5). The LDH activity in the Canche sample was also higher than in Vilaine and Lima samples.

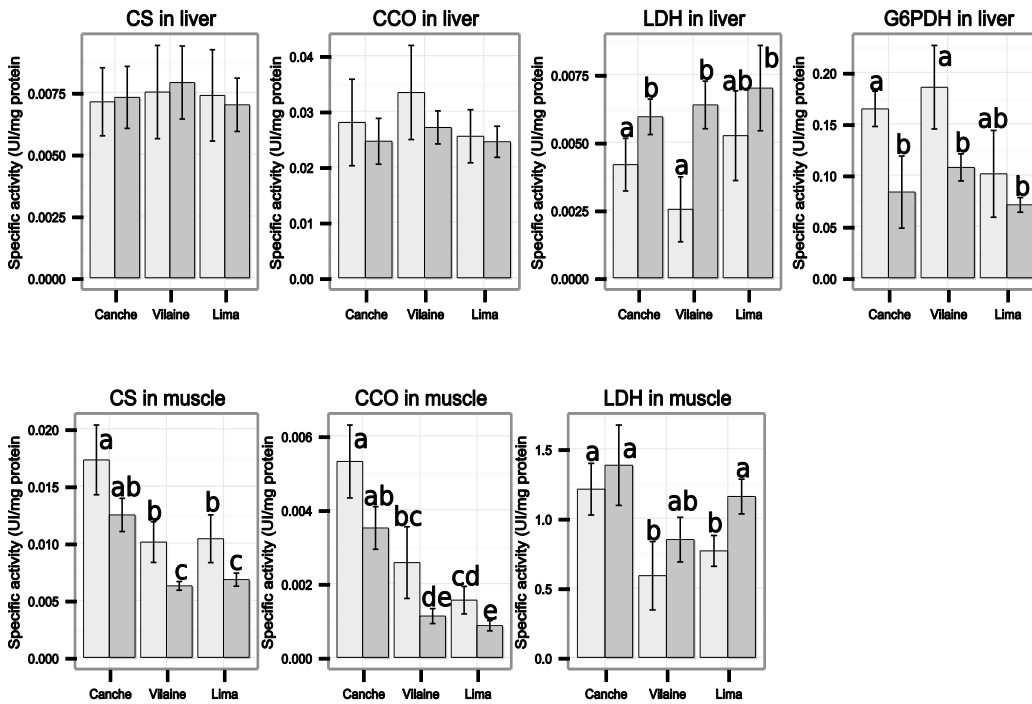


Figure 5. Specific activity of four enzymes in liver and muscle (mean  $\pm$  CI 95%). The bars with the same letter indicate that the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Light grey: cold condition, dark grey: warm & hypoxia condition. CS: citrate synthase, CCO: cytochrome C oxidase, LDH: lactate dehydrogenase, G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

### Blood parameters

No significant differences were detected among populations or conditions, considering the levels of glycemia and lactate measured in the fish serum, at the end of the experiment.

### Data integration by Principal Component Analysis

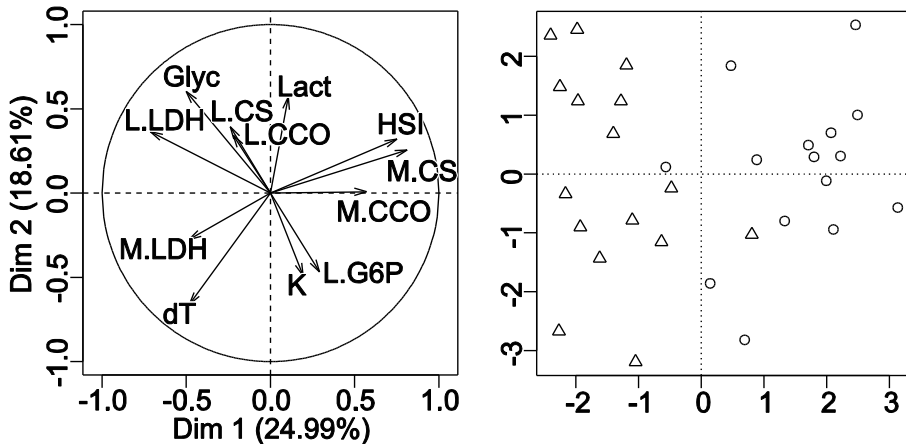
After a 59 days experiment, the main factorial plan of the Principal Component Analysis explained 43.48%, 57.13% and 43.88% of the total variance of the data set, for the populations of Canche, Vilaine and Lima respectively (Fig. 6).

High similarities were observed in the distribution pattern of particular markers in the northern populations (Canche & Vilaine in Fig. 6: correlation circles); ie a negative correlation was detected between the LDH activities for liver (L LDH) and the group of variables: CS - CCO activities for muscle (M CS, M CCO) and hepatosomatic index (HSI). A moderate and positive correlation was observed between the Liver CS and CCO activities, this group of makers not being correlated with the previous two groups. The distribution of Canche and Vilaine individuals (Fig. 6: factorial plans) highlighted a similar clear opposition between fish submitted to WHC on the left side of the plan vs fish in CC located on the right side. Globally, fish from the northern estuaries displayed a marked anaerobiosis activity (L LDH) in WHC vs marked aerobiosis activities (M CS & M CCO) and high

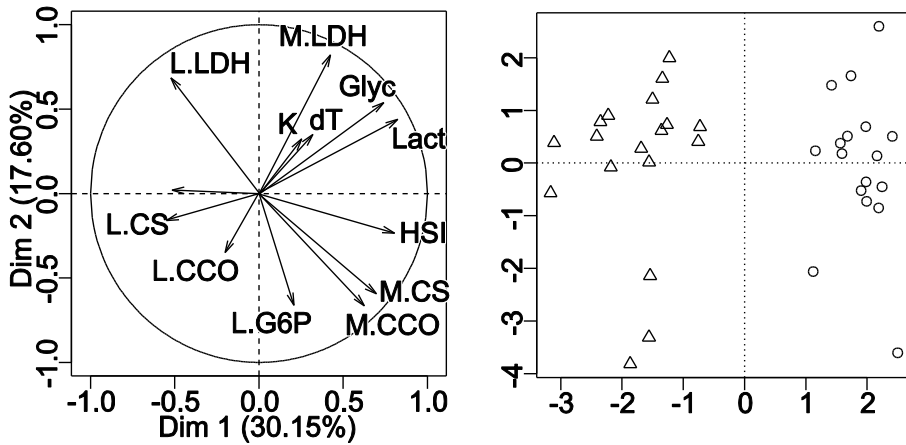
HIS in CC.

In the Lima population, the opposition between the groups: (L LDH) vs (M CS - M CCO - HSI - K) was detected (Lima in Fig.6: correlation circle). The liver CS and CCO activities were negatively correlated and unrelated to the previous groups. The Lima fish distribution was very contrasted relatively to northern estuaries (Fig. 6: factorial plan). The fish in CC were clearly separated in two groups: fish in the right part of the plan showing the higher values for aerobiosis, HIS and K vs fish in the left plan displaying reduced values for the previous markers and a high L LDH activity. On the other hand, all fish submitted to WHC were clearly grouped in the plane center, thus displaying an intermediary physiology relatively to the two fish groups in CC.

### Canche



### Vilaine



### Lima

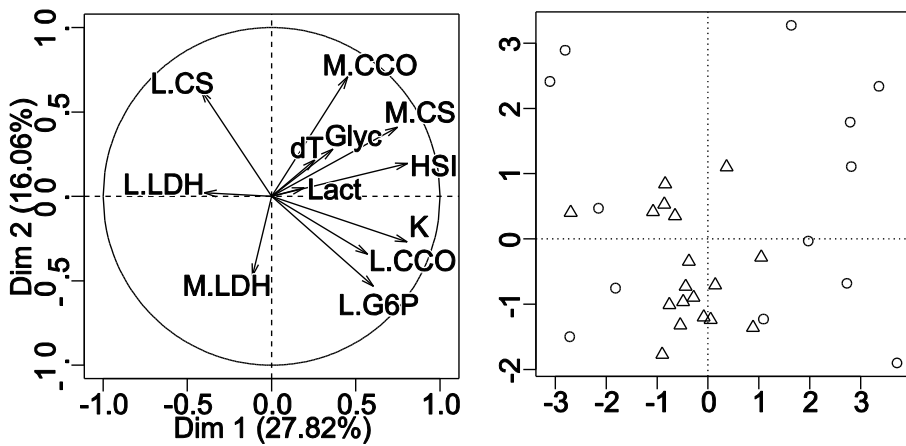


Figure 6. Principal component analysis (axes 1 and 2). Distribution of the markers on the correlation circle (left) and of the individuals on the factorial plan (right), after a 60 days experimentation, conducted on flounders from the Canche, Vilaine and Lima estuaries. L.LDH: liver lactate dehydrogenase, L.CS: liver citrate synthase, L.CCO: liver cytochrome C oxidase. L.G6P: liver glucose-6-phosphate dehydrogenase. M.LDH: muscle lactate dehydrogenase, M.CS: muscle citrate synthase, M.CCO: muscle cytochrome C oxidase. dT : difference in total lenght between T0 and T60. K: Fulton condition index at T60. Lact: serum lactate. Glyc: serum glycaemia. HIS: Hepatosomatic index. Fish distribution: individuals exposed to the cold condition (circles), and to the warm and hypoxia condition (triangles)

## Discussion

### **Growth rate and hepato-somatic index**

During the two months experiment, whatever the rearing conditions (CC cold condition: stable water temperature at 10°C / WHC warm and hypoxia condition: water temperature rising by 1°C per day, from 10°C to 22°C, then lowering of O<sub>2</sub> saturation at 40% during the last 6 days), growth rates were similar and constant for the northern populations of Vilaine and Canche. The fish from the southern peripheral Lima displayed a convergent growth rate in the WHC compared to the northern populations, but no growth in CC.

We did not observe any detrimental effect of the multistress (heat and hypoxia) on fish juvenile growth. Warm waters (around 22°C) are sometimes observed in flounder estuarine habitats over the English Channel (Attrill & Power 2004), whereas higher temperatures (until 25°C) were frequently detected in summer in Portuguese estuaries where the flounder is common (Martinho et al. 2007). The additional stress, ie the moderate hypoxia (6-days of hypoxia exposure) is possibly too short to really impact fish growth, even though it has been showed that mild hypoxia (50%) notably impacted the growth of turbot in 15 days (Pichavant et al. 2001).

On the other hand, the null growth of the Lima group in CC, suggests that the cold temperature is impacting the fitness of this population, 10°C being rarely observed in Portuguese estuaries (Martinho et al. 2007), while the estuarine temperature in winter over the English Channel can drop currently to 7°C in winter (Lavergne et al. 2015).

As the hepatosomatic index is usually considered as a proxy of the fish energy status (Chellappa et al. 1995, Couture et al. 1998, Kerambrun et al. 2012), the general HSI reduction detected in WHC vs CC for the three populations could be considered as the energetic cost of the response to multistress. Furthermore, in the CC, Lima juveniles showed the lowest HSI value, suggesting that they did not store as much energy compared to others, this trend strengthening our previous hypothesis on the negative impact of cold environment on fish fitness in southern vs northern populations.

### **Lipids: reserve and membrane composition**

Several lipid classes were analyzed in liver and white muscle, at the end of the two months experiment. We have estimated the ratio TAG/ST (Triacylglycerol / Sterol) considered as a pertinent index for the assessment of the individual lipids reserve, and for the monitoring of environmental stress impact on flatfishes in nursery areas (Amara et al. 2007, 2009; Kerambrun et al. 2012). The liver TAG/ST decrease, observed in the WHC for the three populations, confirmed that the TAG could become a main source of energy for marine organisms submitted to long-term stress (Pernet et

al. 2007), particularly in a multistress context; this trend was only significant for the Canche population, but could be explained by the fact that the lipids analysis were only performed on six samples (instead of 20 for the estimation of the other metrics of this study).

The stability of the white muscle TAG/ST was maintained within each fish group, in the two experimental conditions. The low level of muscle TAG/ST in the Lima group vs northern groups suggests that the southern population could allocate less energy to lipid storage in the lab than the northern populations; such a trend has been observed in another coastal fish (*Menidia menidia*), whose northern populations accumulate lipids at a faster rate in the laboratory than southern conspecifics and also allocate more energy to lipid storage in the wild (Schultz and Conover 1997). The maintenance of membrane integrity is a crucial part of the fish acclimatory response to temperature and involves major shifts in the lipid composition of membranes (Podrabsky and Somero 2004). Phospholipid (PL) composition contributes to the biophysical properties of biological membranes and thus to their functionality and to the activity of membrane proteins and enzymes. Phosphatidylethanolamine (PE) is a fluidizing phospholipid which proportion increases in colder environment, while phosphatidylcholine PC is a stabilizing phospholipid which proportion increases in warmer environment (Hazel 1995).

In the present study, changes in the relative abundance of different classes of phospholipids (PL) in the membrane were observed in the muscle between CC and WHC in the three fish groups, but not in the liver. Here, the general warm-induced decrease observed on the PE/PC ratio after acclimation is consistent with results observed with other ectotherms concerning the homeoviscous adaptation in biological membranes (Hazel 1995, Hodková 1999). However, changes on the phospholipids composition might be caused by more complex regulation mechanisms. Phospholipids are the main components of biological membranes (plasmalemma, nuclear envelope, mitochondria membrane) which regulate numerous physiological mechanisms; among these, endocytosis properties (Miranda & Hazel 2002) and variation in the proton leak at the level of the internal mitochondrial membrane (Hulbert and Else 2005).

Thanks to more effective analytical methods, several recent studies underlined the physiological importance of the “minor” phospholipid classes. For instance, PS (phosphatidylserine) and PI (phosphatidylinositol) were described as acidic phospholipids which makes them the primary binding targets of more than 10 different types of globular protein domain (Lemmon 2008). Additionally, in mammalian cells, PS is only detected in the inner plasmalemma under standard condition, while PS on the outer surface is a sign of an apoptotic cell (Kay et al. 2012, Leventis & Grinstein 2010). In the context of fish response to heat stress, a strong induction of transcripts for Glycosyl Phosphatidylinositol (GPI) anchored membrane proteins was detected during exposure to chronically elevated temperature. These GPI anchored proteins are associated with specific plasma

subdomains called membrane rafts considered as critical sites for many membrane associated functions including cellular signaling (Podrabsky and Somero, 2004). Finally, in the present study, the contrasted trends of the ratios (PS/PL and PI/PL) from CC to WHC, between Lima and Canche-Vilaine groups could reflect local adaptation of these populations for the maintaining of the viscosity and functionality of cellular membranes in their particular thermal environment.

### **Energetic metabolism: aerobiosis**

Proxies of aerobiosis were assessed in this study: the activities of Citrate Synthase (CS: a key enzyme in the Krebs cycle), and Cytochrome C Oxidase (CCO: the terminal electron acceptor in the electron chain transport). No significant differences of CS and CCO activities were detected between experimental conditions and populations for the liver, while contrasted activities were obtained in muscle between conditions and populations; this trend confirming that aerobic metabolic remodeling can deeply differs between liver and muscle in fish response to thermal acclimation and may be triggered by different stimuli (Orczewska et al 2010).

In the muscle and whatever the experimental conditions, the Lima southern population globally displayed reduced CS and CCO activities compared to northern populations; this trend being particularly marked for the CCO. We suggest that the general reduction of the aerobiosis metabolism in the southern vs northern flounder populations could support for the existence of a trade off between metabolic rate and high-temperature tolerance classically described in the literature for several fish species (*Menidia menidia*, *Gadus morhua*, *Fundulus heteroclitus*); this trade-off being characterized by higher metabolic rates in northern vs southern populations (or subspecies) and by the greater ability of northern populations to increase mitochondrial capacity at colder temperatures (Billerbeck et al. 2000; Sylvestre et al. 2007; Fangue et al. 2009; Dhillon and Schulte 2011).

From CC to WHC, we have detected a similar decrease of the CS activity in the populations, which could highlight a similar multistress sensitivity of glycolytic process. The decrease of aerobic metabolism was also confirmed for the CCO, but was more limited for the southern population. Considering the major role played by the CCO in the energetic metabolism and the variation among *F. heteroclitus* populations in the liver CCO gene expression regressing with habitat temperature and highly related to evolution by natural selection (Whitehead and Crawford, 2006), the present study suggests that the southern Lima population could show a reduced multistress sensitivity of oxidative process, compared to northern populations.

The fish responses to multistress (warm and hypoxia condition) are indeed complex and must be analysed cautiously. Recent studies on salmonids underlined that thermal tolerance and hypoxia tolerance might be functionally associated at least on the acute time scales associated with extreme exposure (Anttila et al. 2013, McBryan et al. 2013), and that chronicle warm acclimation and oxygen

depletion simulating climate change and eutrophication can have unexpected species-specific effects that will influence their survival capacity (Anttila et al. 2015).

### **Energetic metabolism: anaerobiosis**

Lactate dehydrogenase (LDH) activity is here considered as a proxy of the anaerobic metabolism. In the present study, from CC to WHC, a general increase of the LDH activity was detected for the northern and southern populations, respectively at liver and muscle levels. These results suggest that in the multistress context (warm and hypoxia condition), fish may be faced to increase of their maintenance costs probably linked to a less efficient ATP supply by aerobic pathways, and thus compensated for the decrease of aerobic energy production by an increase of anaerobic ATP generation (Sokolova 2013).

Recent studies on the impact of various stressors on fish (summer temperatures and hypoxia in the field on the European flounder (Tiedke et al. 2014), thermal stress on the yellow perch (Grasset et al. 2014), acute hypoxia on sculpins (Mandic et al. 2013)) have highlighted increasing activity or gene transcription of the LDH, these stress responses being tissue-specific.

### **Anabolism**

G6PDH is involved in the pentose phosphate pathway shunt, providing energy for cell growth, proliferation and fatty acid synthesis, and thus could be considered as a pertinent marker of the fish anabolism (Gauthier et al. 2011, Grasset et al. 2014). Furthermore, the G6PDH activity of this enzyme can be quickly reduced after a thermal stress (Lushchak & Bagnyukova 2006). In the present study, we observed from CC to WHC, a significant reduction of the liver G6PDH activity in the northern populations, the low G6PDH activity level being maintained in the southern population whatever the experimental conditions. This low activity in the South is coherent with our preliminary survey conducted on flounders in the field where we have underlined a highly reduced protein synthesis in southern vs northern populations (Calvès 2011).

G6PDH like CCO also displayed adaptive pattern of variation in its liver gene expression, among *F. heteroclitus* populations submitted to different thermal regimes (Whitehead and Crawford, 2006). Thus we suggest that the G6PDH activity decrease in the northern populations in WHC could be associated with a possible alteration of the anabolism; on the other hand, the stability of the G6PDH activity for southern population could be the signal of limited perturbations of anabolism in the multistress context.

### **Integration of the phenotypic responses**

The principal component analysis highlighted convergent results in the northern populations;



the fish submitted to CC displayed a marked muscle aerobiosis and high HSI, while the fish exposed to multistress in WHC showed a marked liver anaerobiosis. Some specificity appeared for these populations. The liver anaerobiosis is positively correlated to muscle anaerobiosis and to liver CS, respectively in the Canche and Vilaine groups. Globally, the northern fish responses to the experimental multistress (warm and hypoxia condition) showed a partial anaerobiosis that could be considered as a first signal of transition into the bioenergetically unsustainable pessimum range in aquatic ectotherms (Sokolova 2013).

The correlations between bioenergetic markers observed in northern and southern populations were globally convergent. However a difference was detected on the relationships between liver CS and CCO, these markers being positively and negatively correlated, respectively in northern vs southern groups.

In the southern population, two fish groups were clearly differentiated in CC: one characterized by high levels of aerobiosis, HSI and condition index, the other displaying high level of anaerobiosis and reduced HSI and condition index. Thus, in this “cold stress” situation for the southern population, characterized by a null fish growth, the two groups showed opposite bioenergetics patterns. A similar trend was detected in a study of natural populations of *F. heteroclitus* raised in a common garden environment: three fish groups were identified by their particular cardiac physiology and represented individuals with opposite patterns of metabolic genes expression (Oleksiak et al. 2005, Crawford and Oleksiak 2007). A recent investigation on a coastal fish submitted to heat stress and hypoxia confirmed that the phenotypic diversity in key metabolic traits can create differential plasticity towards environmental change (Norin et al. 2016).

Finally, in the present study, the individual variation in metabolic responses of southern fish to warm and hypoxia condition was reduced, the fish showing a very similar physiology characterized by an equilibrium between aerobiosis and anaerobiosis. We suggest that considering our set of bioenergetics markers, the southern fish were moderately stressed by the warm and hypoxia condition and thus showed a suboptimum physiological status in the Pejus range (Sokolova 2013).

## Conclusion

A significant genetic differentiation (considering neutral markers) was detected over the North-East Atlantic, between Portuguese and French European flounder populations (Calvès et al. 2013). In the present study, we have explored if this genetic differentiation was reflected by phenotypic variation, challenging southern Portuguese and northern French flounder populations in cold condition and in a multistress context (warm and hypoxia condition), and focusing on the bioenergetics effects of these stress. Our results have highlighted a reduced capacity of southern populations to cope with the cold stress and a lower capacity of northern populations to acclimate to

the warm and hypoxia condition. We suggest that the Portuguese population living in a relatively hot and stable environment has a higher capacity for thermal acclimation, compared to French populations located in a more temperate and variable environment. A similar trend is detected for many aquatic and terrestrial ectotherms submitted to heat stress (Seebacher et al. 2015). However, the differences in plasticity between European flounder populations could be the result of genetic differences (local adaptation) and/or could result from the developmental plasticity due to differential thermal experience in the early life history. A F1 offspring of spawners collected in the previous estuaries will be necessary in the future, to control further for phenotypic plasticity at early life-stages and evaluate potential adaptive differentiation among populations.

Acknowledgements:

This work was supported by the ANR program VMCS-EVOLFISH (Paris) and the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19).

## Bibliography

- Amara R, Meziane T, Gilliers C, Hermel G, Laffargue P (2007) Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series*, **351**: 201-208.
- Amara R, Selleslagh J, Billon G, Minier C (2009) Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*, **627**: 87-98.
- Anttila K, Dhillon RS, Boulding EG et al. (2013) Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *The Journal of experimental biology*, **216**: 1183–1190.
- Anttila K, Lewis M, Prokkola JM, Kanerva M, Seppänen E, Kolari I, Nikinmaa M (2015) Warm acclimation and oxygen depletion induce species-specific responses in salmonids. *Journal of Experimental Biology*, **218**: 1471-1477.
- Assis J, Castilho Coelho N, Alberto F, Valero M, Raimondi P, Reed D, Alvares Serrão E (2013) High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE* **8**(7): e68646
- Atrill MJ, Power M (2004) Partitioning of temperature resources amongst an estuarine fish assemblage. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **61**(4): 725-738.
- Beney L & Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**: 34-42.
- Billerbeck JM, Schultz ET, Conover DO (2000) Adaptive variation in energy acquisition and allocation among latitudinal populations of the Atlantic silverside. *Oecologia*, **122**: 210-219.
- Bos AR, Thiel R (2006) Influence of salinity on the migration of postlarval and juvenile flounder *Pleuronectes flesus* L. in a gradient experiment. *Journal of Fish Biology*, **68**: 1411-1420.
- Cabral H, Costa M, Salgado J (2001) Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Climate Research*, **18**: 119–126.
- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser*, **472**: 257-273.
- Calvès I (2011) Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale.
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, **47**: 775-787.
- Cooper RU, Clough LM, Farwell MA, West TL (2002) Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **279**: 1-20.
- Conover DO, Clarke LM, Munch SB, Wagner GN (2006) Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, **69**: 21-47.
- Couture P, Dutil JD, Guderley H (1998) Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic

- cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**: 1591-1598.
- Crain CM, Kroeker K, Halpern BS (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, **11**: 1304-1315.
- Dando PR (2011) Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar Ecol Prog Ser*, **430**: 183-196.
- DeKoning ABL, Picard DJ, Bond SR, Schulte PM (2004) Stress and interpopulation variation in glycolytic enzyme activity and expression in a teleost fish *Fundulus heteroclitus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, **77**(1): 18-26.
- de Kruijff B (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1**(4): 564-569.
- Dhillon RS, Schulte PM (2011) Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *Journal of Experimental Biology*, **214**: 3639-3648.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, Amara R, Charrier G, Fournier M, Laroche J (2015) Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Poll Bull*, **95**: 634-645.
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, **17**: 1170-1188.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2006) Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comparative Biochemistry and Physiology part A*, **145**(1): 73-81.
- Fangue NA, Richards JG, Schulte PM (2009) Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, **212**: 514-522.
- Farkas T, Fodor E, Kitajka K, Halver JE (2001) Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research*, **32**: 645-655.
- Gauthier C, Campbell PGC, Couture P (2011) Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, **30**: 2148-56.
- Genner MJ, Sims DW, Wearmouth VJ, Southall EJ, Southward AJ, Henderson PA, Hawkins SJ (2004) Regional climatic warming drives long-term community changes of British marine fish. *Proc. Biol. Sci.*, **271**(1539): 655-661.
- Gillanders BM, Elsdon TS, Halliday IA et al. (2011) Potential effects of climate change on Australian estuaries and fish utilising estuaries: a review. *Marine and Freshwater Research*, **62**: 1115-1131.
- Grasset J, Bougas B, Campbell PGC et al. (2014) Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **71**: 1635-1641.
- Grim JM, Miles DRB, Crockett EL (2010) Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or

- susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 445-452.
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Moal J, Suquet M, Guéguen M, Sunila I, Soudant P (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, **9**: 427-439.
- Harrald M, Neat FC, Wright PJ, Fryer RJ, Huntingford FA (2010a) Population variation in thermal growth responses of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Environmental Biology of Fishes*, **87**: 187-194.
- Harrald M, Wright PJ, Neat FC (2010b) Substock variation in reproductive traits in North Sea cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **67**: 866-876.
- Hazel J (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explication ? *Annual review of physiology*, **57**: 19-42.
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Frydenberg J, Loeschcke V (2007) Adaptive divergence in a high gene flow environment: *Hsc70* variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity* **99**: 592-600.
- Hermant M, Lobry J, Bonhommeau S, Poulard JC, Le Pape O (2010) Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J Sea Res*, **64**: 45-53.
- Hodková M (1999) Seasonal changes in the phospholipid composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29**: 367-376.
- Hulbert AJ, Else PL (2005) Membranes and the setting of energy demand. *Journal of Experimental Biology*, **208**: 1593-1599.
- Ito LS, Takahashi C, Yamashita M, Strüssmann CA (2008) Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiological and Biochemical Zoology*, **8**(6): 762-774.
- Kay JG, Koivusalo M, Ma X, Wohland T, Grinstein S (2012) Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Molecular Biology of the Cell*, **23**: 2198-2212.
- Kerambrun E, Henry F, Perrichon P et al. (2012) Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **108**: 130-40.
- Kraffe E, Marty Y, Guderley H (2007) Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid composition. *Journal of Experimental Biology*, **210**: 149-165.
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 738-748.
- Larsen PF, Nielsen EE, Hansen MM, Wang T, Meier K, Pertoldi C, Loeschcke V (2013) Tissue specific haemoglobin gene expression suggests adaptation to local marine conditions in North Sea flounder (*Platichthys flesus* L.). *Genes Genom*, **35**: 541-547.
- Larsen PF, Schulte PM, Nielsen EE (2011) Gene expression analysis for the identification of selection and local adaptation in fishes. *Journal of Fish Biology*, **78**: 1-22.

- Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD et al. (2007) Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology*, **16**: 4674–4683.
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, Claireaux G, Mazurais D, Zambonino-Infante J, Le Bayon N, Cahu C, Laroche J (2015) Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Pollut Bull*, **95**: 658-664.
- Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**: 99–111.
- Leventis PA, Grinstein S (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual Review of Biophysics*, **39**: 407–27.
- Lushchak VI, Bagnyukova T V (2006) Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, **143**: 36–41.
- Macnab V, Barber I (2012) Some (worms) like it hot: fish parasites grow faster in warmer water, and alter host thermal preferences. *Global Change Biology*, **18**: 1540–1548.
- Mandic M, Speers-Roesch B, Richards JG (2013) Hypoxia tolerance in sculpins is associated with high anaerobic enzyme activity in brain but not in liver or muscle. *Physiological and Biochemical Zoology*, **86(1)**: 92-105.
- Martinez ML (2006) Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Journal of Experimental Biology*, **209**: 3851–3861.
- Martinho F, Leitao R, Neto JM, Cabral HN, Marques JC, Pardal MA (2007) The use of nursery areas by juvenile fish in a temperate estuary, Portugal. *Hydrobiologia*, **587**: 281-290.
- Martinho F, van der Veer H, Cabral HN, Pardal MA (2013) Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *Journal of Sea Research*, **84**: 61-69.
- McBryan TL, Anttila K, Healy TM, Schulte PM (2013) Responses to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. *Integrative and Comparative Biology*, **53(4)**: 648- 659.
- Menesguen A, Aminot A, Belin C, Chapelle A, Guillaud JF, Joanny M, Lefebvre A, Merceron M, Piriou JY, Souchu P (2001). L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la Commission Européenne e DG.ENV.B1, 59 pp.
- Miranda EJ, Hazel JR (2002) The effect of acclimation temperature on the fusion kinetics of lipid vesicles derived from endoplasmic reticulum membranes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* **131**: 275–286.
- Morais P, Dias E, Babaluk J, Antunes C (2011) The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: Ecological implications and fishery management. *Journal of Sea Research*, **65**: 235–246.
- Neuheimer AB, Thresher RE, Lyle JM, Semmens JM (2011) Tolerance limit for fish growth exceeded by warming waters. *Nature Climate change*, **1**: 110-113.
- Norin T, Malte H, Clark TD (2016) Differential plasticity of metabolic rate phenotypes in a tropical fish facing



- environmental change. *Functional Ecology*, **30**: 369-378.
- Occhipinti-Ambrogi A (2007) Global change and marine communities: alien species and climate change. *Mar. Poll. Bull.*, **55**(7-9): 342-352.
- Oleksiak MF, Roach JL, Crawford DL (2005) Natural variation in cardiac metabolism and gene expression in *Fundulus heteroclitus*. *Nature Genetics*, **37**(1): 67-72.
- Orczewska JI, Hartleben G, O'Brien KM (2010) The molecular basis of aerobic metabolic remodeling differs between oxidative muscle and liver of threespine sticklebacks in response to cold acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **299**: R352-R364.
- Otero J, Jensen AJ, L'abée-Lund JH et al. (2012) Contemporary ocean warming and freshwater conditions are related to later sea age at maturity in Atlantic salmon spawning in Norwegian rivers. *Ecology and evolution*, **2**: 2192–203.
- Peig J, Green AJ (2010) The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, **24**: 1323–1332.
- Pernet F, Tremblay R, Redjah I, Sévigny JM, Gionet C (2008) Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology*, **211**: 969-977.
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology*, **210**: 2999-3014.
- Pichavant K, Person-Le-Ruyet J, Le Bayon N, Severe A, Le Roux A, Boeuf G (2001) Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *Journal of Fish Biology*, **59**: 875-883.
- Podrabsky JE, Somero GV (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus lineatus*. *Journal of Experimental Biology*, **207**(13): 2237-2254.
- Pörtner HO (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **132**(4): 739-761.
- Pörtner HO (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 HO, Peck MA (2010) Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, **77**: 1745-1779.
- Pörtner HO, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, **315**: 95-97.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Rabalais NN, Turner RE, Diaz RJ, Justic D (2009) Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, **66**: 1528–1537.

- Ramos S, Ré P, Bordalo AA (2010) Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *Journal of Sea research*, **64**: 473-486.
- Reynolds AM, Lee Jr. RE, Costanzo JP (2014) Membrane adaptation in phospholipids and cholesterol in the widely distributed, freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B*, **184**: 371-383.
- Sanford E, Kelly MW (2011) Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review in Marine Science*, **3**: 509-535.
- Schulte PM (2014) What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology*, **217**: 23-34.
- Schulte PM, Glemet HC, Fiebig AA, Powers DA (2000) Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-responsive regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 6597-6602.
- Schultz ET, Conover DO (1997) Latitudinal differences in somatic energy storage: adaptive responses to seasonality in an estuarine fish (*Atherinidae*: *Menidia menidia*). *Oecologia*, **109**: 516-529.
- Seebacher F, White CR, Franklin CE (2015) Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change* **5**: 61-66.
- Smith A (2012) Lipid-protein interactions in biological membranes: a dynamic perspective. *Biochimica et biophysica acta*, **2**: 172-177
- Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, **53**: 597-608.
- Sunday JM, Bates AE, Dulvy NK (2012) Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change*, **2**: 686-690.
- Sylvestre E, Lapointe D, Dutil JD, Guderley H (2007) Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Comparative Physiology b*, **177**: 447-460.
- Tiedke J, Thiel R, Burmester T (2014) Molecular response of estuarine fish to hypoxia: a comparative study with ruffe and flounder from field to laboratory. *PLOS ONE*, **9(3)**: e90778.
- Todgham AE, Stillman JH (2013) Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integrative and Comparative Biology*, **53**: 539-544.
- Vaquer-Sunyer R, Duarte CM (2008) Thresholds of hypoxia from marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105(40)**: 15452-15457.
- Whitehead A, Crawford DL (2006) Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103(14)**: 5425-5430.





## **Proteomic responses of European flounder to temperature rising and hypoxia: differential sensibilities of peripheral vs core populations**

Nicolas Pédrón <sup>(a,b)</sup>, Sébastien Artigaud <sup>(a)</sup>, José-Luis Zambonino Infante <sup>(a,b)</sup>, Nicolas Le Bayon <sup>(a,b)</sup>, Grégory Charrier <sup>(a)</sup>, Vianney Pichereau <sup>(a)</sup>, Jean Laroche <sup>(a)</sup>

(a) Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer IUEM, Plouzané, France

(b) Ifremer, Laboratoire Adaptation, Reproduction et Nutrition des Poissons ARN, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins PFOM, Plouzané, France

**In prep. for Journal of Proteomics**

### **Abstract**

In the global change context, ectotherms are increasingly impacted by abiotic perturbations. Along the distribution area of a species, populations at low latitudes are particularly exposed to temperature increase and hypoxic events. In this study, we have compared the proteomic responses in the liver of European flounder populations, with 2-D electrophoresis. One southern population from Portugal vs two northern populations from France, were reared in a common garden experiment. Most of the proteomic differences were observed between the two experimental conditions, a cold vs a warm and hypoxia conditions. Consistent differentiations between populations were observed in bioenergetics, methionine metabolism, transport protein for fatty acids, amino-acid catabolism. Interestingly, nine spots were also differentially expressed in one of the populations independently of the experimental condition. The specific regulation of crucial enzymes like ATP-synthase and G6PDH, in the liver of the Portuguese flounder population, could be related to a local adaptation.

## Introduction

Estuaries are highly variable ecosystems, where organisms must cope with environmental changes at the scale of a day (tidal cycle), seasons and decades in the current context of global change (Scavia et al. 2002; Roessig et al. 2005). These coastal zones are particularly exposed to the impact of global warming as well as to eutrophication-related decrease in oxygen availability (Gillanders et al. 2011; Rabalais et al. 2009). Thus numerous coastal systems are periodically submitted to temperature rising and hypoxia. Faced with these combinations of stressors, fish populations can adjust to the new conditions by means of phenotypic plasticity, and/or adapt to new conditions by means of genetic changes (evolution by natural selection) (Reygondeau & Beaugrand 2011; Ruggeri et al. 2015). A recent study has suggested that thermal tolerance and hypoxia tolerance might be functionally associated for families of *Salmo salar*, that could respond potentially to selection linked to global climate change, at least on the acute time scales associated with extreme exposures (Anttila et al. 2013; McBryan et al. 2013).

The European flounder (*Platichthys flesus*) is a catadromous flatfish widely distributed in the North-East Atlantic, from the polar circle to the Portugal. In spring, young juveniles are recruited in estuarine nurseries where they stay for at least two years; maturing adults migrate to the mouth of estuaries for reproduction (Dando 2011). *P. flesus* is considered as a very pertinent fish model to explore the acclimation/adaptation of populations facing stressors in coastal systems over Europe (Hemmer-Hansen et al. 2007; Larsen et al. 2013; Dupuy et al. 2015; Lavergne et al. 2015).

In the present study, common garden experiments will be conducted in an experimental structure to compare responses to different thermal regimes and hypoxia of field collected flounder juveniles from three estuaries. This approach cannot disentangle the respective contributions of local adaptation and phenotypic plasticity to phenotypic differentiation between populations. However, it allows control over any further plastic responses to common rearing conditions after collection of the individuals, for that fraction of each population that has survived local selective pressure (Harrald et al. 2010); this approach produced new insights in differential energetic metabolism and contrasted capacities of fish populations to cope with stressors (Whitehead and Crawford 2006; Baumann and Conover 2011).

Proteomic tools are widely used in aquaculture, studies in experimental conditions or environmental diagnostic purposes, but so far very few studies involve marine populations directly sampled in the field. Yet, proteomic tools can be useful to enlighten metabolic differences between natural populations. For example, a recent study on the great scallop *Pecten maximus* showed a high contrast in cytoskeletal protein content between populations along the European coast (Artigaud et al. 2014). Another study on fish used proteomics to investigate variation in protein content of two organs in three natural populations of European hake (Gonzalez et al. 2010). In recent studies from

our group, three natural populations of European flounder from both sides of the English Channel were compared, showing significant differences in their energetic and glutathione metabolisms (Galland et al. 2013, Dupuy et al. 2015).

In the present study, to improve our understanding of the metabolic variations of the European flounder over its distribution area, juveniles were collected in three natural populations (two French core populations sampled in the Canche and Vilaine estuaries, and one Portuguese southern peripheral population collected in the Lima estuary), the French and Portuguese populations displaying a significant genetic differentiation (Calvès et al. 2013). The fish were immediately transported to the laboratory. Our objectives were: (1) to qualify the liver physiological adjustment occurring in flounders submitted to temperature rising and hypoxia, (2) to determine possible differences in the responses of populations to multi-stress. Thus fish from the three estuaries were acclimated for 2 months in the laboratory and submitted to either a “cold condition” or a “warm and hypoxia condition”. Proteins were then extracted from the liver and the proteomic responses of populations were compared using 2-DE based mass spectrometry.

## Materials and methods

### Fish sampling

Juvenile flounders were sampled by a beam trawl in October 2013. Between 100 and 120 young of the year (0+ cohort : 8cm < total fish length < 15cm) were collected per estuary, in France (Canche and Vilaine) and in Portugal (Lima) (figure 1). The Canche is considered a relatively pristine estuary. It displays low level of contaminants in comparison with other large and heavily polluted systems, like the Seine (Amara et al. 2007, 2009).

The Vilaine is a moderately polluted estuary (Laroche et al. 2013), characterized by possible summer hypoxic events, mainly caused by eutrophication and by a dam located in the upper part of the estuary that favors water stratification (Menesguen et al. 2001)

The Lima estuary is located only two hundred kilometers north of the southern latitudinal limit of *P. flesus*: the Mondego estuary in Portugal (Calvès et al. 2013).

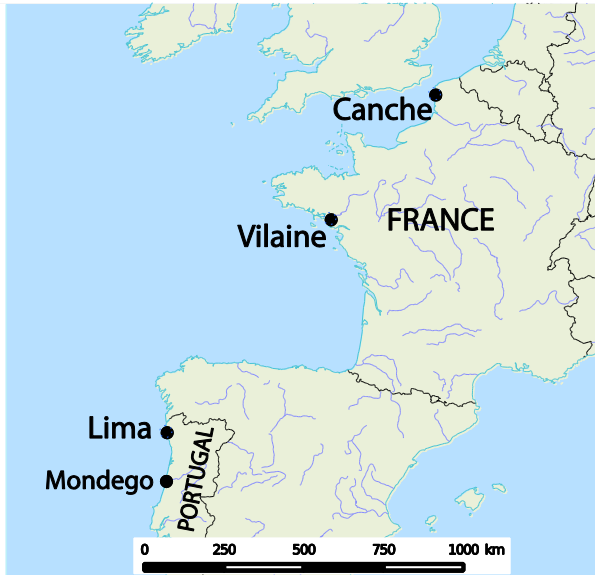


Figure 1. Sampling locations. Mondego is the estuary of the southernmost known population of European flounder.

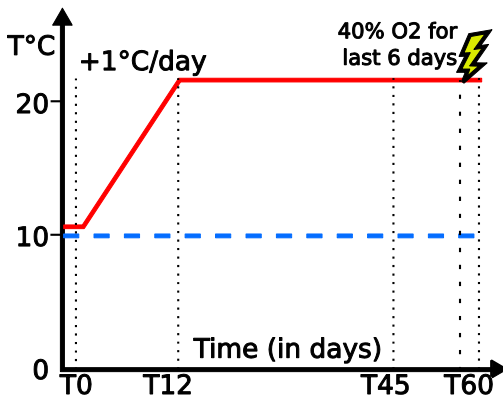


Figure 2. Experimental procedure, describing the cold condition (dashed line) and the warm and hypoxic condition (full line), and the four times at which the biometric measurement were made.

### Experimental challenge

Fish were acclimated in the rearing facilities of the IFREMER center in Plouzané (France), at the ambient temperature of the sea (9°C, 35 PSU) for at least 2 months, and fed ad libitum with pellets. Then, fish were challenged in two experimental conditions designed to mimic contrasted estuarine environments: the first one was a low water temperature (10°C) and normoxic environment, which may be regularly encountered in winter by fish in French estuaries, but not by the southern fish population of the Lima, 10°C being rarely observed in Portuguese estuaries (Martinho et al. 2007). The second condition was characterized by a high temperature (22°C) and a moderate hypoxia; this rather strong temperature was sometimes observed in summer flounder habitats over the English channel (Attril & Power 2004), whereas higher temperatures (until 25°C) were frequently detected in summer, in Portuguese estuaries where the flounder is common (Martinho et al. 2007).

Thus, in the present study, after the acclimation period, fish were randomly assigned to a “cold” tank or a “warm and hypoxia” tank. Both tanks contained 50 fish from each estuary. The cold tank temperature was set to 10 °C, and dissolved oxygen was maintained over 95% during the 60 days of the experiment (figure 2). Fish weight and total length was measured every 15 days during the experiment.

In the warm and hypoxia condition (figure 2), temperature was raised by 1°C per day, until it reached 22°C. At T53, dissolved oxygen level was lowered to 40% in 24h. This multistress was maintained for six days. At T60, 30 fish from each estuary and each condition (total n= 120) were sacrificed by cervical dislocation. Fish total length and weight were measured, and livers were immediately collected, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

### **Biometric comparison**

The hepato-somatic index (HSI) was calculated to evaluate the liver energy status (Chellappa et al. 1995). Samples were compared with a non-parametric Kruskal-wallis test. Size at the beginning of the experiment and growth between important steps were also compared with a Kruskal-Wallis test. The considered period were the initial period (T0-T15), the thermal plateau (T15-T45) and the last period characterized by the six days of hypoxia (T45-T60).

### **Protein extraction**

Eight samples per experimental condition and estuary were randomly selected for proteomic analysis. Thus 48 samples in total were analysed (8 samples x 2 conditions x 3 populations). Samples were crushed with a mixer mill (MM400, RETSCH, Germany). One hundred milligrams of the obtained powder was homogenized in 1ml Tris-HCl buffer (100mM, pH 6.8) containing 1 µL protease inhibitor mix (GE HealthCare). Supernatants were retrieved after centrifugation (12,000 G, 10 min, 4°C) and incubated for 30 min with 1% nuclease mix (GE HealthCare). Samples were precipitated for 12 to 16 h at 4°C with trichloro-acetic acid 20% (v:v) in acetone. After centrifugation, pellets were washed repeatedly with acetone 70% and suspended in Destreak Rehydration solution (GE HealthCare). Proteins concentrations were adjusted to 2 mg/ml, in 250 µl containing 1% IPG buffer pH 3-10 (GE HealthCare).

### **Two-dimensional electrophoresis**

For each of the 48 samples, the final mixture containing 500 µg protein was loaded on a 13 cm linear IPG strip (pH 3-10 gradient). After 12 h hydration, isoelectric focusing was performed using the following protocol: 250 V for 15 min, 500 V for 15 min, a 1 h gradient to 1000 V, a 2.5 h

gradient to 8000 V. To prepare for the second dimension SDS-PAGE, strips were incubated 15 min in an equilibration solution (50 mM Tris-HCL pH 8.8 with 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 0.002% Bromophenol Blue) containing 1g/L dithiothreitol, and then 15 min with the same equilibration solution containing 48 g/L iodoacetamide. The second dimension migration was performed with 10% acrylamide gel in a thermo-regulated environment, at 10 mA per gel for 30 min followed by 20 mA per gel until complete migration. Gels were stained in a 0.1% Coomassie blue staining solution for at least 12 h, then washed for 24 h in a methanol-acetic acid-water solution (30/7/63:v/v/v).

Gels were scanned in a G:Box with the Genesys image acquisition software (Syngene). The resulting images were imported and aligned in the Prodigy SameSpots software (Nonlinear Dynamics, version 3.3). Spots were automatically detected, then manually checked to eliminate artifacts. Raw data were exported and statistical analysis where performed in R (R Core Team, 2013) using the packages prot2D (Artigaud et al 2013) and limma (Smyth, 2004). Two different analyses were done: a paired-comparison between conditions for each estuary and a paired-comparison between estuaries (grouping control and multi-stress individuals for each estuary). Comparisons were done using a modified t-test that takes advantage of hierarchical Bayes methods for estimation of the variance across spots (“moderated t-test”; Smyth 2004; Artigaud et al 2013) and p-values were globally corrected by calculating a false discovery rate (fdr; Benjamini & Hochberg, 1995), accounting for multiple comparisons issues. Spots were considered significant if the fdr were lower than 0.1 and the fold change superior than 1.5. These spots were then subjected to mass spectrometry for identification.

### **Mass-spectrometry and identification**

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and an OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of Angiotensin I, Angiotensin II, Neurotensin, ACTH clip (1-17), ACTH clip (18-39); mass precision was better than 50 ppm. After tryptic digestion, the dry sample was resuspended in 10 µL of 0.1% TFA. A 1µl volume of this peptide solution was mixed with 10 µL volumes of solutions of CHCA matrix prepared in a diluant solution of 50% ACN with 0.1% TFA. The mixture was spotted on a stainless steel Opti-TOF™ 384 targets; Database searching was performed using the Mascot 2.4.0 program (Matrix Science). A database corresponding to updated compilation download from the Swissprot database with chordata as selected taxonomy was used. The variable modifications allowed were as follows: C-

Carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, and dioxidation. “Trypsin” was selected as enzyme, and three miscleavages were also allowed. Mass accuracy was set to 300 ppm and 0.6 Da for MS and MS/MS mode respectively.

## Results and Discussion

We have explored potential differences in the ability of the three flounder populations to cope with contrasting experimental conditions, considering individual fitness indicators (growth rate, hepatosomatic index), and fish metabolism by a proteomic approach.

### Biometrics

For two months, the fish were measured every other week; the growth rate was similar between populations and/or conditions, with a major exception for the Lima fish in control condition that showed a null growth (Figure 3). Thus we suggest that the cold condition (10°C) could impact the fitness of the Lima population.

Hepatosomatic index usually decreases in stressed conditions, thus HSI is generally considered as a pertinent indicator of the fish energy status both in rearing and natural conditions (Kerambrun et al. 2013; Zheng et al. 2013; Kwasek et al. 2014). In the present study, the general HSI decrease in warm and hypoxia vs cold conditions, for the three populations, was associated to the energetic cost of the response to multistress (figure 4). Under cold conditions, the lower HSI level observed in the Lima group suggest that this population cannot store as much energy compared to others, strengthening our hypothesis of a low performance of this southern population at 10°C.

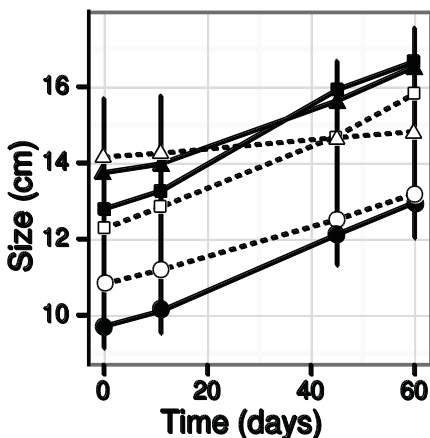


Figure 3. Mean size ( $\pm$  s.e.m.) for the six lots during the experiment for the two conditions: cold (dash lines) vs warm and hypoxic (full lines). Populations are Canche (circle), Vilaine (square) and Lima (triangle).



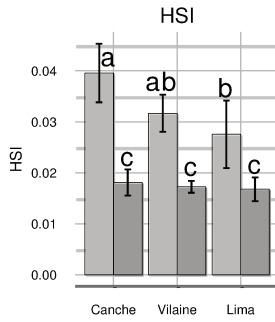


Figure 4. Hepatosomatic index (HSI) at the end of the experiment for the populations of Canche, Vilaine and Lima (mean  $\pm$  CI 95%). Bars with the same letter indicate that the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Light grey: cold condition, dark grey: warm & hypoxia condition.

### Proteome analysis

Four hundred and ninety one spots were detected in 2-DE gels (figure 5). In order to decipher the population dependent responses of flounder to a multi-stress condition, we compared 2-DE gels between conditions (i.e. control vs multistress) within each population. Fifty-three spots were found to be significantly differentially abundant ( $fdr < 0.1$  and  $fold > 1.5$ ) between the conditions. We also compared 2-DE gels between populations (grouping control and multistress conditions) to identify population specific spots. Fourteen spots were found to be significantly differentially abundant ( $fdr < 0.1$  and  $fold > 1.5$ ) between the populations.

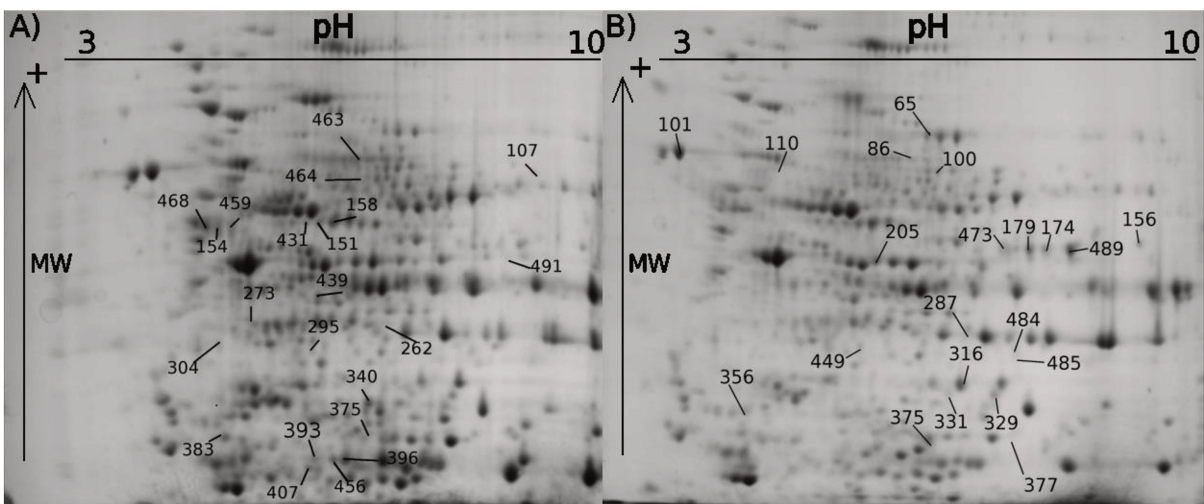


Figure 5: Representative 2-DE gels (pH 3-10) for *Platichthys flesus* liver (A: Canche individual in warm and hypoxia condition; B: Lima individual in cold condition). Numbers represent spots deregulated for at least one condition or population.

Among the 53 spots showing a differential expression, only 11 remained unidentified, the identification success being of 79%. This is much higher than previous works on the flounder, conducted on wild fish (Galland et al. 2013) and in an experimental chemical stress (Galland et al. 2015). Several spots from the present study appeared to be isoforms, which would artificially increase the identification success rate. We also suggest that the nature of the stressors has induced shifts in well conserved and described proteins (oxidative stress, energetic metabolism,...).

Network analysis was performed using the STRING program (Szklarczyk et al. 2015), using *Danio rerio* as model organism (Figure 6). In this analysis, 20 proteins displayed relationships. The overall results showed nodes around G6PD and PGAM1a, involving mainly carbon metabolism proteins (PGM1, PGAM1a, FBP1a, TKT), around AHCY (BHMT, GNMT) and an isolated group involving 3 proteasome proteins. These data helped to classify the identified proteins according to their putative functions, into 7 categories (Table 1, figures are available in table S1): Carbon and energy metabolism (6 proteins), oxidative stress (7 proteins), methionine metabolism (7 proteins), proteins intracellular fate (7 proteins), cell signaling (3), cytoskeleton (2) and others (8 proteins). In the following subsections, the different categories of detected proteins are discussed.

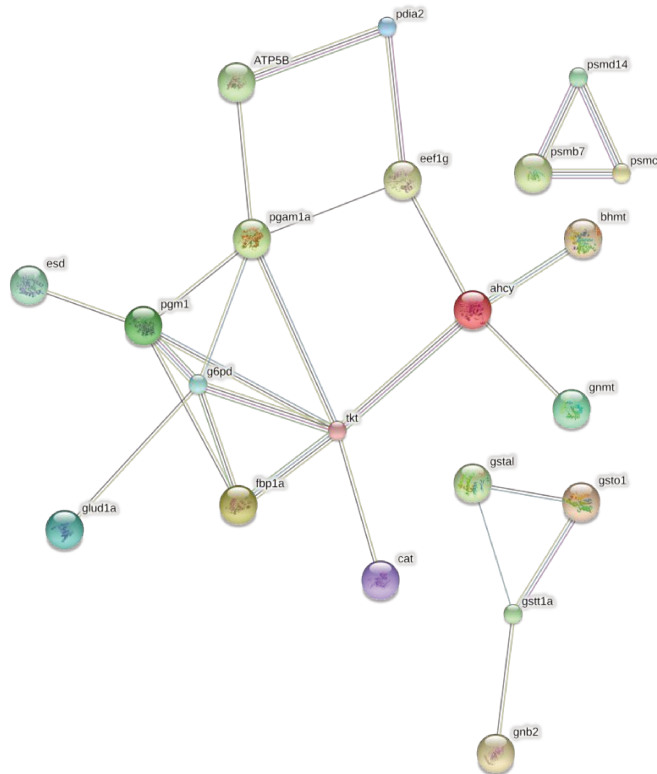


Figure 6. Network analysis of the proteins identified in this study. This network was built using STRING v. 10.0 ((Szklarczyk et al. 2015), according to known proteins interactions in the model organism *Danio rerio*.

## Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

Table 1: Proteins identified in this study. The selected protein spots displayed at least a 50% fold between either the two conditions for at least one population (Cdt), or between two populations (pop) or both. Score and % of coverage are given by the Mascot software. Var: type of detected variation: between populations (pop) or conditions (con). C, V and L columns give the fold between the cold condition and the warm and hypoxia condition for the Canche, Vilaine and Lima estuary respectively. Significant values are in bold numbers. C/V, C/L and V/L are the spot intensity ratios between estuaries.

Spot	Name/Short name		Score	%Cov	#	Var	C	V	L	C/V	C/L	V/L	GenBank
<b>Carbon/Energy metabolism</b>													
86	Phosphoglucomutase / pgm1	<i>Macaca fascicularis</i>	147	5.7	2	Cdt	1.5	0.9	<b>1.9</b>				gi 73621393
377	Phosphoglycerate mutase / pgam1a	<i>Bos taurus</i>	287	16	3	Cdt	1.8	1.6	<b>1.8</b>				gi 110287787
464	Glucose-6-Phosphate DH / g6pd	<i>Takifugu rubripes</i>	147	5.10	3	Pop				1	1.6	<b>1.7</b>	gi 1730176
65	Transketolase / tkt	<i>Platichthys flesus</i>	280	68.4	3	Cdt	<b>0.5</b>	1.2	0.7				gi 12311789
273	fructose-1,6-bisphosphatase / fbp1a	<i>Bos taurus</i>	64	3.3	1	Cdt	<b>1.6</b>	1.3	1.3				gi 110808224
468	ATP synthase subunit beta / atp5b	<i>Bos taurus</i>	275	11.3	4	Both	<b>1.7</b>	1.4	<b>1.8</b>	0.9	<b>0.4</b>	0.5	gi 114543
<b>Oxidative stress</b>													
463	Catalase / cat	<i>Sus scrofa</i>	277	11.4	4	Both	<b>0.4</b>	0.9	0.9	1.2	<b>2</b>	<b>1.5</b>	gi 84028183
393	glutathione S-transferase A / gsta1	<i>Pleuronectes platessa</i>	122	11.1	3	Cdt	<b>1.8</b>	1.3	1.5				gi 1165134
396	glutathione S-transferase A / gsta1	<i>Pleuronectes platessa</i>	61	7.7	1	Cdt	<b>2.1</b>	<b>1.5</b>	<b>2.3</b>				gi 1165134
340	Glutathione S-transferase omega-1 / gsto1	<i>Rattus rattus</i>	63	3.9	2	Cdt	<b>1.6</b>	1.2	<b>1.9</b>				gi 3868780
407	Glutathione S-transferase theta / gstt1a	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	62	3.6	2	Pop				<b>0.7</b>	0.9	1.2	gi 325111375
449	S-formyl-glutathione hydrolase-like / esd	<i>Oreochromis niloticus</i>	55	9.8	2	Pop				<b>0.7</b>	1	<b>1.4</b>	gi 348524078
<b>Methionine metabolism</b>													
431	Adenosyl homocysteinease / ahcy	<i>Mus musculus</i>	98	6.4	4	Cdt	<b>0.5</b>	<b>0.6</b>	0.7				gi 21431841
151	Adenosyl homocysteinease / ahcy	<i>Xenopus laevis</i>	230	9.2	5	Cdt	<b>0.5</b>	0.7	0.7				gi 6094224
158	Adenosyl homocysteinease / ahcy	<i>Rattus norvegicus</i>	256	4.3	3	Cdt	0.7	<b>0.6</b>	0.9				gi 134185
296	Glycine N-methyltransferase-like / gnmt	<i>Oreochromis niloticus</i>	108	11.9	3	Cdt	<b>0.5</b>	0.7	0.8				gi 348517536
489	Betaine-homocysteine methyl-transferase / bhmt	<i>Danio rerio</i>	122	8.2	2	Cdt	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>				gi 123916361
179	Betaine-homocysteine methyl-transferase / bhmt	<i>Platichthys flesus</i>	385	8.2	2	Cdt	<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>				gi 371901817
174	Betaine-homocysteine methyl-transferase/bhmt	<i>Platichthys flesus</i>	535	4.7	1	Cdt	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>				gi 371901817
<b>Proteins synthesis and degradation</b>													
295	26s Protease Regulatory subunit 14 / psmd14	<i>Homo sapiens</i>	70	12.4	3	Cdt	0.6	<b>0.5</b>	1				gi 51701716
459	26s Protease Regulatory subunit 6B / psmc6	<i>Bos taurus</i>	239	13.9	5	Cdt	<b>1.6</b>	<b>1.5</b>	<b>1.8</b>				gi 115311846
375	Proteasome subunit beta type-7 / psmb7	<i>Ictalurus furcatus</i>	141	8.6	4	Cdt	0.7	<b>0.5</b>	0.7				gi 308321337
459	26s Protease Regulatory subunit 6/ psmc6	<i>Homo sapiens</i>	70	13.9	5	Pop				1	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>	gi 51701716
156	Elongation factor 1-gamma / eef1g	<i>Danio rerio</i>	102	6.7	3	Cdt	<b>0.5</b>	0.9	0.5				gi 15583899
473	Elongation factor 1-gamma / eef1g	<i>Carassius auratus</i>	113	6.1	3	Cdt	<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>				gi 55583970
101	Protein disulfide-isomerase / pdia2	<i>Cricetulus griseus</i>	87	3.1	2	Cdt	1	<b>1.5</b>	1.1				gi 62287156
<b>Cell signaling</b>													
331	Guanine nucleotide-binding protein / gnb2	<i>Oreochromis niloticus</i>	243	18.5	5	Cdt	1.4	1.2	<b>1.9</b>				gi 3023850
329	Guanine nucleotide-binding protein / gnb2	<i>Oreochromis niloticus</i>	665	40.2	9	Cdt	<b>0.5</b>	<b>0.6</b>	0.6				gi 3023850
383	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	<i>Salmo salar</i>	128	8.1	2	Cdt	1.4	1.2	<b>1.9</b>				gi 209154488
<b>Cytoskeleton</b>													
110	Tubulin alpha-5 chain / tuba1	<i>Gallus gallus</i>	335	17.4	5	Pop				<b>1.8</b>	1.3	0.7	gi 135423
<b>Others</b>													
485	Annexin max3 / anxa3a	<i>Oryzias latipes</i>	62	7.1	2	Both	<b>0.6</b>	1	1.9	1	<b>0.6</b>	0.7	gi 157278387
107	Glutamate dehydrogenase / glud1a	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	554	22.4	1	Cdt	<b>0.5</b>	1	1				gi 13959323
287	pyrroline-5-carboxylate reductase / pycr1	<i>Mus musculus</i>	112	12.2	2	Cdt	0.5	0.9	<b>0.4</b>				gi 60390641
484	pyrroline-5-carboxylate reductase / pycr1	<i>Danio rerio</i>	64	9.8	2	Cdt	0.5	1	<b>0.4</b>				gi 41152299
491	glutaryl-CoA-dehydrogenase / gcodh	<i>Mus musculus</i>	47	2.0	1	Cdt	0.5	<b>0.4</b>	0.6				gi 341940732
356	Fatty acid-binding protein	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	58	16.1	2	Cdt	<b>2</b>	1	2				gi 2811080
262	Aflatoxin B1 aldehyde reductase / akr7a3	<i>Rattus norvegicus</i>	73	7.1	2	Cdt	0.6	<b>0.6</b>	1				gi 39930812
316	Urate oxidase, partial / uox	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	387	33.0	6	Cdt	<b>0.4</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>				gi 73915334
439	Phospho-triesterase-related protein / pter	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	103	9.6	3	Cdt	0.8	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>				gi 82257796
304	Deoxyribonuclease 1 / dnase1	<i>Bos taurus</i>	304	26.7	5	Cdt	0.6	0.7	<b>0.4</b>				gi 6015029

Energy metabolism

One of the most comprehensive physiological models that link bioenergetics mechanisms to response to stress is the oxygen-limited and capacity-limited thermal tolerance (OCLTT) concept (Pörtner, 2010). The performance failure of an organism at high temperature is thought to result from a mismatch between the demand for oxygen and the capacity of the heart to supply oxygen to tissues, which suggests that thermal tolerance and hypoxia tolerance might be functionally associated (Anttila et al. 2013). Results on the responses to high-temperature and hypoxia as interacting factors showed that tolerance to these stressors may be positively correlated in some fish species, and suggested a possible adaptive evolution in these traits in response to anthropogenic environmental change (Anttila et al. 2013). A recent study underlined that the thickness of the compact layer of the ventricle increased with the combination of warm and hypoxia acclimation in salmonids, but that the combination of stressors can have unexpected species-specific effects that will influence their survival capacity (Anttila et al. 2015).

If the interactive effects of multiple stressors under environmentally realistic scenarios are not yet fully understood, the concept of energy-limited tolerance to stress is a platform for integrating these effects on bioenergetics (Sokolova 2013) that should be detected in the proteome (Tomanek 2014). In the present study, animals subjected to heat and hypoxia showed an overall increase of proteins linked to energy production, with noteworthy differences according to the flounder populations (Table 1). Flounders from the northern Canche population exposed to multistress vs cold conditions showed mitigated signals regarding energy metabolism: one enzyme involved in the gluconeogenesis pathway (fructose-1,6-biphosphatase, spot 273) was more abundant. The same animals displayed a decrease in one enzyme from the pentose phosphate pathway (transketolase, spot 65) responsible of the reduction of NADP into NADPH, and at the same time an increase of the ATP synthase subunit beta (spot 468), ie a signal of an increased aerobic metabolism. Jiang et al. (2009) also observed a decrease in transketolase abundance at the protein level after a hypoxia in the Japanese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. This reduction of the pentose phosphate pathway reveals a probable decrease in nucleotide biosynthesis in order to save energy. We also suggest that, for the Canche population, the whole pentose shunt was globally reduced, so more resource was allocated to the ATP production.

Flounders from southern Lima vs northern Canche showed a higher increase in ATP synthase subunit beta abundance in multistress condition (Table 1). We suggest that this higher aerobic energetic metabolism of the Lima population could reflect its better ability to cope with the warm and hypoxia conditions. Furthermore, Lima fish exhibited an increase in phosphoglucomutase (spot 86),

one of the major enzymes of glycogenolysis, responsible for catalyzing the interconversion of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate and enabling glycogen stores to be utilized. A higher level of an enzyme of the glycolysis (phospho-glycerate mutase, spot 377) was also detected for the Lima fish under multistress.

#### Antioxidant defense

The acceleration of the aerobic metabolism usually results in an increased production of reactive oxygen species (ROS); however a proteomic analysis of cardiac response to a moderately high temperature acclimation in the goby showed no induction of the antioxidant metabolism despite a marked increase of the aerobic production of ATP (Jayasundara et al. 2015).

In the heat and hypoxia context of the present study, the antioxidant response of the Canche population is a mix of pro and cons signals (Table 1). The reduction of the pentose phosphate pathway impacts the pool of NADPH and thus the oxidative stress defense, by limiting the regeneration of GSSG into GST. Moreover, catalase (spot 463), another important antioxidant system, was also reduced in flounders from the Canche estuary in multistress condition. At the same time two spots identified as GST alpha (spot 393 and 396) were increased in multistress condition; it may be a way to counterbalance the effects of the diminution of the NADPH pool and catalase. Another protein associated with oxydative protection, Dehydroascorbate reductase (spot 340), which reduces dehydroascorbate to ascorbate with glutathione (GSH) as the electron donor, was also more abundant in multistress condition for flounder from Canche and Lima. Dehydroascorbate is the oxidized version of the vitamin C, which is associated with the oxidative protection of mitochondria (KC et al. 2005; Muñoz-Montesino et al. 2014).

Globally, the antioxidant responses were rather moderate in the flounder populations submitted to warm and hypoxia condition, a similar result being observed concerning the expression levels of antioxidant enzymes (SOD & GPX) which were moderately affected in brain and heart of flounder submitted to severe experimental hypoxia and summer moderate hypoxia in the field (Tiedke et al. 2014). On the other hand, in the context of the flounder exposition to a combination of pollutants, an activation of the antioxidant defense was clearly detected by a proteomic approach, showing a marked increase in catalase, glutathione peroxidase and glutathione methyl transferase (Galland et al. 2015).

#### Methionine metabolism

Enzymes from the methionine cycle were heavily down regulated in the multistress condition,

with remarkable differences between populations (Table 1). Three isoforms of S-adenosyl-homocysteinase (AHCY) were found with a reduced abundance in multistress condition, with one isoform (spot 431) reduced in the Canche and Vilaine population, one isoform only significantly reduced in Canche population (spot 151) and conversely another one (spot 156) only significantly reduced in Vilaine population. The Canche population also exhibits a reduced abundance of Glycine n-methyl transferase (GNMT, spot 296) in multistress condition. Finally three spots identified as Betaine homocysteine methyl-transferase (BHMT; spot 489,179,174) were strongly reduced in multistress condition, for all populations.

The methionine cycle involves three proteins: S-adenosyl-L-homocysteine is produced by GNMT from S-adenosyl-L-methionine and glycine, and is then converted to L-homocysteine and adenosine by AHCY; the produced homocysteine can then receive a methyl group from betaine with the help of BHMT, which produces dimethylglycine and methionine.

In the methionine cycle, methionine is then converted in adenosyl-L-methionine with methionine adenosyltransferase. The reduction of BHMT would mean less methionine is regenerated in the multistress condition and less S-adenosyl -L-methionine is consumed. It has been shown that induced inhibition of glutathione synthesis led to a diminution of adenosyl-L-methionine production (Corrales 1991) showing the link between the methionine cycle and the glutathione metabolism. In addition, a study on the goldfish from two contrasted environment showed a down-regulation of BHMT in the most warm and polluted site (Wang et al. 2008). The authors discussed the protein as related to the energy metabolism.

The role of methionine cycle is unclear and further specific experiments are needed. Nevertheless, it seems that the regulation of this cycle is either shared among the three populations (BHMT), relying on specific isoform (AHCY for Canche and Vilaine) or depending on specific enzymes (GNMT for Canche population).

#### Proteic turn-over & DNase

The spots linked to the lysis of peptides (Proteasomes), protein biosynthesis (Elongation factor) and DNase (Desoxyribo-nuclease) were generally less marked in the multistress condition in the three populations (table 1); these results confirmed that the warm and hypoxia condition could induce a significant slowing down of the molecular turnover.

Convergent results were obtained considering hypoxia-induced gene expression profiling in the fish *Gillichthys mirabilis* (Gracey et al. 2001), where the major energy-requiring processes like



protein synthesis were shut down, which may serve to divert important energy resources toward those metabolic processes more essential to cope with hypoxia.

#### Other proteins

Several other proteins were deregulated between the experimental conditions (Table 1). Two structural protein spots were detected (spot 110, Tubulin alpha-5 chain). Cytoskeletal proteins shifts usually correspond to a cytoskeletal reorganization linked to thermally contrasted environment (Buckley et al. 2006; Artigaud et al. 2015). As these proteins are usually very well identified, we suggest that the cytoskeletal structure of the flounder liver is barely impacted by the warm and hypoxia challenge.

The two spots of the Guanine nucleotide-binding protein (or G-protein) were less marked in warm and hypoxia condition only for the northern populations. G-proteins, and their cell membrane receptors (G-protein-coupled receptors, GPCRs) are the largest superfamily of receptors for signaling molecules (ligands) (Pin et al. 2003; Im 2013). The ligands are various existing metabolites: peptides, Ca<sup>2+</sup>, amino-acids like glutamate for a specific sub-family of GPCRs. Furthermore, guanine nucleotide binding protein was involved in the guinea pig heart cellular responses to hypoxia (Xu et al. 1993).

Fatty acid-binding proteins (FABP) are a family of transport protein for fatty acids. FABP4 is considered as a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia (Hu et al. 2015); FABP being regulated by hypoxia inducible factors in the placenta (Jadoon et al. 2015). Furthermore, in vitro experiments underlined that the induction of FABP could reduce oxidative stress in mice renal cells exposed to hypoxia (Yamamoto et al. 2007). In our study, we have detected a higher FABP signal for the northern Canche fish in warm and hypoxic condition, no significant change being observed in the other populations. We suggest that this pattern is possibly linked to a higher sensibility of the northern population to multistress, displaying a different capacity (1) to hydrolyse triacylglycerides and thus to produce glycerol and fatty acids, and/or (2) to transport and metabolize them; this hypoxia-induced mobilization of triglycerides being observed in *G. mirabilis* (Gracey et al. 2011).

The glutamate dehydrogenase (GDH) is an important fish amino-acid metabolizing enzyme, involved in cold adaptation, whose activity is modulated by aerobic vs anaerobic conditions (Ciardiello et al. 2000; Sánchez-Muros et al 1998; Van Waarde 1983). In the present study, GDH was only down regulated in warm and hypoxia condition in the northern Canche population,

suggesting that the amino-acid catabolism could be less efficient to produce metabolites that can serve for example as carbon skeletons for gluconeogenesis in fish submitted to hypoxia (Gracey et al. 2001).

Spot differentially expressed between populations (on both conditions)

Fourteen spots were differentially detected between populations on both conditions, and eight were identified (Table 2). A higher ATP synthase subunit beta signal was clearly detected in the Lima fish. Thus the liver aerobic ATP production, at the mitochondrial phosphorylation chain level, is apparently more efficient in the southern Portuguese Lima populations vs the northern France populations (Canche and Vilaine), whatever the considered conditions (cold / warm and hypoxia condition). This result confirms the contrasted patterns in bioenergetics observed in fish populations over latitudinal clines (Oleksiak et al. 2005; Sylvestre et al. 2007; Fangué et al. 2009; Dhillon and Schulte 2011).

The Lima fish were also different from northern fish, in regard to two proteins (Table 2): one protease sub-unit 6 and G6PDH. The higher level of the protease in the Southern population cannot be analysed because the proteasome complex is composed of numerous subunits, making interpretation of changes in expression of a subunit difficult; further research will be necessary to better understand tissue-specific protein biosynthesis and degradation with temperature and/or hypoxia acclimation (Jayasundara et al. 2015). On the other hand, a reduced G6PDH spot was observed in southern vs northern populations. G6PDH is involved in the pentose phosphate pathway shunt and could be considered as a marker of fish anabolism (Gauthier et al. 2011, Grasset et al. 2014); its reduced level in the South is coherent with the general reduction of standard metabolic rate of fish populations observed along decreasing latitudes (Sylvestre et al. 2007; Arnott et al. 2006, Pörtner et al. 2010). Furthermore, G6PDH displayed adaptive pattern of variations among *Fundulus heteroclitus* populations, its liver expression level significantly regressing with temperature (Whitehead and Crawford 2006).

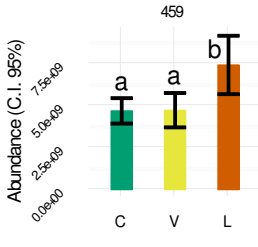
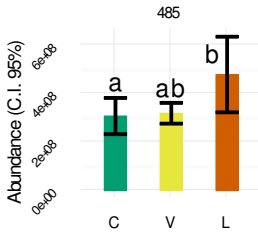
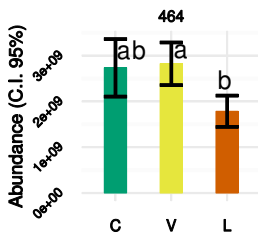
Two spots are over-expressed in Vilaine vs Canche-Lima fish for S-formyl-glutathione hydrolase-like and glutathione S-transferase theta. The former enzyme produces glutathione which is involved in the response to oxidative stress, and is conjugated with xenobiotics by the latter enzyme, during the detoxification process. We suggest that the specific environmental context of the Vilaine estuary (pollution by pesticides and summer hypoxia) (Laroche et al. 2013) could induce a selective pressure on its flounder population, impacting the basal levels of cellular protection and detoxification.



Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

Table 2: Name and abundance of the detected spots. The listed spots display a x1.5 fold increase between at least two populations (different letters)

Proteins	Spot	Spot intensities
ATP synthase subunit beta	468	<p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>1.5e+10 1.0e+10 5.0e+09 0.0e+00</p> <p>a a b</p> <p>c v l</p>
s-formyl-glutathione hydrolase-like	449	<p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>6e+08 4e+08 2e+08 0e+00</p> <p>b a b</p> <p>c v l</p>
Glutathione s-transferase theta	407	<p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>4e+08 3e+08 2e+08 1e+08 0e+00</p> <p>a b ab</p> <p>c v l</p>
Catalase	463	<p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>5e+08 4e+08 3e+08 2e+08 1e+08 0e+00</p> <p>a a b</p> <p>c v l</p>
Tubulin alpha-5 chain	110	<p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>6e+08 4e+08 2e+08 0e+00</p> <p>a b ab</p> <p>c v l</p>

26s Protease Regulatory subunit6	459	 <p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>7.5e+09 5.0e+09 2.5e+09 0.0e+00</p> <p>459</p> <p>a a bT</p> <p>C V L</p>
Annexin max3	485	 <p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>6e+08 4e+08 2e+08 0e+00</p> <p>485</p> <p>a ab b</p> <p>C V L</p>
G6PDH	464	 <p>Abundance (C.I. 95%)</p> <p>3e+09 2e+09 1e+09 0e+00</p> <p>464</p> <p>ab a b</p> <p>C V L</p>

## Conclusion

Even with very selective analyses, e.g. by only considering spots with a high fold between experimental conditions, the interpretation and understanding of discrepancies between the proteomes remain complex. However, multiple trends observed between experimental conditions and populations make sense, in regard of (1) the environmental condition of flounder populations in the field, and of (2) the genetic differentiation observed between these populations, suggesting possible local adaptation for pattern of variation in liver enzyme levels. Several differential spots linked to energy metabolism were detected. Multiple enzymes related to methionine metabolism, transport protein for fatty acids, amino-acid metabolism, and pentose phosphate pathway shunt showed differential expression between northern vs southern populations. As our main concern is on the impact of climate change on the bioenergetics of the flounder populations, investigations are currently carried out to detect changes in the enzymatic activity of several key proteins, to better understand the differences observed in the HSI, and to explore possible variations in lipids considering the reserves and the membrane composition.

This work was supported by the ANR program VMCS-EVOLFISH (Paris) and the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19).

## Bibliography

- Amara R, Meziane T, Gilliers C, Hermel G, Laffargue P (2007) Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series*, **351**: 201-208.
- Amara R, Selleslagh J, Billon G, Minier C (2009) Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*, **627**: 87-98.
- Anttila K, Dhillon RS, Boulding EG et al. (2013) Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *Journal of experimental biology*, **216**: 1183-1190.
- Anttila K, Lewis M, Prokkola JM, Kanerva M, Seppänen E, Kolari I, Nikinmaa M (2015) Warm acclimation and oxygen depletion induce species-specific responses in salmonids. *Journal of Experimental Biology*, **218**: 1471-1477.
- Arnott SA, Chiba S, Conover DO (2006) Evolution of intrinsic growth rate: metabolic costs drive trade-offs between growth and swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution*, **60**(6): 1269-1278.
- Artigaud S, Lacroix C, Richard J et al. (2015) Proteomic responses to hypoxia at different temperatures in the great scallop (*Pecten maximus*). *PeerJ*, **3** : e871.
- Artigaud S, Lavaud R, Thébault J et al. (2014) Proteomic-based comparison between populations of the Great Scallop, *Pecten maximus*. *Journal of proteomics*, **105**: 164-73.
- Artigaud, S., Gauthier, O. & Pichereau, V. (2013) Identifying differentially expressed proteins in two-dimensional electrophoresis experiments: inputs from transcriptomics statistical tools. *Bioinformatics*, **29**(21): 2729-2734.
- Attrill MJ, Power M (2004) Partitioning of temperature resources amongst an estuarine fish assemblage. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **61**(4): 725-738.
- Baumann H, Conover DO (2011) Adaptation to climate change: contrasting patterns of thermal-reaction-norm evolution in Pacific versus Atlantic silversides. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **278**: 2265-73.
- Benjamini Y, hochberg Y (1995) controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**: 289-300.
- Buckley BA, Gracey AY, Somero GN (2006) The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. *The Journal of experimental biology*, **209**: 2660-77.
- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser*, **472**: 257-273.
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, **47**: 775-787.
- Ciardiello MA, Camardella L, Carratore V, di Prisco G (2000) L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic

fish *Chaenocephalus aceratus*: Primary structure, function and thermodynamic characterization: relationship with cold adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1543**(1): 11-23

- Corrales F (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the liver leads to S-adenosyl-methionine synthetase reduction. *Hepatology*, **14**: 528-533.
- Dando PR (2011) Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series*, **430**: 183-196.
- Dhillon RS, Schulte PM (2011) Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *Journal of Experimental Biology*, **214**: 3639-3648.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V et al. (2015) Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine pollution bulletin*, **95**: 634-45.
- Fangue NA, Richards JG, Schulte PM (2009) Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, **212**: 514-522.
- Galland C, Dupuy C, Capitaine C et al. (2013) Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research*, **75**: 135-141.
- Galland C, Dupuy C, Loizeau V et al. (2015) Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Marine pollution bulletin*, **95**: 646-57.
- Gauthier C, Campbell PGC, Couture P (2011) Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, **30**: 2148-56.
- Gillanders BM, Elsdon TS, Halliday IA, Jenkins GP, Robins JB, Valesini FJ (2011) Potential effects of climate change on Australian estuaries and fish utilizing estuaries: a review. *Marine and Freshwater Research*, **62**: 115-1131.
- Gonzalez EG, Krey G, Espiñeira M, Diez A, Puyet A, Bautista JM (2010) Population proteomics of the European Hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Proteome Research*, **9**: 6392-404.
- Gracey AY, Lee T, Higashi RM, Fan T (2011) Hypoxia-induced mobilization of stored triglycerides in the euryoxic goby *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*, **214**: 3005-3012.
- Gracey AY, Troll JV, Somero GN (2001) Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(4): 1993-1998.
- Grasset J, Bougas B, Campbell PGC et al. (2014) Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **71**: 1635-1641.
- Harrald M, Wright PJ, Neat FC (2010) Substock variation in reproductive traits in North Sea cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **67**: 866-876
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Frydenberg J, Loeschcke V (2007) Adaptive divergence in a high gene flow environment: Hsc70 variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity*, **99**: 592-600.
- Hu B, Guo y, Garbacz WG, Jiang M, Xu M, Huang H, Tsung A, Billiar TR, Ramakrishnan SK, Shah YM,

- Lam KS, Huang M, Xie W (2015) Fatty acids binding protein-4 (FABP4) is a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology*, **63**(4): 855-862.
- Im DS (2013) Intercellular Lipid Mediators and GPCR Drug Discovery. *Biomolecules & therapeutics*, **21**: 411-22.
- Jadoon A, Cunningham P, McDermott LC (2015) Regulation of fatty acid binding proteins by hypoxia inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  in the placenta: relevance to pre-eclampsia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **93**: 25-29
- Jayasundara N, Tomanek L, Dowd WW, Somero GN (2015) Proteomic analysis of cardiac response to thermal acclimation in the eurythermal goby fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of experimental biology*, **218**: 1359-72.
- Jiang H, Li F, Xie Y et al. (2009) Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics*, **9**: 3353-67.
- KC S, Cárcamo JM, Golde DW (2005) Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**: 1657-67.
- Kerambrun E, Henry F, Cornille V, Courcot L, Amara R (2013) A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, **91**: 498-505.
- Kwasek K, Terova G, Lee B-J et al. (2014) Dietary methionine supplementation alters the expression of genes involved in methionine metabolism in salmonids. *Aquaculture*, **433**: 223-228.
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**: 738-748.
- Larsen PF, Nielsen EE, Hansen MM, Wang T, Meier K, Pertoldi C, Loeschcke V (2013) Tissue specific haemoglobin gene expression suggests adaptation to local marine conditions in North Sea flounder (*Platichthys flesus* L.). *Genes Genom*, **35**: 541-547.
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, Claireaux G, Mazurais D, Zambonino-Infante J, Le Bayon N, Cahu C, Laroche J (2015) Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Marine Pollution Bulletin*, **95**: 658-664.
- Martinho F, Leitao R, Neto JM, Cabral HN, Marques JC, Pardal MA (2007) The use of nursery areas by juvenile fish in a temperate estuary, Portugal. *Hydrobiologia*, **587**: 281-290.
- McBryan TL, Anttila K, Healy TM, Schulte PM (2013) Responses to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. *Integrative and Comparative Biology*, **53**(4): 648- 659.
- Menesguen A, Aminot A, Belin C, Chapelle A, Guillaud JF, Joanny M, Lefebvre A, Merceron M, Piriou JY, Souchu P (2001). L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la Commission Européenne e DG.ENV.B1, 59 pp.

- Muñoz-Montesino C, Roa FJ, Peña E et al. (2014) Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free radical biology & medicine*, **70**: 241-54.
- Oleksiak MF, Roach JL, Crawford DL (2005) Natural variation in cardiac metabolism and gene expression in *Fundulus heteroclitus*. *Nature Genetics*, **37**(1): 67-72.
- Pin J-P, Galvez T, Prézeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, **98**: 325-354.
- Pörtner H. (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **132**: 739-761.
- Pörtner HO (2010) Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor affects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 881-893.
- Pörtner HO, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, **315**: 95-7
- Pörtner HO, Schulte PM, Wood CM, Schiemer F (2010) Niche dimensions in Fishes: an integrative view. *Physiological and Biochemical Zoology*, **83**(5): 808-826
- Rabalais NN, Turner RE, Diaz RJ, Justic D (2009) Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, **66**: 1528-1537
- Reygondeau G, Beaugrand G (2011) Future climate-driven shifts in distribution of *Calanus finmarchicus*. *Global Change Biology*, **17**: 756-766.
- Roessig JM, Woodley CM, Cech JJ, Hansen LJ (2005) Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **14**: 251-275.
- Ruggeri P, Splendiani A, Giovannotti M et al. (2015) The role of life-history traits, selective pressure and hydrographic boundaries in shaping the genetic structure of the transparent goby, *Aphia minuta*. *Marine Ecology*, **37**: 518-531
- Sánchez-Muros M, García-Rejón L, García-Salguero L, de laHiguera M, Lupiáñez A (1998) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout - Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **30**(1): 55-63.
- Scavia D, Field JC, Boesch DF et al. (2002) Climate change impacts on U.S. Coastal and Marine Ecosystems. *Estuaries*, **25**: 149-164.
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, **3**, Article3.
- Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, **53**: 597-608.
- Sylvestre E, Lapointe D, Dutil JD, Guderley H (2007) Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Comparative Physiology b*, **177**: 447-460.

- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**:D447-52.
- Tiedke J, Borner J, Beeck H et al. (2015) Evaluating the Hypoxia Response of Ruffe and Flounder Gills by a Combined Proteome and Transcriptome Approach. *PLoS one*, **10**: e0135911.
- Tomanek L (2014) Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *Journal of proteomics*, **105**: 92-106.
- Van Waarde A (1983) Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **74**(4): 675-684.
- Wang J, Wei Y, Wang D, Chan LL, Dai J (2008) Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Ecotoxicology (London, England)*, **17**: 213-20.
- Whitehead A, Crawford DL (2006) Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 5425-30.
- Xu J, Tong H, Wang L, Hurt CM, Pelleg A (1993) Endogenous adenosine, A1 adenosine receptor, and pertussis toxin sensitive guanine nucleotide binding protein mediate hypoxia induced AV nodal conduction block in guinea pig heart in vivo. *Cardio Vascular Research*, **27**: 134-140.
- Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura, T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T (2007). Renal L-type fatty Acid-Binding Protein in acute ischemic injury. *Journal of American Society for Nephrology*, **18**: 2894-2902.
- Zheng J-L, Luo Z, Liu C-X et al. (2013) Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **132-133**: 173-81.

Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

**Additional data**

Table S1: Name and abundance of the detected spots. The listed spots displayed have a x1.5 fold between two conditions for at least one population

Name/ Short name	Spot		Score	Genbank	
Energy metabolism					
Phosphoglucomutase	86	Macaca fascicularis	147,10	GI 73621393	
Phospho-glycerate mutase	377	Bos taurus	287,36	GI 110287787	
Fructose-1,6-bisphosphatase	273	Bos taurus	64,76	GI 110808224	
ATP synthase subunit beta	468	Bos taurus	275,15	GI 114543	
Pentose phosphate pathway					
Transketolase	65	Platichthys flesus	280,57	gi 12311789	
Oxydative stress protection					
Glutathione S-transferase A	393	Pleuronectes platessa	122,47	gi 1165134	
	396	Pleuronectes platessa	61,08	gi 1165134	
Catalase	463	Sus scrofa	277,95	GI 84028183	



## Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

Glutathione-dependent dehydro-ascorbate reductase	340	Rattus rattus	63,08	gij3868780	
Methionine metabolism					
Adenosyl homocysteinase	431	Mus musculus	98,11	Gij21431841	
	151	Xenopus laevis	230,65	Gij6094224	
	158	Rattus norvegicus	256,02	Gij134185	
Glycine n-methyltransferase-like	296	Oreochromis niloticus	108,47	gij348517536	
Betaïne-homocystéine methyl-transférase	489	Danio rerio	122,40	Gij123916361	
	179	Platicthys flesus	385,39	gij371901817	
	174	Platicthys flesus	535,00	gij371901817	
Protein turn-over					
26s Protease Regulatory subunit6	295	Homo sapiens	70,49	Gij51701716	
	459	Bos taurus	239,98	Gij115311846	
Proteasome subunit beta type-7	375	Ictalurus furcatus	141,13	gij308321337	

## Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

Elongation factor 1-gamma	156	Danio rerio	102,41	GII55583 899	
	473	Carassius auratus	113,18	GII55583 970	
Deoxyribo-nuclease	304	Bos taurus	304,07	GII60150 29	
Chaperoninnes					
Protein disulfide-isomerase	101	Cricetulus griseus	87,24	GII62287 156	
Others					
Guanine nucleotide-binding protein	331	Oreochromis niloticus	243,97	GII3023850	
	329	Oreochromis niloticus	665,65	GII3023850	
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	383	Salmo salar	128,33	gij209154488	
Aflatoxin B1 aldehyde reductase	262	Rattus norvegicus	73,77	GII39930 812	
Annexin max3	485	Oryzias latipes	62,50	gij157278 387	

## Chapitre IV : Approches moléculaires en common garden

Fatty acid-binding protein	356	Oncorhynchus mykiss	58,02	GI 28110 80	
Glutamate dehydrogenase	107	Chaenocephalus aceratus	554,56	GI 13959 323	
Phospho-triesterase-related protein	439	Tetraodon nigroviridis	103,19	GI 82257 796	
Urateoxidase, partial	316	Hippoglossus hippoglossus	387,85	gi 739153 34	
Glutaryl-coa-dehydrogenase	491	Mus musculus	47,29	GI 34194 0732	
Pyrroline-5-carboxylate reductase	287	Mus musculus	112,13	GI 60390 641	
	484	Danio rerio	64,28	gi 411522 99	

## Chapitre V : Normes de réaction sur les traits d'histoire de vie de stades précoces de flet



## Résumé du chapitre

### Introduction

Dans le précédent chapitre, nous avons détecté des performances différentielles de flets juvéniles (collectés in natura, et challengés dans une expérience de common garden) qui pourraient refléter une adaptation locale au sein des populations naturelles. Notons cependant que cette approche ne peut prendre en compte la variation des traits biologiques entre ces populations, potentiellement due à la plasticité phénotypique induite avant le prélèvement in natura (ie liée aux effets maternels, aux modifications épigénétiques et/ou aux effets physiologiques en réponse à l'environnement prénatal).

Nous allons présenter ici un dernier travail sur la production de larves F1 à partir de flets adultes capturés in natura dans des environnements contrastés au Portugal et en France, visant à mieux contrôler la plasticité phénotypique des jeunes stades et à évaluer la différenciation adaptative potentielle entre les populations. L'objectif principal de cette étude a été de mesurer les normes de réaction des traits de vie de larves de flet sur une gamme de température observée dans la nature (de la Manche au Portugal), et de tester si chaque population est plus performante dans la température expérimentée dans son environnement naturel.

Des flets adultes d'une taille supérieure à 25cm, (âge estimé de 2 à 3 ans), ont été prélevés à la fin de l'automne dans les trois mêmes populations que dans le chapitre précédent (Boulogne, Vilaine, Lima). Ces géniteurs ont été acclimatés au laboratoire, puis les femelles ont subi un stripping sanitaire régulier dès que cela était physiologiquement possible. Lorsque suffisamment de femelles (5 à 7) sont devenues matures, une fécondation contrôlée a été effectuée. Les embryons de chaque population ont subi un challenge expérimental à quatre températures proches de celles rencontrés en mer en hiver, et plusieurs traits d'histoire de vie ont été mesurés : la taille à l'éclosion et à l'ouverture de la bouche, le nombre de degré-jour pour atteindre ces stades ainsi que la taille du vitellus à l'ouverture de la bouche.

### Résultats et discussion

Une différence significative a été observée dans la taille moyenne des oocytes entre les populations. Cette différenciation peut être imputée à une variation adaptative de l'acquisition et de l'allocation d'énergie entre les populations (Billerbeck et al. 2000). Les analyses ont permis de détecter une interaction « origine x température » pour différents traits de vie : la taille à l'éclosion et la taille du vitellus résiduel, à l'ouverture de la bouche. Pour les degrés-jours requis pour atteindre l'éclosion et l'ouverture de la bouche, des effets température et populations (respectivement) ont été détectés. Dans l'ensemble, l'influence de facteurs génétiques a été significative pour de nombreux

traits, et des signes d'adaptation locale (interaction population x température) sont clairement apparus (Jensen et al. 2008, Whitney et al. 2013). Les normes de réaction à l'éclosion semblent assez explicites, avec un optimum de taille pour Lima à une température comprise entre 10 °C 12°C, alors que l'optimum de croissance pour les populations françaises semble inférieur à 10 °C.

Cette étude vient étayer notre hypothèse sur les possibles adaptations locales des populations de flet vis à vis de leur environnement thermique spécifique. Toutefois, ces résultats sont à considérer avec précaution, car la mortalité a été très forte dans toutes les conditions et pour toutes les populations, et on ne peut écarter le fait qu'une mortalité différentielle puisse s'exprimer sur les larves en fonction de leur vitesse de croissance, ce qui pourrait biaiser nos analyses de manière significative.

De nouvelles explorations sur les normes de réaction thermiques des jeunes stades de flet doivent être maintenant menées en considérant une gamme de température plus large (7°C à 15°C), plus représentative de ce qui est observé in natura, en menant des explorations jusqu'à un stade plus avancé (juvénile à la métamorphose), ce qui permettrait d'élargir considérablement le nombre de traits de vie à explorer. Nous suggérons qu'il serait aussi d'un intérêt majeur de mener des explorations sur l'impact de la température environnementale sur la phénologie de la reproduction, sur de possibles altérations de la maturation sexuelle chez les flets adultes, et enfin sur leur fertilité.

## Thermal reaction norms in European flounder life history traits: variations along a latitudinal cline

Nicolas Pédrón <sup>1,2</sup>, Elodie Borcier <sup>1</sup>, Marie Cachera <sup>1</sup>, José-Luis Zambonino-Infante <sup>1,2</sup>, Nicolas Le Bayon <sup>1,2</sup>, Rita Pina Vasconcelos <sup>3</sup>, Vanessa Fonseca <sup>3</sup>, Grégory Charrier <sup>1</sup>, Jean Laroche <sup>1</sup>

(1) Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer IUEM, Plouzané, France

(2) Ifremer, Laboratoire Adaptation, Reproduction et Nutrition des Poissons ARN, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins PFOM, Plouzané, France

(3) MARE, Marine and Environmental Sciences Centre, Faculty of Sciences of Lisbon, Portugal

**In prep for Journal of Fish Biology**

### Abstract

Current trends in climate change have a detrimental impact on many ectothermic species. Fish populations are differently exposed to warming waters and some are pushed near the limits of their thermal tolerance. The European flounder is a coastal flatfish displaying a significant genetic differentiation between southern peripheral Portuguese populations and northern central populations in France. Furthermore, a phenotypic differentiation was also detected between the two lineages, the southern populations showing a slower metabolism and a reduced protein turnover. In the present study, in a common garden experiment, we have compared the performances of embryos stemming from Portuguese and French flounder populations, at four rearing temperatures corresponding to the thermal gradient observed in the field. Timing and size at the hatching and mouth opening stages were monitored, as well as the vitellus size. A temperature effect was detected for the amount of ATU (accumulated thermal units) to hatch, and a population effect was detected for the amount of ATU to mouth opening stage. Origin-by-temperature interaction effects were detected for size at hatching stage and yolk volume at mouth opening stage, but not for size at mouth opening. This study suggests a local adaptation of the flounder populations to their thermal environments.

**Keywords** : reaction norms, thermal stress, local adaptation, phenotypic plasticity, climate change



## Introduction

The European flounder (*Platichthys flesus*) is a northern temperate catadromous flatfish living in coastal systems of the North East Atlantic, from Norway to Portugal. This species is considered as a pertinent sentinel of estuarine water quality (Kerambrun et al. 2013; Dupuy et al. 2015; Lavergne et al. 2015). In the current context of global change, several studies showed that the abundance of *P. flesus* decreases significantly in warmer environments, particularly in the Bay of Biscay and Gironde estuary (Hermant et al. 2010; Chaalali et al. 2013), and in the South margin of its distribution area in Portugal (Cabral et al. 2001).

There are also evidences that warm winters delayed *P. flesus* adults migration for reproduction; the following juvenile recruitment in estuaries being reduced in these conditions compared to cooler winters (Attrill and Power 2002; Parmesan 2006). Thus we suggest that this reproduction cycle alteration and the reduced recruitment success of European flounder could be the consequences of global warming.

The temperature shift in terms of timing and order of magnitude, are likely to cause disturbances during the ontogeny of the early-life stages (embryos, larvae) of ectotherms, that usually possess the narrowest thermal tolerance window during ontogenic development (Byrne 2011; Rijnsdorp et al. 2009; Pörtner and Peck 2010). Furthermore, modifications of phenology, e.g. by reproduction at the optimal time of year, are considered major events for potential acclimation or adaptation of populations to climate change (Bradshaw and Holzapfel 2008; Genner et al. 2009).

A significant genetic differentiation was detected between French and Portuguese European flounder populations, suggesting that two lineages (Iberian Peninsula vs France) may have evolved separately, in contrasted environments (Calvès et al. 2013). The highest amplitude of the sea surface temperature (SST) monitored close to the estuaries was observed at the level of French estuaries (for Canche and Vilaine systems, respectively ranging from 7°C to 17°C and from 9°C to 18°C); while a reduced SST amplitude was detected near the Lima estuary in Portugal, ranging from 13°C to 18.5°C (OSPAR Commission 2000, Martinho et al. 2013; data extracted from : <http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni> specifically from satellite MODIS-Aqua 4km). Furthermore, a preliminary survey conducted on this thermal cline (from English Channel to Portugal) underlined a general reduction of energetic metabolism and protein synthesis in Portuguese vs French flounder populations (Calvès 2011). The previous elements suggested that differential thermal performances are detected between early life stages of flounder populations over the latitudinal cline: France-Portugal. Numerous studies have provided evidence of a genetic basis explaining the differences of thermal reaction norms between fish populations, thus reflecting adaptive responses to contrasted environments (Hutchings et al. 2007, Jensen et al. 2008, Baumann and Conover 2011; Hutchings 2011).

In the present study, we hypothesized that European flounder populations could be locally

adapted to their thermal environments. We sampled adult flounders from three populations (Boulogne-sur-mer and Vilaine in France, Lima in Portugal) and produced a F1 progeny per population in the laboratory. We tested population differences in early-life history traits, performing common-garden experiments at four temperatures (8, 10, 12 and 14°C), corresponding to the thermal gradient met by the flounder larvae in winter, from the English Channel Sea to Portugal. We analysed several life history traits to explore if each population did best at the temperature experienced in nature.

## Materials and methods

### Catch and rearing

In November and December 2014, adult flounders (total length > 25 cm) were collected by beam trawl before the beginning of their spawning migration (Summers 1979), at three localities: the continental shelf of Boulogne-sur-mer (50°40'N 1°31'E) and the Vilaine estuary (47°30'N 2°29'W) in France, the Lima estuary in Portugal (41°40'N 8°51'W) (Fig. 1).

Adult flounders were transported by road to Ifremer rearing facilities in Plouzané (France) and acclimated in three separated 500 L tanks to local marine waters (ranging from 9.5°C to 11°C between December and February, with an average salinity of 34 PSU). Fish were progressively fed, starting with nereids and progressively switching to a mix of frozen mussels and food pellets (50:50). In February, ripe females were manually stripped every week. As soon as enough females from a population were ripe, an experiment was started (Vilaine: March 27<sup>th</sup>; Lima: April 10<sup>th</sup>; Boulogne-sur-mer: April 24<sup>th</sup>). The amount of fish involved in the crossing experiment was: six females and six males for Boulogne-sur-mer, seven females and six males for Vilaine, and five females and six males for Lima. Oocytes and sperm from each flounder were divided so that a full factorial crossing experiment could be performed; ie a North Carolina design II (Lynch and Walsh 1998).



Figure 1: Map of the sampling locations.

Fertilized eggs were incubated 45 min, then pooled. About 5000 eggs were distributed in twelve 35 L tanks (four conditions: 8°C, 10°C, 12°C, 14°C in triplicate). Temperature was monitored all along the experiment. Dead embryos and larvae were removed twice a day until the end of the experiment. The larvae were sampled at two points: (1) when each tank reached 50% hatching (Fig. 2), 50 hatchlings were collected and fixed in a formaldehyde saline solution (for one liter: 108 ml formaldehyde 37%, 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 892 ml deionized water); (2) when the larvae in a tank reached 50 % “mouth opening”, all the remaining larvae were fixed. The formaldehyde solution was renewed after less than 12 hours, and size measurements were conducted between three and five days after the sampling.

### Data acquisition

Viable oocytes were obtained for each female by gently mixing them with clean sea water, then immediately sampling 30 floating (viable) eggs and store them in a large volume of formaldehyde solution. Oocytes were measured under a microscope.

Individual larvae size of *P. flesus*, for both stages, was measured as the distance between landmarks 1 and 2 (Fig 2). Yolk volume was estimated using landmarks 3 to 6. The distance between landmarks 3 and 4 was assessed as the equatorial distance, while the distance between landmarks 5 and 6 was assessed as the polar distance, in the ellipsoid of revolution’s volume formulae (Blaxter & Hempel 1963) , such as:

$$vol = \frac{4}{3} * \pi * polar\ distance * equatorial\ distance^2$$

All measurements were standardized for microscope magnification.

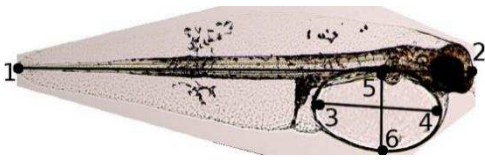


Figure 2. Newly hatched larva of *P. flesus*, annotated with the six measured landmarks

### Statistical analyses

First, oocytes sizes between populations were compared with pairwise t-tests. Then, the timing, in degree day, needed to reach each stage (hatching and mouth opening) was compared between populations and between temperatures by a Kruskal-Wallis test. Finally, morphological measurements were compared between populations and thermal conditions. Two-way ANOVAs were performed to test for differences between sizes at hatching, sizes at mouth opening, vitellus at mouth-opening, such as :

$$\text{Measurement} \sim \text{Population} * \text{Temperature}$$

We performed a two-way ANOVA without replication to test for a temperature effect and/or a population effect at both stages. Post-hoc pairwise t-tests were realised to assess differences within and between populations for each temperature for these traits. For each set of tests, a Holm's correction was applied to P-values.

## Results

### Oocyte size

Oocytes were significantly bigger in Boulogne-sur-mer, the northernmost population (mean  $\pm$ sem :  $0.81 \pm 0.02$ mm) in comparison with the Vilaine ( $t=2.736$  ;  $p < 0.01$  ) and Lima ( $t=2.847$  ;  $p < 0.01$  ) populations (respectively  $0.70 \pm 0.04$  mm and  $0.71 \pm 0.02$ mm).

### Timing

The time to reach the hatching stage was significantly different between temperatures, but not between populations (respectively P-value = 0.030 and 0.467,). The mouth opening stage exhibited the inverse pattern, with a significant difference between populations, but not between temperatures (respectively P-value = 0.041 and 0.935,). Among all three populations, the amount of degree-days needed to reach hatching decreased with higher temperatures, particularly for Boulogne (Table 1a). For the mouth-opening stage, a clear differentiation was observed between Boulogne and Lima populations; the former population needed more degree-days to reach this stage (Table 1b).

Table 1. Value in degree-days to reach the two stages, for each population of *P. flesus*, at the four experimental temperatures (NA = Non Available)

<b>a) Hatching</b>	8	10	12	14
Boulogne	62.3	52.5	48	45.5
Vilaine	48.7	49.2	44	43.7
Lima	55.7	49.6	45.5	43.2

<b>b) Mouth opening</b>	8	10	12	14
Boulogne	87.6	88.75	87	87.5
Vilaine	NA	87.1	80	81.1
Lima	79	78.8	81.5	81.7

### Larval sizes

Two way ANOVAs on larval sizes at both stages and remaining vitellus at mouth opening are described in Table 2.

First, mean sizes at the hatching stage appeared significantly different between populations and between temperatures, as well as for the interaction between these two variables (Table 2, Fig. 3a). Post-hoc t-tests allowed to precise that all mean larval sizes were different between the three populations at 8°C and 14°C. At 10°C and 12°C, the Boulogne population was significantly different from the other two populations, while the Lima and Vilaine populations did not appear significantly different in mean sizes (Fig. 3a).

Mean sizes at the stage of opening mouth were also significantly different between populations and between temperatures, but not for the interaction between these two variables (Table 2, Fig. 3b). Post-hoc t-tests showed a significant difference between all 3 populations at 8°C, 10°C and 14°C. Like at the previous stage, for 12°C, the Boulogne population was significantly different from the other two populations, while Lima and Vilaine populations did not appear significantly different (Fig. 3b).

### Remaining vitellus

Here, we compared the remaining vitellus at mouth opening stage, between the three populations. The two-way ANOVA exhibited a significant effect of population, temperature and also their interaction (population \* temperature) (Table 2, Fig.4).

The evolution of yolk volume between hatching to mouth opening (Fig. 4) showed, over the temperature range, a higher yolk volume at hatching for Boulogne vs Vilaine and Lima (respectively 0.35; 0.20; 0.17), confirmed at mouth opening stage (respectively 0.1; 0.05; 0.04).

## Chapitre V : Normes de réaction au stress thermique

Table 2. Influence of population origin and temperature on larval flounder size (at hatching, mouth opening) and vitellus at mouth opening

Variable	model term	df	F	p
Size at hatch	population	2	620.91	<0.001
	temperature	1	4.34	0.038
	pop × temp	1	18.56	<0.001
	residuals	786		
Size at mouth-opening	population	2	248.57	<0.001
	temperature	1	11.87	<0.001
	pop × temp	1	0.009	0.991
	residuals	483		
Vitellus at mouth opening	population	2	685.67	<0.001
	temperature	1	269.5	<0.001
	pop × temp	1	10.15	<0.001
	residuals	483		

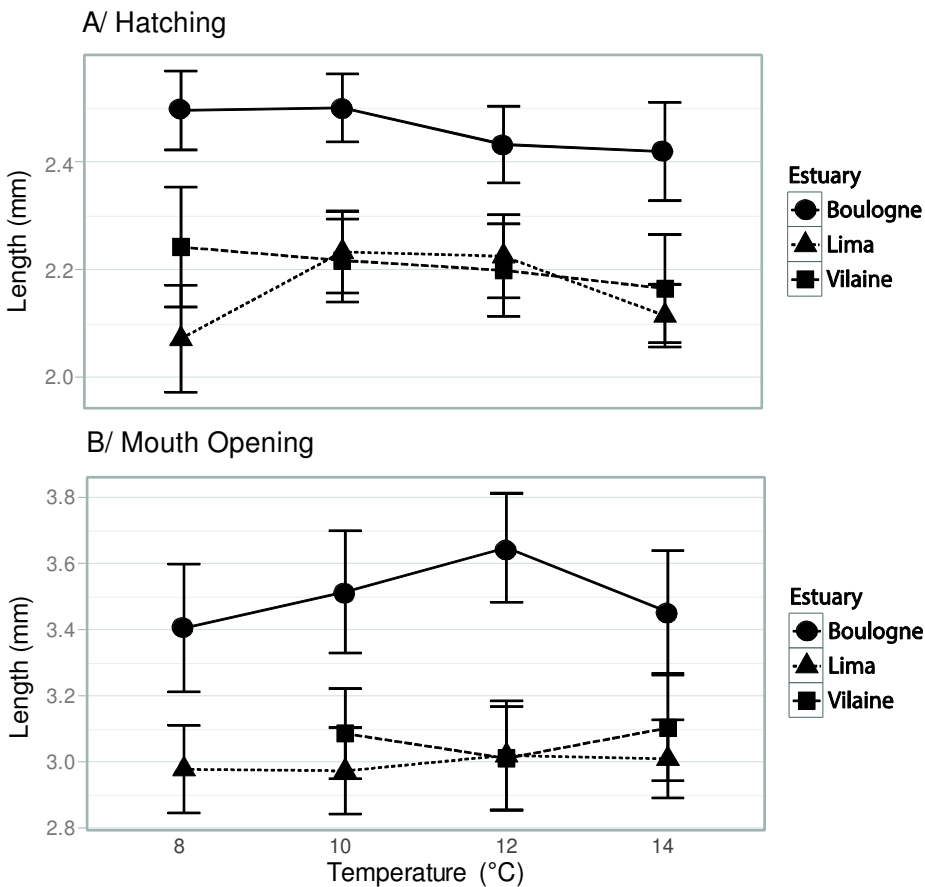


Figure 3. Thermal reaction norms of size at hatching (A), and mouth opening (B) stages of three *P. flesus* populations, as revealed by common garden experiments

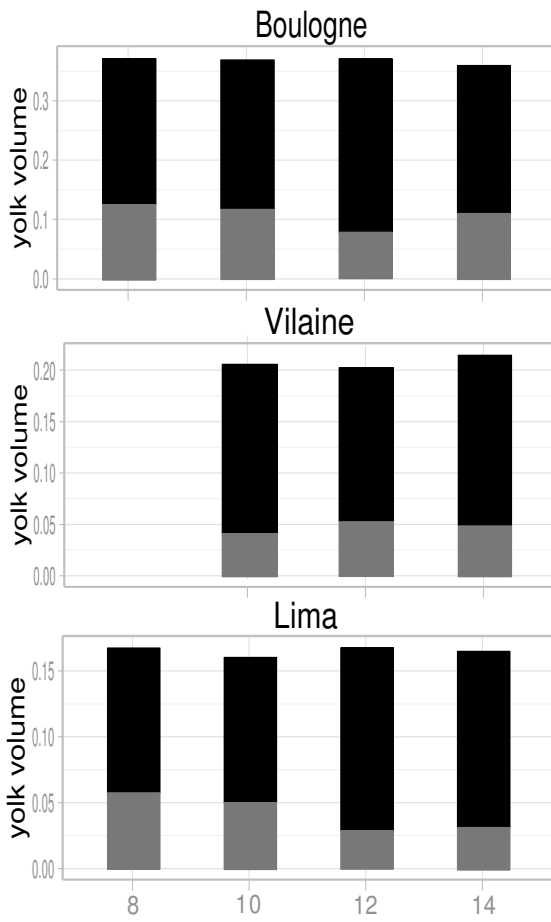


Figure 4. Evolution of yolk volume from hatching (whole bar), and to mouth opening (grey bar) of three *P. flesus* populations, as revealed by common garden experiments.

## Discussion

From the English Channel to Portugal, *P. flesus* populations usually spawn between January and March, migrating to the spawning grounds earlier in cold years (Sims et al. 2004; Sobral 2007; Freitas et al. 2009). Thus the main flounder pelagic larval period could be spread over three months (February to April) over the sampled zone; the lowest sea surface temperature (SST) being detected in winter nearest the three estuaries were 7°C, 9°C and 13°C for respectively Boulogne-sur-mer, Vilaine and Lima (OSPAR Commission 2000, Martinho et al. 2013).

A thorough analysis of the mean SST (from February to April), over the Portuguese coast from North to South, between 2003-2015 (data extracted from: <http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni> specifically from satellite MODIS-Aqua 4km), gives the following results: average SST = 13.48°C, 14.10°C and 14.86°C nearest respectively the Lima, Mondego and Tejo estuaries. The *P. flesus* spring estuarine recruitment is constant in the Lima ie without inter-annual variations (Ramos et al. 2010), seriously decreasing in the Mondego (Martinho et al. 2009), and null in the Tejo (Cabral et al. 2007). Thus, we consider that a winter SST between 14 and 15°C could impact negatively maturation process in flounder adult and/or larval survival, in the southern limit of its distribution area. On the other hand in the northern Baltic Sea flounder eggs were very sensitive to winter water temperature above 12°C which induced high levels of mortality (von Westernhagen 1970). Thus, the previous observations suggest that *P. flesus* populations could display differential sensibilities to oceanic winter conditions.

In the present study, we have challenged flounder embryos and larvae stemming from abundant and demographically active populations, susceptible to develop a local adaptation to thermal environment (Munday et al. 2013). The F1 progenies were challenged within the temperature range observed in the sampled are (8°C < SST < 14°C), and the results showed population differences in early life-history traits.

### Variation in oocyte size

A higher oocyte size was clearly detected in the northern vs southern populations (Boulogne vs Vilaine and Lima) which suggests that northern populations invest more in reproduction, as observed for the cod population coming from a lower average temperature (Harrald et al. 2010). The higher energetic metabolism and protein synthesis in northern vs southern flounder populations observed in a preliminary study (Calvès 2011) could be also linked to an adaptive variation in energy acquisition and allocation among latitudinal populations, as detected for the coastal fish *Menidia menidia* (Billerbeck et al. 2000).

### Variation in timing

The number of degree-days, or accumulated thermal units (ATU) required for flounder



hatching, strongly differed between temperatures, whatever the population considered. This trend is consistent with several studies on salmonids, where no population differences were observed for incubation time (measured in number of degree-days) but a temperature effect was detected (Jensen et al. 2008, Whitney et al. 2014). The total number of degree-days was lower at the lowest temperature of their common garden experiments, which was described as a possible response to limit the prolonged development time and exposure at the lowest temperature. However, our results showed an inverse trend, ie the lowest amount of ATU happened at the highest temperature for the three populations; this result remaining unexplained in the literature.

For salmonid studies, the time at first feeding is often characterized as the swim-up stage. For the European flounder, we chose to define the “first feeding” not at the moment the larvae started displaying a hunting behavior, but when the mouth opening could be detected under a microscope. The significant population effect on ATU for mouth opening reported in our study is also consistent with previous observations (Jensen et al. 2008).

The ontogenic development of the digestive tract of larvae has been described as genetically driven, or “hard-wired” (Zambonino Infante and Cahu 2001). The mouth opening timing, which is directly linked to digestive tract functionality is probably more genetically driven than depending on external parameters (maternal effect, temperature); thus, we suggest that the reduced mouth opening timing in the southern vs northern populations could be linked to a genetic difference in phenotypic plasticity.

### **Variation in size**

Fecundity and offspring size are life-history traits shaped by maternal trade-offs and mediated by a combination of genetic and environmental effects (Braun et al. 2013). Hatchling and mouth opening stage were significantly bigger for the Boulogne vs Vilaine – Lima populations. This trend is probably a direct consequence of the higher diameter of its eggs. Teleost eggs usually vary in size in relation with female length and age; this variation can lead to different sizes at hatching (Hutchings et al. 2007). However in the present study, no significant average fish length was detected between the Boulogne, Vilaine and Lima females. Size at hatching may be also related to differential egg volume during successive batches (Kamler 2005; Hutchings 2011). This hypothesis is not probable in our experiment where females were stripped at their higher maturity stage. Another possible difference in the size of larvae produced in the laboratory could be related to the different feeding regime of the wild adults in natura before their catch, with possible adverse consequences on the quality of the oocytes (Kjesbu and Holm 1994; Paulsen et al. 2009). We suggest that the more probable hypothesis could be that flounder northern populations invest more in their reproduction as said previously, and in the production of bigger larvae compared to southern populations. Selection

for increased body size via faster growth follows from survival during the early life stages of fish known as “bigger is better” paradigm; larger body size also increasing juvenile survival during the first winter particularly in higher latitudes (Baumann and Conover 2011).

The shape of the reaction norms showed that at hatching, the higher lengths were observed at 8-10°C for Boulogne and Vilaine, and 10-12°C for Lima. The bell-shaped curve observed for Lima showed a narrow thermal optimum for this southern population, since it was the only population to exhibit a strong decline in size at 8 and 14°C. The SST in the nearest coastal zone of the Iberian coast rarely decreases under 13°C in winter and we suggest that Lima embryos are more sensitive to cold temperature (SST < 10°C) compared to northern embryos; the reduced capacity of southern populations to cope with the cold stress being classically described in coastal fish species over latitudinal clines (Fangue et al. 2009; Dhillon and Schulte 2011).

At the mouth opening stage, the shapes of the reaction norms were modified. The Boulogne larvae were the biggest at 12°C. For the Lima population, the larvae at 8°C and 14°C were apparently able to make up lost growth, and reached the same size than larvae exposed to 10 and 12°C.

If statistics underlined population and temperature effects on the sizes at hatch as at mouth-opening, we observed that a population - temperature interaction was detected for the first stage and not observed for the second stage. Thus the temperature tolerance seems lower during the embryo stage than during larval stage, a similar trend being detected in early life-history traits in plaice (Freitas et al. 2007). More generally, it has been shown that thermal tolerance varies greatly within life stage, resulting in variation in growth performance and ultimately in size (Whitney 2013).

Globally the thermal reaction norms of size at mouth opening stage could appear counterintuitive, but several studies suggested that the growth rate was not necessarily the higher at putative optimal temperature (Haugen and Vollestad 2000; Jensen et al. 2008); ie that the lack of correspondence between the highest growth rate and the prevailing temperature within the respective coastal zone could be due to trade-offs between growth and other traits important to fitness. How reaction norm slopes and elevations are related to individual fitness, and thus population viability and persistence remains a major question (Hutchings 2011).

Furthermore, the interpretations of the flounder variation in size per population and treatment must be considered cautiously, because European flounder larvae are under 2.5 mm at hatch, which is a trait interfering with the handling and the measurement of the samples (Dalhberg 1979; Kamler 2005). Fishes with such a small hatching size usually have a brief larval stage, and a low survival rate (Lahnsteiner et al. 2012). Thus, it was impossible in the present study to assess the survival rate, the mortality being high for all populations and treatments; a size selective mortality could occur at the

extreme temperature (8 and 14°C), sparing the larvae displaying the higher growth rate (Houde 1997; Garrido et al. 2015).

### **Vitellus size at mouth opening**

The mouth opening marks the beginning of the mixotrophic phase. Considering that the occurrence of phenological mismatch is increasing with global changes (Kordas et al. 2011), the amount of remaining vitellus may be important for fitness by improving survival in unfavourable feeding conditions. The significant population x temperature interaction pointed out a possible local adaptation for this trait, which is also influenced by yolk-to-body-mass conversion efficiency (Thomassen et al. 2011). Beacham and Murray (1989) observed a difference in offspring sizes between populations from different thermal environment, a response attributed to a better yolk conversion efficiency for the cold-experienced population.

### **Conclusion**

The genetic differentiation between southern peripheral Portuguese vs central French flounder populations (Calvès et al. 2013) was probably associated with a reduced metabolism and a limited protein turnover in the southern part of the flounder distribution area (Calvès 2011). The common garden experiment developed in the present study highlighted possible genetic variation in thermal reaction norms for these flounder populations, but these differences could also reflect maternal effects or variation in the extent of selective mortality. However, the present study suggest a local adaptation of the flounder populations to their thermal environment, a higher size at hatching being detected at the lowest temperature (8°C) for the French northern populations and a higher size at medium temperature (12°C) for the Portuguese southern population.

Adaptive responses to climate change in traits related to phenology, and particularly the possibility that high temperature during vitellogenesis period causes a delay in spawning and a reduction in quantity and quality of eggs (Brown et al. 2006) may be probably as important as adaptability in early life-history traits and should be also investigated in a next future.

This work was supported by the ANR program VMCS-EVOLFISH (Paris) and the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19).

## BIBLIOGRAPHY

- Attrill MJ, Power M (2002) Climatic influence on a marine fish assemblage. *Nature* **417**: 275-278.
- Baumann H, Conover DO (2011) Adaptation to climate change: contrasting patterns of thermal-reaction-norm evolution in Pacific versus Atlantic silversides. *Proc Biol Sci* **278**:2265–73.
- Beacham T, Murray C (1989) Variation in developmental biology of sockeye salmon (*oncorhynchus nerka*) and chinook salmon (*o. tshawytscha*) in British-Columbia. *Can J Zool* **67**:2081–2089.
- Billerbeck JM, Schultz ET, Conover DO (2000) Adaptive variation in energy acquisition and allocation among latitudinal populations of the Atlantic silverside. *Oecologia*, **122**: 210-219.
- Blaxter JHS, Hempel G (1963) The Influence of Egg Size on Herring Larvae (*Clupea harengus* L.). *ICES J Mar Sci* **28**:211–240.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (2008) Genetic response to rapid climate change: it's seasonal timing that matters. *Mol Ecol* **17**:157–66.
- Braun DC, Patterson DA, Reynolds JD (2013) Maternal and environmental influences on egg size and juvenile life-history traits in Pacific salmon. *Ecol Evol* **3**:1727–40.
- Brown NP, Shields RJ, Bromage NR (2006) The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **261**: 993-1002
- Byrne M (2011) Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* **49**:1–42.
- Cabral H, Costa M, Salgado J (2001) Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Clim Res* **18**:119–126.
- Cabral H, Vasconcelos R, Vinagre C, Franca S, Fonseca V, Maia A, Reis-Santos P, Lopes M, Ruano M, Campos J, Freitas V, Santos P, Costa M (2007) Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research* **57**(2-3): 209-217.
- Calvès I (2011) Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale.
- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser* **472**:257–273.
- Chaalali A, Beaugrand G, Boët P, Sautour B (2013) Climate-caused abrupt shifts in a european macrotidal estuary. *Estuaries and Coasts* **36**:1193–1205.
- Dalhberg M (1979) Review of survival rates of fish eggs and larvae in relation to impact assessments. *Mar Fish Rev* **41**:1–12.
- Dhillon RS, Schulte PM (2011) Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *Journal of Experimental Biology*, **214**, 3639-3648.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, Amara R, Charrier G, Fournier M, Laroche J (2015) Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel,

- considering biomarkers and life history traits. *Mar Poll Bull* **95**: 634-645
- Fangue NA, Richards JG, Schulte PM (2009) Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, **212**, 514-522.
- Freitas V, Campos J, Fonds M, Van der Veer HW (2007) Potential impact of temperature change on epibenthic predator-bivalve prey interactions in temperate estuaries. *Journal of Thermal Biology* **32**(6): 328-340
- Freitas V, Costa-Dias S, Campos J, Bio A, Santos P, Antunes C (2009) Patterns in abundance and distribution of juvenile flounder, *Platichthys flesus*, in Minho estuary (NW Iberian Peninsula). *Aquatic Ecology* **43**(4): 1143-1153.
- Garrido S, Ben-Hamadou R, Santos AMP, Ferreira S, Teodósio MA, Cotano U, Irigoien X, Peck MA, Saiz E, Ré P (2015) Born small, die young: Intrinsic, size-selective mortality in marine larval fish. *Scientific Reports* **5**:17065.
- Genner MJ, Halliday NC, Simpson SD, Southward AJ, Hawkins SJ, Sims DW (2009) Temperature-driven phenological changes within a marine larval fish assemblage. *J Plankton Res* **32**:699-708.
- Harrald M, Wright PJ, Neat FC (2010) Substock variation in reproductive traits in North Sea cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**: 866-876.
- Haugen TO, Vollestad LA (2000) Population differences in early life-history traits in grayling. *J Evol Biol* **13**:897-905.
- Hermant M, Lobry J, Bonhommeau S, Poulard J-C, Le Pape O (2010) Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J Sea Res* **64**:45-53.
- Houde ED (1997) Patterns and trends in larval-stage growth and mortality of teleost fish\*. *J Fish Biol* **51**:52-83.
- Hutchings J a, Swain DP, Rowe S, Eddington JD, Puvanendran V, Brown J a (2007) Genetic variation in life-history reaction norms in a marine fish. *Proc Biol Sci* **274**:1693-9.
- Hutchings JA (2011) Old wine in new bottles: reaction norms in salmonid fishes. *Heredity (Edinb)* **106**:421-37.
- Jensen LF, Hansen MM, Pertoldi C, Holdensgaard G, Mensberg K-LD, Loeschcke V (2008) Local adaptation in brown trout early life-history traits: implications for climate change adaptability. *Proc Biol Sci* **275**:2859-68.
- Kamler E (2005) Parent-egg-progeny Relationships in Teleost Fishes: An Energetics Perspective. *Rev Fish Biol Fish* **15**:399-421.
- Kerambrun E, Henry F, Cornille V, Courcot L, Amara R (2013) A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* **91**:498-505.
- Kjesbu OS, Holm JC (1994) Oocyte Recruitment in First-Time Spawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Relation to Feeding Regime. *Can J Fish Aquat Sci* **51**:1893-1898.
- Kordas RL, Harley CDG, O'Connor MI (2011) Community ecology in a warming world: The influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. *J Exp Mar Bio Ecol* **400**:218-226.
- Lahnsteiner F, Kletzl M, Weismann T (2012) The effect of temperature on embryonic and yolk-sac larval

- development in the burbot *Lota lota*. *J Fish Biol* **81**:977–86.
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, Claireaux G, Mazurais D, Zambonino-Infante J, Le Bayon N, Cahu C, Laroche J (2015) Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Pollut Bull* **95**:658–64.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc: Sunderland, Massachusetts
- Martinho F, Dolbeth M, Viegas I, Teixeira CM, Cabral HN, Pardal MA (2009) Environmental effects on the recruitment variability of nursery species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **83**: 460-468.
- Martinho F, van der Veer HW, Cabral HN, Pardal MA (2013) Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): A latitudinal approach. *J Sea Res* **84**:61–69.
- Munday PL, Warner RR, Monro K, Pandolfi JM, Marshall DJ (2013) Predicting evolutionary responses to climate change in the sea. *Ecol Lett* **16**: 1488-1500
- OSPAR commission (2000) *Quality Status Report - Region IV Bay of Biscay and Iberian Coast*
- Parmesan C (2006) Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **37**:637–669.
- Paulsen H, Kjesbu OS, Buehler V, Case RAJ, Clemmesen C, Carvalho G, Hauser L, Hutchinson WF, Moksness E, Otterå H, Thorsen A, Svåsand T (2009) Effects of egg size, parental origin and feeding conditions on growth of larval and juvenile cod *Gadus morhua*. *J Fish Biol* **75**:516–37.
- Pörtner HO, Peck MA (2010) Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J Fish Biol* **77**:1745–79.
- Ramos S, Ré P, Bordalo AA (2010) Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *Journal of Sea Research* **64**: 473-486.
- Rijnsdorp AD, Peck MA, Engelhard GH, Mollmann C, Pinnegar JK (2009) Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES J Mar Sci* **66**:1570–1583.
- Sims DW, Wearmouth VJ, Genner MJ, Southward AJ, Hawkins SJ (2004) Low-temperature-driven early spawning migration of a temperate marine fish. *J Anim Ecol* **73**:333–341.
- Sobral MP (2007) Aspectos relativos à biologia reprodutiva da solha, *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) da Ria de Aveiro e litoral adjacente. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital, N°44*, 31pp
- Summers RW (1979) Life cycle and population ecology of the flounder *Platichthys flesus* (L.) in the Ythan estuary, Scotland. *J Nat Hist* **13**:703–723.
- Thomassen G, Barson NJ, Haugen TO, Vøllestad LA (2011) Contemporary divergence in early life history in grayling (*Thymallus thymallus*). *BMC Evol Biol* **11**:360.
- von Westernhagen H (1970) Erbrütung der Eier von Dorsch (*Gadus morhua*), Flunder (*Pleuronectes flesus*) und Scholle (*Pleuronectes plaressa*) unter kombinierten Temperatur- und Salzgehaltsbedingungen. *Helgoländer wiss. Meeresunters* **21**: 21-102
- Whitney CK, Hinch SG, Patterson D a. (2013) Provenance matters: Thermal reaction norms for embryo survival among sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* populations. *J Fish Biol* **82**:1159–1176.
- Zambonino Infante J., Cahu C. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp*



**Additional data**

**Table S1:** Results of t-test (p-values) between several variables, namely size at hatching, size at mouth opening, growth and yolk consumption, between populations (Boulogne, Vilaine and Lima) for 4 different temperatures (8, 10, 12 and 14 °C).

Variable	T(°C)	Boulogne/Vilaine	Boulogne/Lima	Vilaine/Lima
Size <sub>hatching</sub> (mm)	8	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	10	< 0.001	< 0.001	0.210
	12	< 0.001	< 0.001	0.061
	14	< 0.001	< 0.001	0.001
Size <sub>mouth opening</sub> (mm)	8	NA	< 0.001	NA
	10	< 0.001	< 0.001	0.004
	12	< 0.001	< 0.001	0.800
	14	< 0.001	< 0.001	0.003
Yolk consumption (mm <sup>3</sup> )	8	NA	< 0.001	NA
	10	< 0.001	< 0.001	0.002
	12	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	14	< 0.001	< 0.001	< 0.001

**Table S2:** Results of t-test (p-values) between namely size at hatching, size at mouth opening, growth and yolk consumption within populations (Boulogne, Vilaine and Lima) between 4 different temperatures (8, 10, 12 and 14 °C).

---

Size <sub>hatching</sub> (mm)				
Boulogne				
T°C	8	10	12	
10	0.72			
12	< 0.001	< 0.001		
14	< 0.001	< 0.001	0.63	
Vilaine				
T°C	8	10	12	
10	0.38997			
12	0.10279	0.38997		
14	< 0.001	0.04508	0.25103	
Lima				
T°C	8	10	12	
10	< 0.001			
12	< 0.001	0.48339		
14	< 0.001	< 0.001	< 0.001	



Size mouth opening (mm)

Boulogne				
T°C	8	10	12	
10	0.00963			
12	< 0.001	0.00963		
14	0.18265	0.18078	0.00019	
Vilaine				
T°C	8	10	12	
10	Unavailable			
12	Unavailable	0.159		
14	Unavailable	0.679	0.075	
Lima				
T°C	8	10	12	
10	1.00			
12	0.79	0.43		
14	0.90	0.79	1.00	

Yolk consumption (mm<sup>3</sup>)

Boulogne				
T°C	8	10	12	
10	0.007			
12	< 0.001	< 0.001		
14	0.003	0.06	< 0.001	
Vilaine				
T°C	8	10	12	
10	x			
12	x	< 0.001		
14	x	0.12	0.06	
Lima				
T°C	8	10	12	
10	0.21			
12	< 0.001	< 0.001		
14	< 0.001	< 0.001	0.03	

## Chapitre VI : Discussion générale et perspectives



## Objectifs principaux et approches mises en œuvre dans cette thèse

Le changement climatique est une menace majeure qui va probablement impacter très fortement la biodiversité au cours de ce 21<sup>ème</sup> siècle. Cette thèse s'inscrit dans les nouvelles stratégies développées pour mieux comprendre les capacités adaptatives des espèces et de leurs populations à survivre in situ ; ces capacités étant liées à plusieurs facteurs intrinsèques: plasticité phénotypique, diversité génétique, vitesse évolutive et potentiel de dispersion (Dawson et al. 2011).

Un consensus émergent en biologie marine est que certaines populations peuvent développer une adaptation locale très rapidement, sur une échelle de temps de quelques générations, face aux changements climatiques récents enregistrés dans les océans (Munday et al. 2013). Toutefois, l'impact des changements climatiques sur les populations marines reste encore peu connu (Oomen & Hutchings 2015, Seebacher et al. 2015). Les priorités de recherches visent actuellement: (1) à mieux comprendre la capacité des populations à s'acclimater et/ou à s'adapter localement face aux effets du changement global, (2) à améliorer notre capacité de prédiction de leur vulnérabilité face aux scénarios climatiques pour le futur.

Dans cette thèse, notre principal objectif a été d'explorer les aptitudes différentielles de populations d'un poisson estuarien, le flet (*Platichthys flesus*), à répondre à des facteurs de forçage liés au changement climatique global : le réchauffement des eaux et l'hypoxie. Nous avons développé une approche à trois niveaux (figure 17) :

- une analyse en génétique des populations, qui vise à caractériser la diversité génétique neutre et adaptative des populations de flet à l'échelle de son aire de distribution ; ie à mieux comprendre comment dérive génétique, migration et sélection peuvent façonner génétiquement les populations à l'échelle de l'Europe ;
- une mesure des réponses moléculaires et bioénergétiques de flets juvéniles prélevés dans trois populations (une située au Sud de l'aire de répartition, au Portugal : estuaire de la Lima vs deux populations centrales localisées en France : estuaires de Vilaine et Canche), puis soumis à un stress thermique et hypoxique, en situation de common garden ; l'objectif étant ici de déceler de possibles signatures différentielles liées à l'adaptation locale au sein de ces populations ;
- une expérimentation sur des flets F1 aux stades précoces (produits à partir de géniteurs prélevés dans le même gradient latitudinal que précédemment : Lima, Vilaine, Boulogne-sur-mer), visant à explorer les normes de réaction des traits de vie de ces jeunes stades sur une gamme de température environnementale, afin d'identifier un possible *preferendum* thermique pour chaque population.

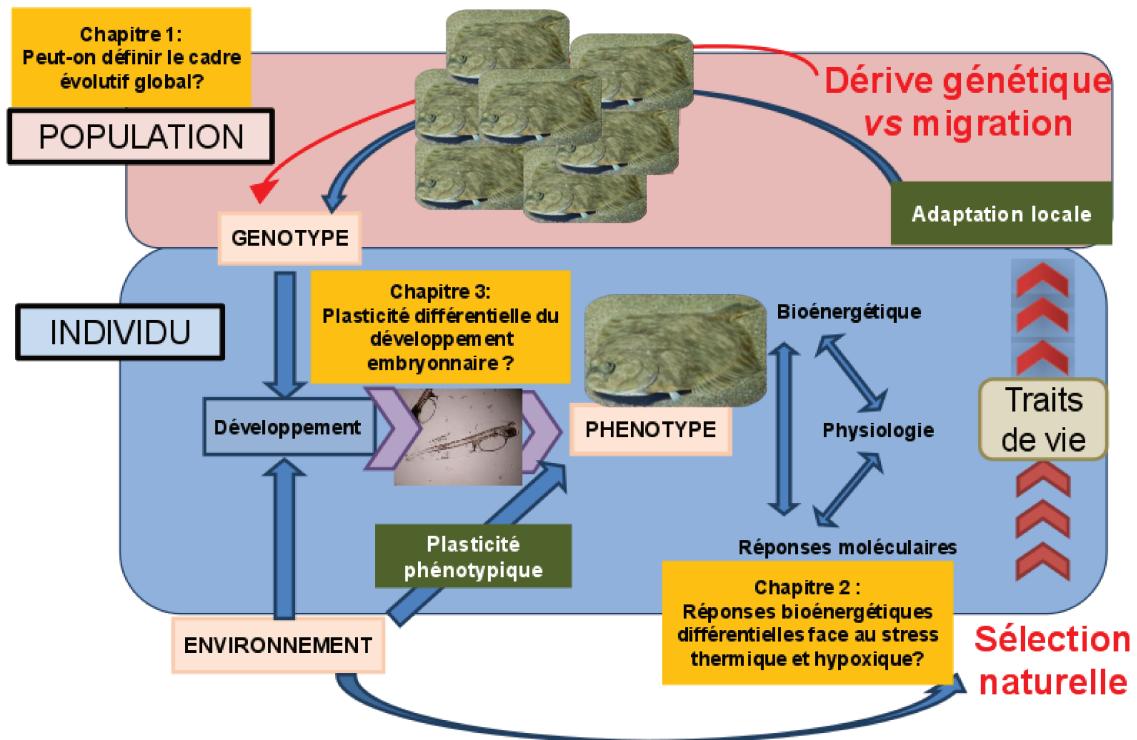


Figure 17: Acclimatation et adaptation de populations de poissons

Le génotype d'un individu et son environnement interagissent sur le processus de développement des stades embryo-larvaires, pour produire un phénotype. Ce phénotype va se construire progressivement par une intégration des réponses moléculaires et physiologiques au niveau de l'organisme, celui-ci pouvant présenter une certaine plasticité vis-à-vis des pressions environnementales. Enfin la sélection naturelle pourra agir sur certains traits de vie, en retenant dans le système les individus présentant la meilleure fitness, et modifiera ainsi génétiquement la population (adaptation locale). Notons que les forces évolutives neutres, dérive génétique et migration, sont aussi des composantes majeures façonnant la diversité génétique des populations (adapté de Willmer et al. 2005).

Les cadres oranges correspondent aux différentes approches menées au cours de cette thèse.

## **Peut-on détecter une différenciation génétique significative entre les populations de flets à l'échelle de l'Europe ?**

Globalement notre approche en génétique de populations sur le flet incluant l'usage de marqueurs hypervariables de type microsatellites et de marqueurs SNP potentiellement sous sélection, renforce l'hypothèse d'une différenciation génétique marquée entre les populations de la Péninsule Ibérique vs celles de l'Atlantique Nord, comme suggéré dans un travail précédent de notre équipe (Calvès et al. 2013).

Les marqueurs microsatellites permettent de différencier globalement à l'échelle de l'Europe quatre groupes de populations (Péninsule Ibérique, Golfe de Gascogne, Manche Est - Mer du Nord, Mer Baltique), avec un niveau de différenciation génétique globale très cohérent avec celui relevé sur la même espèce dans le Nord-Est Atlantique (Hemmer-Hansen et al. 2007a).

Nous avons détecté avec les marqueurs microsatellites une perte de diversité allélique significative dans la population de flet en limite Sud de l'aire de répartition de cette espèce, localisée dans l'estuaire du Mondego au Portugal. On remarque par ailleurs que la diversité allélique reste relativement modérée sur l'ensemble des populations de la Péninsule Ibérique relativement aux populations plus au Nord, avec cependant une variation temporelle significative dans les fréquences alléliques du Mondego, non détectée dans la population du Lima située au Nord du Portugal. Ce résultat confirme que la population du Mondego est très probablement sujette à des goulots d'étranglement démographique successifs se traduisant par une dérive génétique, la population du Lima présenterait quant-à elle une démographie active et un recrutement stable. Ces hypothèses démo-génétiques sont confirmées par le fonctionnement écologique de ces populations (Martinho et al. 2009, 2010 ; Ramos et al. 2010).

La différenciation Péninsule Ibérique vs Nord Atlantique observé chez le flet converge avec des études phylogéographiques menées chez un autre poisson côtier, le gobie des sables *Pomatoschistus minutus* (Larmuseau et al 2009, 2010a), où une séparation nette a été décrite entre Péninsule Ibérique, Nord-Atlantique et Mer Baltique. Ces travaux suggèrent que les populations en limite Sud d'aire de répartition conservent une diversité génétique principalement liée à la présence d'un refugium dans les dernières glaciations du quaternaire, localisé dans le Nord-Ouest de la Péninsule Ibérique. Ce pattern est confirmé pour de nombreuses espèces côtières du Nord-Est Atlantique (Provan 2013). Il est donc suggéré que l'expansion post-glaciaire en Europe du Nord, pour le flet comme pour *P. minutus*, est plus issue d'un refugium en Manche ou dans le Sud de la Mer du Nord, avec une contribution limitée du refugium Ibérique (Gysels et al. 2004 ; Larmuseau et al. 2009). La fosse du Cap Breton au Sud-Est du golfe de Gascogne, ainsi que les capacités très limitées en terme de nurseries de la zone côtière comprise entre Arcachon et le Pays Basque, pourraient

être deux facteurs majeurs limitant les flux de gènes entre la Péninsule Ibérique et la région centrale du Golfe de Gascogne, et donc assurant le maintien de cette structure génétique.

L'analyse multilocus de la structure génétique des populations de flets, en considérant les gènes potentiellement sous sélection (SNP), a globalement confirmé l'originalité des populations Ibériques vs du Nord Atlantique. On remarque que deux locus ont été particulièrement structurants : GAPDH et PGDS. Le locus GAPDH, à l'interface entre de multiples voies métaboliques liées à la bioénergétique, ségrège aussi les populations ibériques vs celles plus au Nord ; ce résultat suggérant que des pressions de sélection différentielles sur ce locus sont très vraisemblables entre ces régions qui présentent des conditions hydro-climatiques très contrastées. Le locus PGDS impliqué dans certains processus de détoxification et dans la modulation de l'inflammation est également structurant à l'échelle de l'Europe, et différencie a priori les populations relativement à leur niveau général de contamination chimique.

### **La différenciation génétique entre les populations de flet centrales et périphériques se traduit elle par une différenciation phénotypique entre leurs juvéniles soumis à un multi-stress ?**

La deuxième phase de cette thèse a mis en place une expérimentation en common garden. Des juvéniles de flet issus de trois populations (deux populations centrales : une de la Canche dans la région Manche - Mer du Nord, une de la Vilaine localisée dans le Golfe de Gascogne vs une population de la Lima dans la Péninsule Ibérique) ont été soumis à deux conditions (froide vs chaude et hypoxique). Notre objectif a été ici d'identifier de possibles réponses différentielles des poissons juvéniles vis-à-vis des conditions expérimentales qui pourraient refléter une adaptation locale vis-à-vis de leur environnement naturel. Rappelons brièvement que les juvéniles issus des trois estuaires ont été soumis durant environ deux mois à deux conditions contrastées, l'une froide (10°C) et l'autre chaude et hypoxique (21°C, et 40% de saturation en oxygénation durant les six derniers jours). Cette expérimentation a mimé un épisode hydro-climatique susceptible de se produire en milieu estuarien: un réchauffement progressif des eaux suivi par évènement hypoxique modéré.

Le principe de la tolérance au stress limité par l'énergie (Sokolova 2013) analyse les effets des stressseurs au niveau de la bioénergétique, comme un outil intégrateur de la physiologie, pour évaluer le risque écologique dans les populations naturelles, et identifier les habitats assurant la viabilité des populations. Le suivi du métabolisme énergétique permet de mesurer les effets du multi-stress, avec notamment la réorientation de la production d'ATP de l'aérobiose vers une anaérobiose partielle et la perte de réserves qui sont considérés comme des signaux indicateurs d'un fort niveau de stress. Cette théorie constitue une base conceptuelle qui a orienté notre expérience en common garden sur le flet.

L'absence notable de croissance en longueur des poissons, au cours de notre expérience, a été détectée uniquement en condition froide (10°C), pour la population de Lima. Cette absence de croissance de la population du Sud est très probablement liée à sa plus faible capacité à accroître ses capacités mitochondriales en conditions froides, relativement aux populations Nord, comme cela a été décrit largement dans la littérature sur la physiologie des poissons sur des clines latitudinaux (Fangue et al. 2009 ; Dhillon and Schulte 2011). On suggère donc pour la population du Sud, une production d'énergie limitée en condition froide ne permettant pas une allocation d'énergie vers la croissance.

Les activités enzymatiques réduites de la Cytochrome C Oxydase et de la Citrate Synthase (production énergétique en aérobiose) au niveau musculaire, quelles que soient les conditions environnementales (froide ou chaude et hypoxique) dans la population Sud vs Nord mettent très probablement en évidence un métabolisme de routine ralenti au Sud, témoin d'un trade off classiquement décrit dans la littérature entre taux d'activité métabolique et tolérance aux fortes températures (Billerbeck et al. 2000 ; Sylvestre et al. 2007 ; Fangue et al. 2009 ; Dhillon and Schulte 2011). Enfin l'activité enzymatique de la G6PDH au niveau du foie, considérée comme un indicateur pertinent de l'anabolisme, a chuté de façon très significative en conditions de multistress pour les populations du Nord, le niveau d'activité étant maintenu pour la population Sud; ce résultat mettant en évidence une altération de l'anabolisme probablement plus soutenue en populations Nord vs Sud. Globalement, nous suggérons que les populations du Nord ont une meilleure aptitude à produire de l'énergie et à assurer leur croissance en condition froide, relativement à la population du Sud. A l'inverse la population du Sud semble être relativement moins impactée par la condition chaude et hypoxique. Cette dernière hypothèse se confirme par l'analyse de la variabilité inter-individuelle dans la réponse des poissons aux conditions expérimentales, où une transition vers une production d'énergie en anaérobiose a été observée pour les populations du Nord en situation chaude et hypoxique ; dans les mêmes conditions, les poissons du Sud présentant un équilibre entre aérobiose et anaérobiose.

La même expérience en common garden a permis également de développer une approche en protéomique sur le foie, pour rechercher sans a priori des voies métaboliques modifiées différenciellement, selon les conditions expérimentales et/ou la nature des populations de flet. Nous nous intéressons ici au différentiel observé dans les signatures protéiques entre populations. Nous avons pu confirmer une plus forte abondance de l'ATP synthase subunit beta en condition de multistress dans les poissons de la Lima vs Canche, ce qui pourrait refléter une meilleure capacité de la population Sud à gérer ces conditions chaudes et hypoxiques, en maintenant ses capacités en aérobiose. Nous avons de plus retrouvé une signature protéique plus faible pour la G6PDH en population Sud vs Nord, cette fois ci quelle que soient les conditions expérimentales, confirmant ainsi



que ce gène est d'un intérêt majeur pour ségréger les métabolismes des populations de poissons sur des clines latitudinaux, son niveau d'expression réduite en populations Sud, ayant une probable valeur adaptative (Whitehead and Crawford 2006).

Par ailleurs l'approche en protéomique a permis d'identifier d'autres voies métaboliques d'intérêt présentant des réponses différentielles entre populations du Nord vs Sud particulièrement en conditions de multistress ; nous citerons notamment les Fatty acid-binding proteins (FABP) et la Glutamate dehydrogenase (GDH) qui sont notamment impliquées respectivement dans le transport des triglycérides et dans le catabolisme des acides aminés, ces voies métaboliques étant clairement mises en œuvre dans la réponse des poissons à l'hypoxie (Gracey et al. 2001, 2011).

Globalement, nous avons donc mis en évidence un différentiel de réponse en termes de bioénergétique et de signatures protéiques entre les populations Nord vs Sud de flet en conditions expérimentales, avec une meilleure aptitude de ces populations à se maintenir respectivement dans les conditions froide vs chaude et hypoxique. Nous ne pouvons pas ici différencier la part de cette variabilité due à la plasticité phénotypique induite avant l'échantillonnage des individus dans la nature (liée aux effets maternel, épigénétique et physiologique en réponses à l'environnement pré ou postnatal), de celle due à une différence génétique entre les populations. Cependant, notre approche permet d'étudier la réponse d'individus qui sont représentatifs des pressions de sélection locale, c'est-à-dire qui ont notamment survécu aux phases de très forte mortalité, au stade embryo-larvaire dans le milieu océanique, et lors de la phase de recrutement à l'état juvénile en estuaire. Nous suggérons donc que les différences détectées entre les populations expérimentées peuvent avoir une composante génétique significative, et donc être liées à l'adaptation locale de ces populations dans des environnements contrastés.

### **Peut-on différencier les normes de réaction thermiques des traits de vie, pour les stades embryo-larvaires de flet issus de populations centrales et périphérique ?**

Dans cette dernière étape de la thèse, nous avons produit au laboratoire une nouvelle génération F1 de flets, à partir de géniteurs prélevés dans les trois secteurs cités précédemment (Boulogne-sur-mer, Vilaine et Lima). Cette génération F1 a été testée, dès la fécondation des oeufs, pour mieux contrôler la plasticité phénotypique au niveau des stades précoces (embryo-larvaires) et évaluer la différenciation adaptative potentielle entre les populations de flet. L'objectif a été ici de mesurer les normes de réaction des traits de vie de flet sur une gamme de température observée in natura de la Manche au Portugal, et de tester si chaque population est plus « performante » dans le température de son propre environnement, relativement aux autres températures.

La variation saisonnière de la température de surface des eaux marines (SST : sea surface

temperature) en face des différents estuaires se caractérise par une amplitude thermique nettement plus forte pour les populations du Nord (7-17°C en Canche, 9-18°C en Vilaine) vs du Sud (13-18,5°C en Lima). Par ailleurs, une analyse fine de la SST moyenne entre 2003 et 2015, de février à avril (période correspondant à la vie pélagique embryo-larvaire du flet au Portugal) sur les côtes portugaises, a produit les résultats suivants du Nord au Sud : SST Lima = 13,48°C, SST Mondego = 14,10°C, SST Tage = 14,86°C. Il faut souligner qu'au Portugal, les statuts démographiques des trois populations de flets sont très contrastés, avec une population nombreuse et un recrutement stable dans le Lima, un recrutement irrégulier du flet dans le Mondego et un recrutement considéré comme nul dans le Tage (estuaire de Lisbonne où le flet était abondant il y a 20 ans). Ces différentes analyses de l'hydroclimat à l'échelle de notre zone d'étude nous ont conduit à suivre le développement embryonnaire de flets issus des trois populations Boulogne/Vilaine/Lima sur une gamme de température réaliste de leur environnement : 8, 10, 12, 14°C.

La taille des œufs a été significativement plus élevée pour la population de Boulogne vs les populations de Vilaine et Lima. Nous suggérons que ce résultat pourrait être lié à une variation adaptative dans l'acquisition et l'allocation d'énergie entre populations de poissons sur un gradient latitudinal, les populations du Sud investissant moins dans leur effort de reproduction (Billerbeck et al. 2000). On remarque que cette hypothèse pourrait se confirmer pour les poissons marins, avec notamment une taille d'oocyte positivement corrélée avec la latitude pour *Gadus morhua* et *Pomacentrus coelestis* (Harrald et al. 2010; Kokita 2003).

Parmi les différents traits de vie mesurés sur les stades embryo-larvaires de flet, une interaction significative entre la température et la population d'origine a été détectée pour la taille à l'éclosion et le volume du vitellus à l'ouverture de la bouche, témoignant d'une variabilité génétique entre les populations et d'une possible adaptation locale pour ces traits de vie ; des résultats convergents ayant été observés pour de nombreuses espèces de salmonidés (Haugen & Vollestad 2000, Jensen et al. 2008, Hutchings et al. 2011).

Globalement, notre approche sur les normes de réaction sur les jeunes stades de flet a mis en évidence que les températures les plus froides semblent favorables à la croissance des larves issues des populations Nord, le *preferendum* thermique des larves à l'éclosion de Lima se situant plus entre 10 et 12 °C. Il existe donc une adéquation apparente entre origine des larves et *preferendum* thermique, avec une plus forte sensibilité des larves de Lima à des températures inférieures à 10°C. On remarque de plus, pour cette population du Sud, que le différentiel de taille détecté entre les larves à l'éclosion pour les différentes températures, disparaît au stade larvaire « ouverture de la bouche » ; ce dernier stade présente donc une tolérance plus forte vis-à-vis de la température relativement au stade embryon comme cela a été décrit chez certains poissons marins.

La limite de ce travail est certainement liée à la biologie spécifique du flet, qui présente des

larves de très petites tailles (taille des larves à l'éclosion < 2,5mm) caractérisées par un développement embryo-larvaire très rapide et un faible taux de survie. Il a été ainsi impossible d'évaluer avec précision le taux de survie larvaire dans notre expérience qui s'est donc concentrée sur certaines métriques comme le timing de l'éclosion et de l'apparition du stade larvaire « bouche ouverte » et les tailles atteintes par ces stades. Il est probable que nos mesures de « performance » sur les larves à une température donnée, estimée par la taille atteinte présente des limites ; en effet la vitesse de croissance n'est pas nécessairement la plus forte à la température de développement « optimal » de la larve (Haugen and Vollestad 2000 ; Jensen et al. 2008), ce manque de correspondance pouvant être lié à des trade-offs entre la croissance et d'autres traits importants pour la fitness.

Nous suggérons que dans notre expérience sur les normes de réaction des jeunes stades de flet, la mortalité larvaire a été forte dans toutes les conditions et pour toutes les populations; aussi il n'est pas impossible qu'une mortalité sélective puisse se mettre en place, par exemple sur les individus ayant la croissance la plus rapide, et donc apporte de possibles biais dans notre estimation de la croissance comme indicateur de fitness.

Globalement nos résultats sur les normes de réaction des traits de vie de différentes populations de flet, sur un gradient thermique, vont dans le sens d'une adaptation locale du flet à son régime thermique. L'investissement zootechnique a été lourd durant cette thèse et si la production de F1 de flet est techniquement possible en laboratoire, les contraintes sont très élevées pour l'obtention de ces jeunes stades : décalages des pontes entre populations, faible tailles des œufs et larves, forte mortalité à tous les stades embryo-larvaires, développement très rapide (éclosion en trois jours à 14°C, ouverture de bouche en 5 jours).

### **Valeur des populations périphériques Sud en termes de conservation d'une espèce ?**

Les populations périphériques sont séparées spatialement des populations centrales, et sont souvent écologiquement marginales, expérimentant des environnements biotique et abiotique différents et fréquemment des conditions stressantes; ainsi des goulots d'étranglement, un flux de gène restreint et de nouveaux régimes de sélection interagissent au niveau de ces populations périphériques et peuvent conduire à une différenciation génétique très significative (Lesica and Allendorf 1994). Nous suggérons que les populations Sud de flet s'inscrivent dans le schéma général précédent.

On remarque que peu d'études ont testé si la différenciation génétique entre populations centrales et périphériques se traduit par une variabilité phénotypique entre ces populations qui pourrait avoir une valeur adaptative (Eckert et al. 2008). Des travaux ont souligné que les réponses des espèces terrestres et aquatiques aux changements environnementaux sont probablement

largement déterminées par la réponse des populations au niveau des marges de la distribution des espèces (Hampe & Petit 2005 ; Alberto et al. 2013) ; les populations isolées dans les habitats périphériques pouvant contenir des génotypes présentant des caractères de résilience face au réchauffement climatique futur, ceci soulignant la nécessité de protéger de petites populations périphériques comme de grosses populations centrales (Moritz et al. 2012).

La présente étude sur le flet met clairement en évidence une différenciation phénotypique de la population périphérique de Lima relativement à des populations situées dans le Golfe de Gascogne et en Manche Est qui pourrait avoir une certaine valeur adaptative, au niveau des stades embryonnaire comme juvénile. Nous suggérons que les populations de flet démographiquement fonctionnelles du Nord-Ouest de la Péninsule Ibérique (la population du Lima faisant partie de cette unité) pourraient (1) présenter une meilleure capacité de résilience face au réchauffement climatique comparativement aux populations plus nordiques, et (2) faire l'objet d'un programme de conservation de par leurs caractéristiques génétiques et phénotypiques probablement uniques, permettant de les considérer comme une ESU (Evolutionarily significant Unit).

## **Perspectives de recherche**

### **Approfondissement sur la structure génétique des populations**

Un des premiers objectifs pourrait être ici d'approfondir la structure phylogéographique des populations de flet par séquençage de marqueurs mitochondriaux. Plusieurs marqueurs pourraient être testés (Cytochrome Oxydase I, Cytochrome b, Région de Contrôle) afin d'identifier le plus polymorphe pour mieux évaluer l'influence des oscillations climatiques passées (dues aux glaciations du Pléistocène) sur la structure actuelle des populations de flet à travers l'Europe.

Une nouvelle approche en génomique de populations serait aussi particulièrement pertinente sur le flet pour explorer finement des signatures contrastées de sélection naturelle qui peuvent avoir structuré les populations de flet le long du cline latitudinal en relation avec les pressions environnementales locales. Une approche de type RADseq (Restriction site Associated DNA Sequencing) permettrait d'identifier rapidement et de génotyper des milliers de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sur l'ensemble du génome, en s'appuyant sur les nouvelles techniques de séquençage à haut débit.

### **Recherche sur de possibles perturbations de la reproduction**

Le suivi de la variabilité de la température de la mer par le NAOI (North Atlantic Oscillation

Index : une valeur positive témoignant d'un hiver doux, une valeur négative marquant un hiver froid) a mis en évidence que les hivers doux induisent un faible recrutement de flets dans les milieux estuariens en Manche, mais favorisent la croissance des juvéniles de l'année (Attril et Power 2002). Le flet étant une espèce à affinité boréale, on peut s'interroger si ce faible recrutement lors des hivers doux est lié à une plus faible survie des larves comme pourrait le suggérer notre approche sur la sensibilité des stades embryo-larvaires à la température, mais peut être aussi, en amont, à une possible perturbation du cycle de reproduction des flets adultes. Pour le futur, il nous paraît donc d'un intérêt majeur d'effectuer un suivi pluri-annuel de la gamétogénèse de flets adultes, relativement à l'évolution de la température de surface de la mer, dans des populations de flet sur un cline latitudinal, pour caractériser la vulnérabilité de la fonction de reproduction face au réchauffement climatique. Une approche expérimentale pourrait être conduite sur des géniteurs (Nord vs Sud), en les conditionnant sur une gamme de température réaliste lors de leur phase de maturation et en effectuant un monitoring de la gamétogénèse, pouvant conduire à une production de F1 et à des mesures de performance sur cette descendance. Néanmoins cette expérimentation serait probablement très coûteuse en termes de logistique et de moyens financiers.

### **Apports de la bioénergétique au niveau individuel, et de la physiologie cardiaque**

Il serait très pertinent d'intégrer la bioénergétique au niveau individuel et la physiologie cardiaque sur des poissons juvéniles (soit prélevés in natura, soit des F1 issus de croisements entre géniteurs sauvages au laboratoire), pour approfondir notre compréhension sur les différences inter-individuelles et inter-populationnelles dans la tolérance aux stress thermiques et hypoxiques. Les méthodes de respirométrie in vivo permettront de comparer le métabolisme énergétique entre populations expérimentales, en estimant le métabolisme standard et en activité, le registre métabolique, ie des paramètres fortement liés à la fitness individuelle (Claireaux and Chabot 2016). Les performances cardiaques in vitro, nous paraissent aussi d'un intérêt majeur pour mesurer la capacité du système circulatoire à assurer l'apport d'oxygène aux tissus, point particulièrement critique chez les ectothermes soumis aux hautes températures (Pörtner 2010). Nous proposons ici à mesurer la contractibilité de fibres musculaires issues du ventricule sous différentes conditions de température et oxygénation, et d'approfondir la respiration mitochondriale par la respirométrie haute définition (technologie OROBOROS qui vient d'être acquise dans notre laboratoire).

### **Common garden en marais expérimentaux**

L'objectif de cette dernière approche serait d'établir la signification écologique des traits de

performance mesurés au laboratoire, et de confirmer si de possibles différences entre populations expérimentales peuvent conduire à des traits d'histoire de vie différents. Des flets juvéniles issus de populations Nord et Sud seront transférés dans des marais expérimentaux semi-naturels où des proxies de la fitness (survie et croissance) seront suivis mensuellement sur une période totale de 4 à 6 mois. Les poissons survivants seront sacrifiés, et avec nos différents outils en bioénergétique, nous devrions être capables de comparer les liens et trade-offs entre physiologie, conditions environnementales et traits d'histoire de vie dans les différentes populations expérimentales.



# Bibliographie générale

- Alberto FJ, Aitken SN, Alia R, González-Martínez C, Hänninen H, Kremer A, Lefèvre F, Lenormand T, Yeaman S, Whetten R, Savolainen O (2013) Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology* **19**: 1645-1661
- Amérand A (2006) Approche in vitro des interactions métabolisme énergétique - espèces réactives dérivées de l'oxygène dans le muscle de poissons ; influence d'un facteur environnemental, la pression hydrostatique. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale
- Ando S, Mori Y et al. (1993) Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**(9): 1559-1564
- Antao T, Pérez-Figueroa A, Luikart G (2010) Early detection of population declines : high power of genetic monitoring using effective population size estimators. *Evolutionary Applications* **4**: 144-154
- Anttila K, Dhillon RS, Boulding EG, Farrell AP, Glebe BD, Elliott JAK, Wolters WR, Schulte PM (2013) Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *Journal of Experimental Biology* **216**: 1183-1190
- Assis J, Castilho Coelho N, Alberto F, Valero M, Raimondi P, Reed D, Alvares Serrão E (2013) High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE* **8**(7): e68646
- Attrill MJ, Power M (2002) Climatic influence on a marine fish assemblage. *Nature* **417**: 275-278.
- Brand D (2000) Uncoupling to survive ? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **35**: 811-820
- Brand D, Couture P, Else PL, Withers KW, Hulbert AJ (1991) Evolution of energy metabolism: proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem. J.* **275**: 81-86
- Baumann H, Conover DO (2011) Adaptation to climate changes : contrasting patterns of thermal-reaction-norm evolution in Pacific versus Atlantic silversides. *Proc R Soc B* **278**: 2265-2273
- Bigg GR, Cunningham CW, Ottersen G, Pogson GH, Wadley MR, Williamson P (2008) Ice-age survival of Atlantic cod: agreement between palaeoecology models and genetics. *Proc R Soc B* **275**: 163-172
- Billerbeck JM, Schultz ET, Conover DO (2000) Adaptive variation in energy acquisition and allocation among latitudinal populations of the Atlantic silverside. *Oecologia*, **122**: 210-219.
- Cabral HN, Costa MJ, Salgado JP (2001) Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes ? *Clim Res* **18**:119-126
- Cabral HN, Vasconcelos RP, Vinagre C, França S, Maia A, Reis-Santos P, Lopes M, Ruano M, Campos J, Freitas V, Santos PT, Coasta MJ (2007) Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *J Sea Res* **57**: 209-217
- Calvès I (2011) Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Thèse de doctorat. Université de Bretagne



## Occidentale

- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J (2013) Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar Ecol Prog Ser* **472**: 257-273
- Chaalali A, Beaugrand G, Boët P, Sautour B (2013) Climate-caused abrupt shifts in a European macrotidal estuary. *Estuaries and Coasts* **36**: 1193-1205
- Chang MCJ, Roots BI (1985) The effects of temperature and oxygen acclimation on phospholipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) brain microsomes. *Neurochem. Res.* **10**: 355-375
- Charmentier M, Charmentier G (2006) Relations ioniques, hydriques et osmotiques. pp 5-118. In Gilles R, Anctil M, Baguet F, Charmentier M & G, Gilles Jr. R, Péqueux A, Plumier JC, Sébert P (ed). *Physiologie Animale. de boeck*
- Claireaux G, Chabot D (2016) Responses by fishes to environmental hypoxia: integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. *J Fish Biol* **88**:232–251.
- Conner JK, Hartl DL (2004) A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Conover DO, Clarke LM, Munch SB, Wagner GN (2006) Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology* **69**: 21-47
- Conover DO, Duffy TA, Hice LA (2009) The covariance between genetic and environmental influences across ecological gradients, reassessing the evolutionary significance of countergradient and cogradient variation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1168**: 100-129
- Crain CM, Kroeker K, Halpern BS (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* **11**: 1304-1315
- Dando PR (2011) Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar Ecol Prog Ser* **430**: 183-196
- Dawson TP, Jackson ST, House JI, Prentice IC, Mace GM (2011) Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. *Science* **332**:53–58.
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillette BJ, Ovenden JR (2014) NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* **14**: 209-214
- Dhillon RS, Schulte PM (2011) Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *Journal of Experimental Biology*, **214**: 3639-3648.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, Amara R, Charrier G, Fournier M, Laroche J (2015) Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Poll Bull*, **95**: 634-645.
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* **17**: 1170-1188
- Fangue NA, Richards JG, Schulte PM (2009) Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, **212**, 514-522.
- Fly EK, Hilbish TJ, Wetthey DS, Rognstad RL (2015) Physiology and biogeography: the response of European

- mussels (*Mytilus* spp.) to climate change. *American Malacological Bulletin* **33**(1): 136-149
- Freitas V, Costa-Dias S, Campos J, Bio A, Santos P, Antunes C (2009) Patterns in abundance and distribution of juvenile flounder, *Platichthys flesus*, in Minho estuary (NW Iberian Peninsula). *Aquat Ecol* **43**: 1143-1153
- Galois R, Lagardère F, Richard P (1990) Change in biochemical and otolith microstructure of larval common sole *Solea solea* L: under experimental starvation. *La Mer* **28**: 273-285
- Genova ML, Merlo Pich M, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, Falasca AL, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2004) The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **1011**: 86-100
- Gillanders BM, Elsdon TS, Halliday IA, Jenkin GP, Robins JB, Valesini FJ (2011) Potential effects of climate change on Australian estuaries and fish utilizing estuaries: a review. *Marine and Freshwater Research* **62**: 1115-1131
- Gracey AY, Lee T, Higashi RM, Fan T (2011) Hypoxia-induced mobilization of stored triglycerides in the euryoxic goby *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*, **214**: 3005-3012.
- Gracey AY, Troll JV, Somero GN (2001) Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(4): 1993-1998.
- Grant WS, Waples RS (2000) Spatial and temporal scales of genetic variability in marine and anadromous species: implications for fisheries oceanography. In: Harrison PJ, Parsons TR (eds) *Fisheries oceanography: an integrative approach to fisheries ecology and management*. Fish Aquat Res Ser 4. Blackwell Science, Oxford, p 61–93
- Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004). Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Mol Ecol* **13**: 403-417
- Hampe A, Petit RJ (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett* **8**: 461-467
- Hardie DC, Hutchings JA (2010) Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environ Rev* **18**: 1-20
- Harrald M, Wright PJ, Neat FC (2010) Substock variation in reproductive traits in North Sea cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**: 866-876
- Haugen TO, Vøllestad A (2000) Population differences in early life-history traits in grayling. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 897-905
- Hazel J (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explication ? *Annual review of physiology*, **57**: 19-42.
- Heininger K (2002) Aging is a deprivation syndrome driven by a germ-soma conflict. *Ageing Res. Rev.* **1**: 481-536
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Gronkjaer P, Loeschcke V (2007a) Evolutionary mechanisms shaping the genetic structure of marine fishes: lessons from the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol* **16**: 3104-3118

- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Frydenberg J, Loeschcke V (2007b) Adaptive divergence in a high gene flow environment: Hsc70 variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity* **99**:592–600
- Hemmer-Hansen J, Overgaard Therkildsen N, Meldrup D, Nielsen EE (2014) Conserving marine biodiversity: insights from life-history trait candidate genes in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Conserv Genet* **15**: 213-228
- Hermant M, Lobry J, Bonhommeau S, Poulard JC, Le Pape O (2010) Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J Sea Res* **64**: 45–53
- Hoch FL (1998) Minireview: Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**: 511-532
- Huang L, Tang D, Yappert MC, Borchman D (2006) Oxidation-induced changes in human lens epithelial cells 2. Mitochondria and the generation of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **41**: 926-936
- Hulbert AJ, Else PL (2005) Membranes and the setting of energy demand. *J. Exp. Biol.* **208**: 1593-1599
- Hutchings JA (2011) Old wine in new bottles: reaction norms in salmonid fishes. *Heredity* **106**: 421-437
- Hutchings JA, Swain DP, Rowe S, Eddington JD, Puvanendran V, Brown JA (2007) Genetic variation in life-history reaction norms in a marine fish. *Proceedings of the Royal Society B* **274**: 1693-1699
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A (1999) Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Cir. Res.* **85**: 357-363
- Jensen LF, Hansen MM, Pertoldi C, Holdensgaard G, Mensberg K-LD, Loeschcke (2008) Local adaptation in brown trout early life-history traits: implications for climate change adaptability. *Proceedings of the Royal Society B* **275**: 2859-2868
- Kawecki T, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**(12): 1225-1241
- Keller M, Sommer AM, Portner HO, Abele D (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.* **207**: 2529-2538
- Kerambrun E, Henry F, Cornille V, Courcot L, Amara R (2013) A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* **91**(4): 498-505
- Kokita T (2003) Potential latitudinal variation in egg size and number of a geographically widespread reef fish, revealed by common-environment experiments. *Mar Biol* **143**:593–601.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) high protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**: 15-18
- Kraffe E, Marty Y, Guderley H (2007) Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: role of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J. Exp. Biol.* **210**: 149-165
- Kraffe E, Tremblay R, Belvin S, Le Coz JR, Marty Y, Guderley H (2008) Effect of reproduction on escape responses, metabolic rates and muscle mitochondrial properties in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Mar. Biol.* **156**: 25-38

- Larmuseau MHD, Van Houdt JKJ, Guelinckx J, Hellemans B, Volckaert FAM (2009) Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *J Biogeogr* **36**: 1138-1151
- Larmuseau MHD, Raeymaekers JAM, Hellemans B, Van Houdt JKJ, Volckaert FAM (2010a) Mito-nuclear discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. *Heredity* **105**: 532-542
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 738-748.
- Larsen PF, Nielsen EE, Hansen MM, Wang T, Meier K, Pertoldi C, Loeschcke V (2013) Tissue specific haemoglobin gene expression suggests adaptation to local marine conditions in North Sea flounder (*Platichthys flesus* L.). *Genes Genom* **35**: 541-547
- Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD et al. (2007) Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology*, **16**: 4674–4683.
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, et al (2015) Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Pollut Bull* **95**: 658-664
- Lenoir S, Beaugrand G, Lecuyer E (2011) Modelled spatial distribution of marine fish and projected modifications in the North Atlantic Ocean. *Global Change Biology* **17**: 115-129
- Lesica P, Allendorf FW (1994) When are peripheral populations valuable for conservation ? *Conserv Biol* **9**(4): 753-760
- Lima FP, Ribeiro PA, Queiroz N, Hawkins SJ, Santos AM (2007) Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern ? *Global Change Biology* **13**: 2592-2604
- Limborg MT, Helyar SJ, De BRUYN M, Taylor MI, Nielsen EE, Ogden R, Carvalho GR, FPT Consortium, Bekkevold D (2012) Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*) *Mol Ecol* **21**: 3686-3703
- Marchand J, Evrard E, Guinand B, Cachot J, Quiniou L, Laroche J (2010) Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Mar Environ Res* **70**: 201-209
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013) Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *J Xenobiotics* **3**(s1):e14
- Marcil J, Swain DP, Hutchings JA (2006) Genetic and environmental components of phenotypic variation in body shape among populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Biological Journal of the Linnean Society* **88**: 351-365
- Martinho F, van der Veer HW, Cabral HN, Pardal MA (2013) Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *J Sea Res* **84**: 61-69
- Martinho F, Dolbeth M, Viegas I, Baptista J, Cabral HN, Pardal MA (2010) Does the flatfish community of the Mondego estuary (Portugal) reflect environmental changes ? *J Appl Ichthyol* **26**: 843-852

- Martinho F, Dolbeth M, Viegas I, Teixeira CM, Cabral HN, Pardal MA (2009) Environmental effects on the recruitment variability of nursery species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **83**: 460-468.
- McBryan TL, Anttila K, Healy TM, Schulte PM (2013) Responses to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. *Integrative and Comparative Biology*, **53**(4): 648- 659.
- Meany DL, Poe BG, Navratil M, Moraes CT, Arriaga EA (2006) Superoxide released into the mitochondrial matrix. *Free Radic. Biol. Med.* **41**: 950-959
- Morais P, Dias E, Babaluk J, Antunes C (2011) The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *J Sea Res* **65**: 235-246
- Moritz C, Langham G, Kearney M, Krockenberger A, VanDerWal J, Williams S (2012) Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**:1680-1687
- Munday PL, Warner RR, Monro K, Pandolfi JM, Marshall DJ (2013) Predicting evolutionary responses to climate change in the sea. *Ecol Lett* **16**: 1488-1500
- Nicolas D, Chaalali A, Drouineau H, Lobry J, Uriarte A, Borja A, Boët P (2011) Impact of global warming on European tidal estuaries: some evidence of northward migration of estuarine fish species. *Reg Environ Change* **11**: 639-649
- O'Neill B, De Raedemaeker F, McGrath D, Brophy D (2011) An experimental investigation of salinity effects on growth, development and condition in the European flounder (*Platichthys flesus*. L.). *J Exp Mar Bio Ecol* **410**:39–44.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002) Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* **286**: 135-141
- Pörtner HO, Schulte PM, Wood CM, Schiemer F (2010) Niche dimensions in fishes: an integrative view. *Physiological and Biochemical Zoology* **83**(5): 808-826
- Provan J (2013) The effects of past, present and future climate change on range-wide genetic diversity in northern North Atlantic marine species. *Frontiers of Biogeography* **5**: 60-66
- Ramos S, Ré P, Bordalo AA (2010) Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *J Sea Research* **64**: 473-486u
- Reynolds JD, Dulvy NK, Goodwin NB, Hutchings JA (2005) Biology of extinction risk in marine fishes. *Proceedings of the Royal Society of London B* **272**: 2337-2344
- Rijnsdorp AD, Peck MA, Engelhard GH, Möllmann C, Pinnegar JK (2009) Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES Journal of Marine Science* **66**: 1570-1583
- Rogell B, Hofman M, Eklund M, Laurila A, Hoglund J (2009) The interaction of multiple environmental stressors affects adaptation to a novel habitat in the natterjack toad *Bufo calamita*. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 2267-2277
- Sanford E, Kelly MW (2011) Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science* **3**: 509-535

- Schlame M, Ren M (2006) Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* **580**: 5450-5455
- Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I (2005) Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem. Phys. Lipids* **138**: 38-49
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **39**: 257-288
- Schulte PM, Glemet HC, Fiebig AA, Powers DA (2000) Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-responsive regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 6597–6602
- Schulte PM (2014) What is environmental stress ? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology* **217**: 23-34
- Seebacher F, White CR, Franklin CE (2015) Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat Clim Chang* **5**:61–66.
- Sih A, Ferrari MCO, Harris DJ (2011) Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. *Evolutionary applications* **4**: 367-387
- Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology* **53**(4): 597-608
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* **79**: 1-15
- St Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**: 44784-44790
- Sunday JM, Bates AE, Dulvy NK (2012) Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change*, **2**: 686-690.
- Sylvestre E, Lapointe D, Dutil JD, Guderley H (2007) Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Comparative Physiology b*, **177**: 447-460.
- Teacher AGF, André C, Jonsson PR, Merilä J (2013) Oceanographic connectivity and environmental correlates of genetic structuring in Atlantic herring in the Baltic Sea. *Evolutionary Applications* **6**: 549-567
- Tomanek L (2015) Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* **218**: 1867-1879
- Tortora GG, Derrickson B (2007) *Principes d'anatomie et de physiologie*. de boeck.
- Waples RS, Do C (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resources for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* **3**: 244-262
- Watkins SM, Carter LC, German JB (1998) Docosaehaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. *J. Lipid. Res.* **39**: 1583-1588
- Whitehead A, Crawford DL (2006) Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, **103**(14): 5425-5430.

Whitney CK, Hinch SG, Patterson D a. (2013) Provenance matters: Thermal reaction norms for embryo survival among sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* populations. *J Fish Biol* **82**:1159–1176.

Yu Y, Sutachan JJ, Plesken H, Kelley RI, Schlame M (2005) Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab. Invest.* **85**: 823-830

Yamaoka S, Urade R, Kito M (1988) Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J. Nutr.* **118**: 290-296







# Structure génétique, réponses bioénergétiques et traits de vie, de populations de flets (*Platichthys flesus*) soumises au réchauffement climatique, sur un gradient latitudinal

## Résumé :

Le flet européen (*Platichthys flesus*) est un poisson catadrome dont l'aire de répartition dans le Nord-Est Atlantique s'étend du cercle polaire Arctique jusqu'au Portugal. Depuis quelques décennies, la limite Sud de son aire de distribution remonte le long des côtes Portugaises. Une étude préliminaire sur la biologie des populations de flet a identifié un métabolisme énergétique spécifique pour une population périphérique Sud au Portugal vs des populations situées dans le Golfe de Gascogne et en Manche. Dans la présente étude, nous avons combiné une approche en génétique de populations avec des challenges expérimentaux menés en situation de common garden, pour approfondir nos connaissances sur la différenciation génétique entre les populations de flets sur la façade Atlantique et sur le possible différentiel phénotypique qui pourrait en résulter, particulièrement en terme de bioénergétique et de traits d'histoire de vie.

L'approche génétique considérant le polymorphisme de marqueurs de type microsatellites et de différents gènes candidats met en évidence une différenciation génétique très significative entre les populations de la Péninsule Ibérique et celles situées plus au Nord. Une pression de sélection différentielle s'exerce probablement sur un gène impliqué dans le métabolisme énergétique (GAPDH) et confirme la particularité génétique des populations Ibériques. Un challenge thermique et hypoxique conduit sur des poissons juvéniles et mettant en œuvre une combinaison d'approches ciblées (activités enzymatiques sur des proxys du métabolisme énergétique en aérobose vs anaérobose, et de l'anabolisme) et sans a priori (protéomique par électrophorèse 2D) suggère une meilleure aptitude des populations centrales (Canche et Vilaine, France) et de la population périphérique (Lima, Portugal) à se maintenir respectivement en conditions froide vs chaude et hypoxique. Enfin, l'analyse de normes de réaction des traits de vie pour des stades embryo-larvaires exposés à un gradient thermique met en évidence une probable adaptation locale des populations de flet à leur environnement thermique.

## Abstract:

The European flounder (*Platichthys flesus*) is a catadromous fish species distributed along the North-East Atlantic coasts, from the Arctic polar circle to the Iberian Peninsula. For several decades, the southern limit of its distribution area is shifting towards the North of the Portuguese coast. A preliminary study on the flounder population biology has detected a specific energetic metabolism for a southern peripheral population in Portugal compared to Northern populations located in the Bay of Biscay and in the Channel. In the present study, we have combined population genetics with experimental challenges in the laboratory to improve our knowledge on the genetic structure of flounder populations over Europe, and on the potentially resulting phenotypic differences among populations, mainly considering bioenergetics and life-history traits.

The polymorphism of microsatellite markers and of several candidate genes highlighted a significant genetic differentiation between Iberian Peninsula populations and Northern populations. A thermal and hypoxia challenge has been conducted on flounder juveniles, considering (1) enzymatic activities linked to energetic metabolism (aerobiosis and anaerobiosis) and anabolism, and (2) a proteomic approach; this common garden experiment suggested a higher capacity of central populations (from Canche and Vilaine, France) and of one peripheral Southern population (from Lima, Portugal) to cope with respectively cold condition, warm and hypoxia condition. Finally, the analysis of thermal reaction norms in fish early life history traits, considering embryo-larval stages submitted to a thermal gradient, underlined a possible local adaptation of the flounder populations to their thermal environments.