



**HAL**  
open science

# Conséquences à long terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur la physiologie du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*)

Gwenaëlle Vanderplancke

► **To cite this version:**

Gwenaëlle Vanderplancke. Conséquences à long terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur la physiologie du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*). Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0006 . tel-01955038

**HAL Id: tel-01955038**

**<https://theses.hal.science/tel-01955038>**

Submitted on 14 Dec 2018

**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



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*Mention : Biologie Marine*

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Gwenaëlle Vanderplancke**

Préparée à l'Institut Français de Recherche  
pour l'Exploitation de la Mer

**Conséquences à long-terme  
d'une exposition précoce à  
l'hypoxie sur la physiologie  
du bar Européen  
(*Dicentrarchus labrax*)  
et de la sole commune  
(*Solea solea*)**

**Thèse soutenue le 12 Février 2015**

devant le jury composé de :

**Patrick Prunet**

Directeur de recherche, INRA / *Rapporteur*

**Frédéric Silvestre**

Professeur, Université de Namur / *Rapporteur*

**Elodie Fleury**

Cadre de recherche, Ifremer / *Examinatrice*

**Guy Claireaux**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examineur*

**Stéphane Panserat**

Directeur de recherche, INRA / *Examineur*

**José-Luis Zambonino-Infante**

Directeur de recherche, Ifremer / *Directeur de thèse*

**David Mazurais**

Directeur de recherche, Ifremer / *Directeur scientifique*





## THESE

présentée pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
**Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM)**

Mention : **Biologie Marine**

par

**Gwenaëlle VANDERPLANCKE**

# **Conséquences à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur la physiologie du bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*).**

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (Ifremer),  
Centre de Brest, Technopôle de Brest Iroise, 29280 PLOUZANE (France).

Soutenue le 12 Février 2015 devant le jury composé de :

Patrick Prunet	Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
Frédéric Silvestre	Professeur, Université de Namur	Rapporteur
Elodie Fleury	Cadre de recherche, Ifremer	Examinatrice
Guy Claireaux	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Stéphane Panserat	Directeur de recherche, INRA	Examineur
José-Luis Zambonino	Directeur de recherche, Ifremer	Directeur de thèse
David Mazurais	Directeur de recherche, Ifremer	Directeur scientifique



## Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier l'IFREMER ainsi que la Région Bretagne pour avoir financé cette thèse.

Je voudrais remercier Mr. Patrick PRUNET et Mr. Frédéric SILVESTRE d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit en tant que rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury : Mme. Elodie FLEURY, Mr. Stéphane PANSERAT et Mr. Guy CLAIREAUX d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

En premier lieu, je remercie sincèrement le Docteur José-Luis ZAMBONINO qui a assuré la direction de cette thèse mais qui a avant tout partagé avec moi son amour de la science, ses connaissances et sa bonne humeur quotidienne.

Ensuite, je souhaite remercier celui sans qui je ne serai pas arrivée au bout de cette grande aventure. Oui je parle bien de toi David, el Doctor MAZURAI. Merci pour ta patience, tes conseils, ton aide précieuse et ta gentillesse.

Je suis fière de dire que j'ai travaillé avec vous au cours de ma thèse et j'espère que vous pourrez vous aussi être fiers de moi dans quelques années.

Merci à Chantal CAHU et Pierre BOUDRY pour m'avoir aidée et aiguillée au cours de cette thèse que ce soit scientifiquement ou administrativement.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont acceptées de faire partie de mon Comité de thèse. Pour leurs conseils précieux, les discussions scientifiques que l'on a eues et leur aide dans la réalisation de mes

expérimentations, je tiens à adresser un grand merci à Christel LEFRANCOIS, Charlotte CORPOREAU, Bruno ERNANDE et Guy CLAIREAUX.

Ces remerciements seraient incomplets si j'oubliai de remercier toute l'équipe du Docteur Luca BARGELLONI à l'Université de Padova (Italie) et notamment Serena FERRARESSO et Massimo MILAN pour m'avoir accueillie pendant 1 semaine afin de me familiariser avec la technique des microarray.

Sans poissons cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Je remercie donc M. Grégory RAYMOND de la société Aquastream et M. Ewout BLOM de la société Solea BV pour nous avoir fourni les larves de bar et de sole nécessaires à mes élevages.

Mes remerciements s'adressent bien évidemment à toute l'équipe du laboratoire ARN sans qui cette thèse n'aurait pas eu cette douce saveur. Merci Arianna pour ton aide cérébrale, que ce soit dans la réflexion autour des problématiques liées à ma thèse ou au cours des prélèvements de cerveau. Je te remercie Patou pour ton aide précieuse dans les élevages larvaires, pour avoir pris soin de mes petits et les avoir fait grandir aussi bien. Merci aussi pour ta bonne humeur et ton dévouement. Merci Nico pour avoir géré les élevages et pour ton aide pendant les longues séances de pesées. Merci à Babeth, Marie-Mad, Olivier et Lauriane pour leur savoir-faire et leur aide dans les manip' de « Biomol » ainsi que leur sourire quotidien. Merci Cricri pour ton aide dans les analyses « enzymo », pour ta patience avec moi dans les analyses stats, pour nos séances de mots fléchés et ta bonne humeur constante. Je te remercie Armelle pour tes talents de préleveuse de sang, pour ton aide dans les différents dosages réalisés au cours de cette thèse mais aussi pour ta gentillesse. Merci à toi Magali (ou P'tite Mag, comme tu préfères) pour avoir partagé dans la bonne

humeur le « Bureau des blondes » avec moi. Merci Vévette pour ta grande disponibilité, ton aide précieuse et tes superbes créations caféinées ou laineuses. Je te remercie Hervé pour m'avoir si souvent dépannée en informatique avec toujours la même patience et la même gentillesse.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont soutenues et aidées au cours de cette thèse : Arnaud, Fabrice, Virgile, Véronique, Jean-Yves, Claudie, Philippe et tant d'autres...

En ce moment de remerciements, je pense également à tous les thésards, post-docs et stagiaires que j'ai rencontré au cours de ma thèse et avec qui j'ai toujours partagé de bons moments : Myrina, Romain, Marine, Katia, Eric, Joanna, Flo (ou P'ti Mazu c'est toi qui voit), Marie, Rossana, Amélie, Florentin, Coralie, Fanny, Thomas, Jérémy, Alexia, Pierre, Natascha, Florian, Isabelle et Louis.

Et parce que sans eux la vie ne serait pas pareille, je tiens à remercier très chaleureusement mes amis. Je remercie Caroline, Damien et Manoa pour tous ces bons moments partagés. J'espère qu'il y en aura encore plein d'autres. Je remercie Bryan, Sophie, Yann, Stéphanie et Romain pour toutes les balades motos faites ensemble et toutes ces soirées de détente, de rires, de bons petits plats et de poker que l'on a partagé. A quand les prochaines ?

Et pour finir, je tiens à remercier tout particulièrement ma famille qui m'a soutenue tout au long de ces années et sans qui je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Je tiens à remercier mes parents, Myriam et Jean-Michel, qui m'ont encouragé toutes ces années à faire ce que j'aimais et qui me soutiennent en permanence dans mes choix. Merci à mes frères et à ma sœur, Loïc, Yohan et Yaëlle, pour leur réconfort et leur soutien quand j'en avais besoin. Merci en

particulier à Yaëlle pour ces longues heures passées au téléphone à me rassurer, m'écouter et me faire (sou)rire. Je tiens également à remercier ma belle-famille qui m'a accueillie, et m'accueille encore aujourd'hui, chaleureusement avec leur gentillesse et leur bonne-humeur. Enfin, un grand, très grand, MERCI à celui qui m'a supportée au quotidien pendant ces 3 années (et je sais que ce n'était pas chose aisée) : Mickaël. Merci de m'avoir écouté me plaindre ou m'enthousiasmer, de m'avoir donné confiance en moi et de m'avoir soutenue dans les moments de doute. Merci pour toutes les fois où tu me fais rire même si je n'en ai pas envie, merci pour toutes les petites attentions que tu as pour moi et merci pour tout ce que tu m'as apporté, m'apportes et m'apporteras encore à l'avenir.

Et à tous ceux que j'aurai pu oublier : désolée et surtout merci !!

« On ne demande pas au poisson ce qui arrive sur terre, ni au rat ce qui arrive dans l'eau. »

Proverbe Yoruba



## Sommaire

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>1</b>
------------------------------------	----------

1. Le changement global actuel : un phénomène naturel accentué par le développement des activités anthropiques.....	3
2. Les hypoxies dans le milieu marin naturel .....	5
2.1. Décryptage du phénomène.....	5
2.2. Des zones plus touchées que d'autres.....	6
3. Les poissons : des organismes modèles .....	7
3.1. Le passage de la phase larvaire à la phase juvénile .....	8
3.2. Le développement larvaire et ses conséquences sur les stades ultérieurs : une histoire de programmation métabolique.....	11
3.2.1. Le concept de la programmation métabolique.....	11
3.2.2. La programmation métabolique appliquée aux poissons marins.....	12
4. Les effets de l'hypoxie sur les poissons marins.....	12
4.1. Différents niveaux d'hypoxie pour différents effets.....	13
4.2. Des impacts différents de l'hypoxie en fonction du stade du développement.....	14
4.2.1. L'hypoxie et ses effets sur les jeunes stades.....	14
4.2.2. L'hypoxie et ses effets sur les adultes .....	16
5. Les modèles biologiques choisis : deux espèces marines aux tolérances à l'hypoxie différentes.....	24
5.1. Le bar Européen ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) : une espèce pélagique sensible.....	24
5.1.1. Le cycle de vie du bar Européen.....	24
5.1.2. Le bar et ses rapports avec l'hypoxie.....	25
5.2. La sole commune ( <i>Solea solea</i> ) : une espèce benthique résistante.....	26
5.2.1. Le cycle de vie de la sole commune .....	26
5.2.2. La sole et ses rapports avec l'hypoxie .....	27
6. Les objectifs de la thèse .....	27

<i>Chapitre I : Les effets à court-terme sur les larves de bar, Dicentrarchus labrax.....</i>	<i>29</i>
---	-----------

Résumé.....	31
-------------	----

<b>Article 1 - Exposure to chronic moderate hypoxia impacts physiological and developmental traits of European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) larvae. ....</b>	<b>33</b>
--	-----------

<i>Chapitre II : Les effets à long-terme sur les juvéniles et pré-adultes de bar, Dicentrarchus labax.....</i>	<i>47</i>
--	-----------

Résumé.....	49
-------------	----

<b>Article 2 - Hypoxic episode during the larval period has long term effects on European sea bass juveniles (<i>Dicentrarchus labrax</i>) .....</b>	<b>51</b>
--	-----------

<b>Article en cours de rédaction – La fonction digestive des juvéniles de bar Européen (<i>Dicentrarchus labrax</i>) est affectée par un événement hypoxique intervenu au cours du développement larvaire.....</b>	<b>67</b>
--	-----------

Résumé.....	69
-------------	----

<i>Chapitre III : Les effets d'une exposition précoce à une hypoxie modérée chronique sur la sole (<i>Solea solea</i>).....</i>	<i>81</i>
---	-----------

<b>Article en cours de rédaction - Conditionnement hypoxique au stade larvaire chez la sole: des effets potentiels sur le long-terme .....</b>	<b>85</b>
--	-----------

Résumé.....	87
-------------	----

<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>109</b>
---------------------------------	------------

1. Choix expérimentaux.....	111
-----------------------------	-----

2. Evaluation des effets.....	111
-------------------------------	-----

3. Bilan des principaux résultats .....	111
---	-----

Conséquences à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur la physiologie  
du bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*)

---

4. L'exposition à un environnement hypoxique au stade larvaire imprègne les futurs juvéniles .....	112
4.1. Le cas du bar .....	112
4.2. Le cas de la sole commune .....	115
4.3. Stratégies adaptatives espèces-spécifiques .....	116

<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i> .....	119
---	-----

<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....	125
--	-----

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i> .....	149
-------------------------------------	-----

<i>GLOSSAIRE</i> .....	155
------------------------	-----



---

# *INTRODUCTION GENERALE*

---



## 1. Le changement global actuel : un phénomène naturel accentué par le développement des activités anthropiques

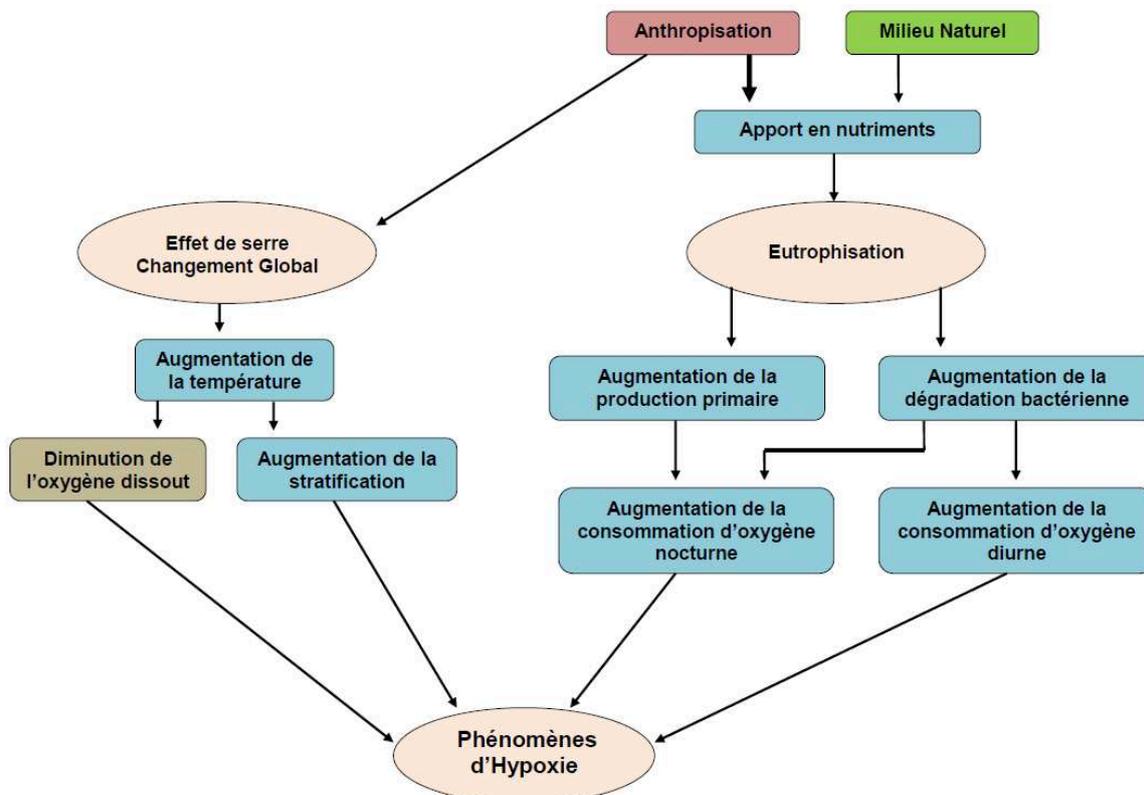
Depuis des milliers d'années, la Terre est soumise à des périodes durant lesquelles les caractéristiques physiques et chimiques de ses écosystèmes ont été modifiées (Jouzel and Debroise, 2004; Tabeaud, 2008). Dans la période actuelle, les changements observés sont principalement des phénomènes naturels saisonniers. Toutefois, depuis la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, ces modifications naturelles ont été accentuées par les activités anthropiques, i.e. d'origine humaine, grandissantes. Ce réchauffement climatique naturel auquel s'ajoutent des perturbations d'origine anthropique caractérise le **changement global**.

L'augmentation intensive des activités anthropiques a provoqué de fortes perturbations des caractéristiques environnementales des écosystèmes terrestres et aquatiques (pour revue, voir : Smith et al., 1999). Ces modifications environnementales se sont notamment traduites par une augmentation des apports d'éléments nutritifs aux milieux, également appelée **eutrophisation**. Cette eutrophisation des milieux est responsable de changements structurels et fonctionnels fondamentaux au sein des écosystèmes terrestres, dans un premier temps, puis aquatiques, principalement les milieux estuariens et côtiers, dans un second temps (Halpern et al., 2008; Smith et al., 1999). L'eutrophisation de ces derniers est un processus naturel nécessaire au développement de la communauté phytoplanctonique indispensable à la survie des écosystèmes aquatiques. A l'heure actuelle, l'eutrophisation d'origine anthropique des milieux côtiers et estuariens engendrent des épisodes plus fréquents d'efflorescence phytoplanctonique qui ont pour conséquences de créer des perturbations importantes dans les environnements naturels, principalement au niveau de la disponibilité en oxygène. Ainsi, cette eutrophisation peut être à l'origine d'épisodes **hypoxiques** (Figure 1), qui correspondent à une diminution de la concentration en oxygène dans le milieu, ou **anoxiques**, qui correspondent à une disparition totale de l'oxygène dans le milieu (Diaz and Rosenberg, 1995; Diaz and Rosenberg, 2001; Essington and Paulsen, 2010).

L'eutrophisation des écosystèmes marins n'est pas la seule conséquence engendrée par les activités anthropiques grandissantes. Ainsi, il est possible de distinguer, entre autres, des changements physiques tels que l'augmentation de la température globale, l'augmentation du niveau de la mer et l'altération de la circulation et de la stratification océaniques ; ainsi que des changements chimiques tels que l'augmentation de la concentration de polluants organiques – comme les pesticides ou les hydrocarbures – et inorganiques – comme les métaux –, l'acidification des océans et la diminution des niveaux d'oxygène dissout (pour

revues, voir : [Doney et al., 2012](#) ; [Brierley and Kingsford, 2009](#) ; [Halpern et al., 2008](#) et [Smith et al., 1999](#)). Ainsi, par exemple, depuis les années 1900, l'élévation globale de la température de surface de 0,75°C a engendré une augmentation globale de 17 cm du niveau de la mer et une diminution globale de 0,1 unité de pH ([Doney et al., 2012](#); [Jouzel and Debroise, 2004](#)). De même, il est considéré que pour chaque augmentation de 1°C de la température, le niveau d'oxygène dissout est diminué de 6%. Ainsi, depuis les années 1900, l'élévation globale de la température de surface de 0,75°C a engendré une diminution globale de 4,5% du niveau d'oxygène dissout dans les océans ([Brierley and Kingsford, 2009](#)). Il est à noter que pour la France, la température moyenne a augmenté de 1,6°C depuis les années 1900 ([Le Roy Ladurie, 2009](#)).

Les changements des paramètres chimiques des écosystèmes marins, comme la teneur en oxygène, vont avoir des impacts beaucoup plus importants que certains paramètres physiques, comme la température, sur les performances physiologiques et la survie de beaucoup d'organismes (pour revue, voir : [Harley et al., 2006](#)). De même, la modification de certains paramètres physiques, comme la circulation océanique qui conditionne le transport des larves, va engendrer des conséquences importantes sur la dynamique des populations (pour revue, voir : [Harley et al., 2006](#)).



**Figure 1 :** Schématisation des principales causes d'apparition de phénomènes d'hypoxie dans le milieu marin.

## 2. Les hypoxies dans le milieu marin naturel

### 2.1. Décryptage du phénomène

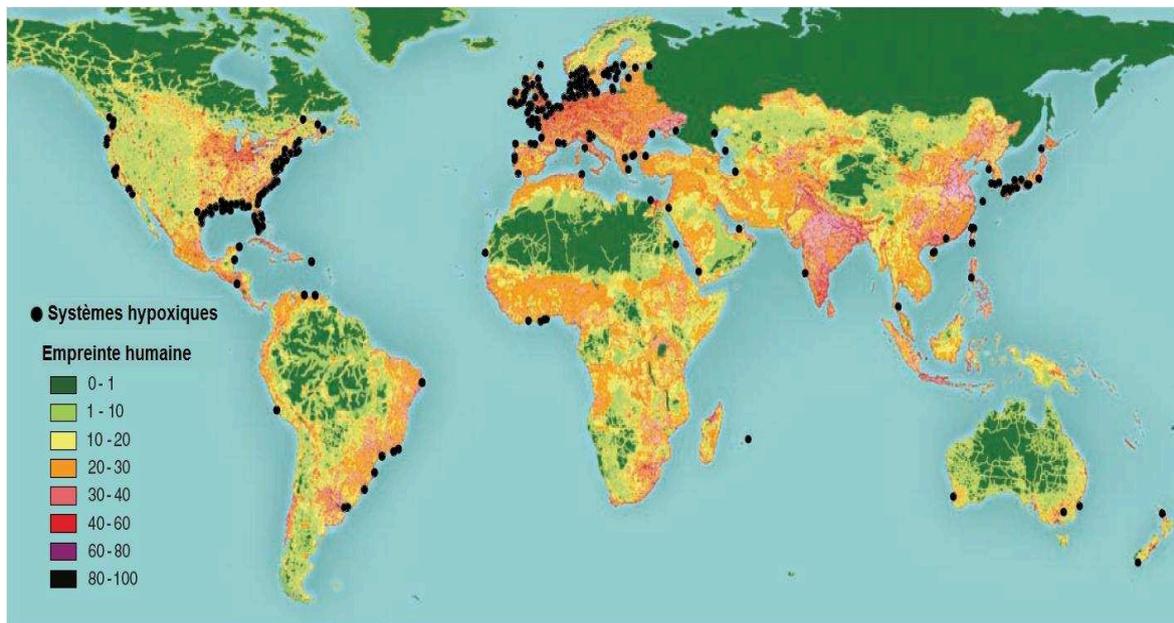
Les épisodes hypoxiques constants sont très rares dans le milieu naturel. A l'inverse, les diminutions temporaires de la disponibilité en oxygène du milieu sont fréquentes et surviennent naturellement au travers du cycle journalier (Thetmeyer et al., 1999). Ainsi, les niveaux d'oxygène d'un milieu peuvent correspondre à un niveau normoxique pendant la journée, sous l'influence de la production photosynthétique de la communauté phytoplanctonique, mais peuvent diminuer et atteindre le seuil hypoxique au cours de la nuit quand tous les organismes, animaux et végétaux, réalisent la respiration et donc consomment l'oxygène présent dans le milieu (Bouget, 2008). Des épisodes hypoxiques peuvent toutefois apparaître pendant la journée suite à un développement phytoplanctonique intense résultant de l'eutrophisation. Ce développement de la communauté phytoplanctonique a pour premier effet de stimuler la production d'oxygène dans le milieu pendant la journée. Cependant et par la suite, la dégradation de cette matière phytoplanctonique par les bactéries a l'effet inverse. En effet, les bactéries qui digèrent les cellules phytoplanctoniques sont de grandes consommatrices d'oxygène. Par conséquent, leur intervention fait diminuer de façon importante le niveau d'oxygène dissout, qui est nécessaire à la survie des organismes dépendants d'une respiration aérobie. Cette diminution du niveau d'oxygène dissout dans l'eau de mer peut créer des épisodes d'hypoxie plus ou moins sévère dans le milieu, particulièrement si le milieu est stagnant, i.e. dont le renouvellement en oxygène dissout n'est dépendant que de la production phytoplanctonique.

Les hypoxies peuvent être mesurées grâce à la concentration en oxygène dans le milieu ou grâce à la **saturation** à l'air, ou solubilité de l'oxygène dans l'eau. Cette saturation est dépendante de la température et de la salinité du milieu considéré et peut être calculée grâce à l'algorithme de Benson and Krause (1984). En condition dite de **normoxie**, ou condition optimale en niveau d'oxygène dissout, la saturation à l'air correspond à 100%. Plus simplement, le niveau d'oxygène du milieu peut être exprimé via la concentration en mg d'O<sub>2</sub> / L d'eau de mer. Il a été convenu d'une valeur seuil sous laquelle le milieu est considéré comme étant en condition hypoxique. Ainsi, les milieux dont les concentrations en oxygène comprises entre 4 et 2 mg d'O<sub>2</sub> / L d'eau de mer, correspondant respectivement, pour une température de 20°C et une salinité de 35 ‰, à 54% et 27% de saturation, sont considérés comme hypoxiques (Diaz and Breitburg, 2009). Les milieux présentant des concentrations en

oxygène inférieures à 2 mg d'O<sub>2</sub> / L d'eau de mer sont considérés comme étant anoxiques, c'est-à-dire dépourvus d'oxygène.

## 2.2. Des zones plus touchées que d'autres

Les épisodes hypoxiques surviennent principalement dans les estuaires et les mers semi-ouvertes qui présentent des eaux plus stagnantes. Les systèmes hypoxiques identifiés ont clairement été associés aux zones eutrophiques, leur distribution correspondant à l'empreinte humaine mondiale (Figure 2) (Diaz and Rosenberg, 2008).



**Figure 2 :** Distribution mondiale des événements hypoxiques.

Les systèmes hypoxiques identifiés ont clairement été associés aux zones eutrophiques, leur distribution correspondant à l'empreinte humaine mondiale (exprimée en %) (d'après Diaz and Rosenberg, 2008).

Ces épisodes hypoxiques plus ou moins sévères des milieux entraînent des diminutions dans la densité de la biomasse qui peuplent un milieu (Wu, 2009) et peuvent entraver la croissance et le développement de beaucoup d'animaux aquatiques tout comme altérer ou endommager les écosystèmes aquatiques (Matozel, 2009). Ces écosystèmes côtiers représentent des zones de nurseries pour beaucoup d'espèces de poissons marins (Beck et al., 2001). Malheureusement, les épisodes hypoxiques surviennent en même temps que l'arrivée des larves de poissons (Breitburg, 1992; Pihl et al., 1991; Pihl et al., 1992) qui, à l'éclosion, ne sont pas totalement développées. Leur développement s'effectue donc au contact direct de l'environnement, ce qui va influencer l'ontogénèse et la survie des individus.

### 3. Les poissons : des organismes modèles

Parmi les organismes marins, les poissons représentent un embranchement aux caractéristiques intéressantes dans l'étude des changements environnementaux. Organismes ectothermes et à l'osmorégulation fine, les poissons sont représentés par plus de 28 000 espèces dont près de 27 000 espèces de poissons dits osseux, ou **Ostéichthyens**, d'environ 1 000 espèces de poissons dits cartilagineux, ou **Chondrichthyens**, et d'une grosse centaine d'espèces de poissons sans mâchoires, ou **Agnathes** (Jobling, 1995a; Nelson, 2006). Au sein de cette diversité d'espèces se distinguent 3 types de poissons : (1) les poissons **pélagiques** qui évoluent librement dans la colonne d'eau, soit proches de la surface soit entre la surface et le fond, (2) les poissons **démersaux** qui sont des espèces très mobiles mais qui restent au-dessus du fond d'où elles tirent leur nourriture, et (3) les poissons **benthiques**, poissons plats qui vivent posés au sol ou qui se déplacent en rasant le fond. Cette distribution spatiale des espèces va notamment influencer leur vulnérabilité à la prédation mais aussi leur capacité à faire face aux changements physico-chimiques de leur habitat.

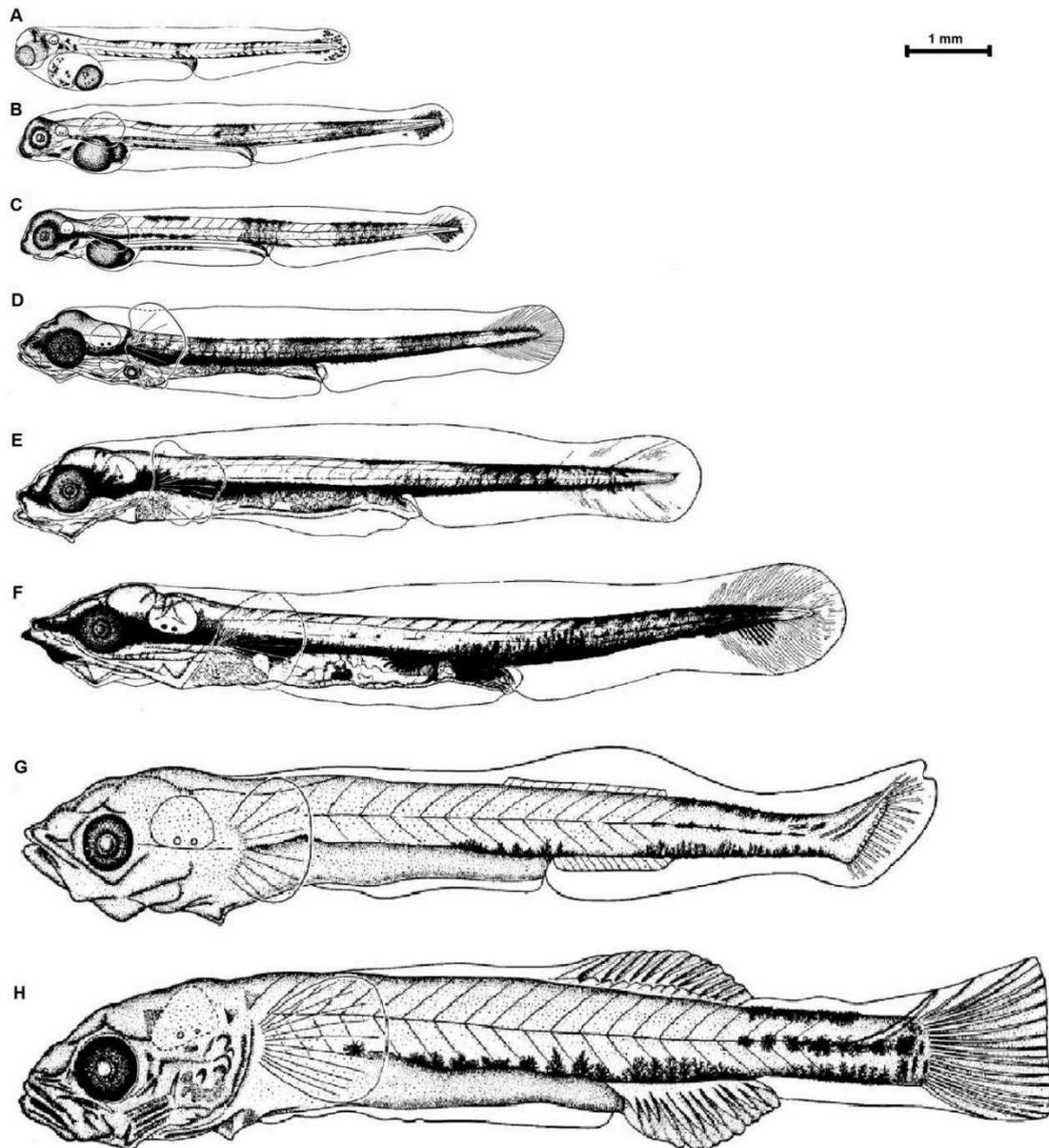
Les poissons présentent 4 phases de développement majeures : la **phase embryonnaire**, la **phase larvaire**, la **phase juvénile** et enfin la **phase adulte**. Chez les espèces de poissons plats, le passage de la phase larvaire à la phase juvénile est marqué par une **métamorphose** (Inui and Miwa, 2012; Rousseau and Dufour, 2012; Youson, 1988). Chaque stade de développement présente des sensibilités différentes aux variations environnementales, les 2 stades les plus sensibles étant les stades embryonnaire et larvaire du fait du grand nombre de fonctions qui se mettent en place pendant ces périodes (Wu, 2009).

Grossièrement, le passage de la phase embryonnaire, qui débute dès la fertilisation, à la phase larvaire va être caractérisée par la mise en place des fonctions primaires (Jobling, 1995a). Le temps d'incubation de l'embryon ainsi que le degré de différenciation de la larve au moment de l'éclosion sont sous l'influence de plusieurs facteurs comme l'espèce considérée, la taille initiale de l'œuf et les conditions environnementales (Jobling, 1995a). Ensuite, le passage de la phase larvaire à la phase juvénile va se traduire par une multitude de changements progressifs à partir de l'éclosion menant à l'apparition définitive de toutes les caractéristiques morphologiques et physiologiques d'un poisson adulte, à l'exception de la maturation sexuelle (Jobling, 1995a). Enfin, le passage de la phase juvénile à la phase adulte va se traduire par la maturation sexuelle des individus qui vont devenir aptes à se reproduire.

### ***3.1. Le passage de la phase larvaire à la phase juvénile***

Au moment de l'éclosion, la larve est transparente, sa bouche et ses mâchoires ne sont pas encore développées, l'œil n'est pas encore pigmenté, la respiration se fait de façon passive par voie cutanée et l'appareil digestif se cantonne à un simple tube droit (Figure 3) (Blaxter, 1969; Jobling, 1995a). Dans les premiers temps de vie de la larve, les premières modifications qui vont s'opérer sont le remplacement des nageoires primaires par des nageoires médianes et la mise en place du squelette. Pour se faire, la seule réserve d'énergie dont dispose la larve, qui ne peut pas encore se nourrir, est le sac vitellin. Au fur et à mesure que les réserves vitellines vont être utilisées par la larve, le sac vitellin va être remplacé par la vessie natatoire, la bouche va s'ouvrir et le système digestif se complexifier afin d'être en mesure d'extraire les sources énergétiques apportées par l'alimentation externe. En parallèle, les yeux vont se pigmenter afin de permettre à la larve d'évoluer dans son milieu et de chasser sa nourriture. De même, au fur et à mesure de la pigmentation du corps de la larve, la respiration cutanée passive va laisser place à une respiration branchiale active. Les temps nécessaires à la mise en place de chaque fonction est variable d'une espèce à l'autre. De façon générale, la première alimentation des larves de poissons se produit entre 3 et 8 jours post-éclosion (2-3 jours post-éclosion pour la sole commune *Solea solea* et 6-7 jours post-éclosion pour le bar Européen *Dicentrarchus labrax*), voir 30 à 40 jours post-éclosion chez certaines espèces comme le saumon (*Salmo salar*) ou la roussette (Spotted dogfish) (Barnabé et al., 1976; Blaxter, 1969; Jobling, 1995a; Palazzi et al., 2006).

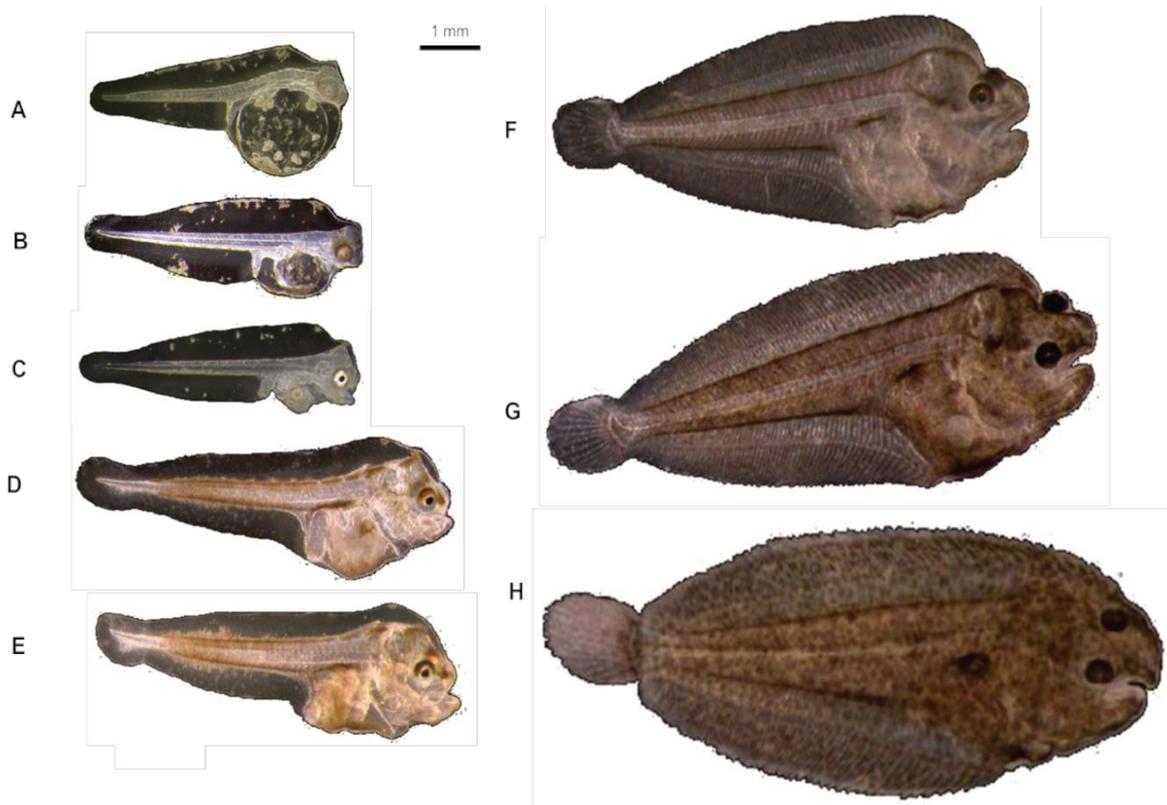
Chez certaines espèces de poissons, et notamment chez les poissons plats, le passage de la phase larvaire à la phase juvénile va notamment être marqué par la métamorphose de la larve (Figure 4). Cette métamorphose va engendrer 2 changements morphologiques importants chez ces individus : la migration d'un des 2 yeux et l'aplatissement du poisson. A la naissance, les larves de poissons plats sont pélagiques et symétriques. Au cours de leur développement leur morphologie va être modifiée et devenir asymétrique (Inui and Miwa, 2012). Les poissons vont alors avoir un œil qui va migrer vers l'autre conduisant à la présence des 2 yeux d'un seul et même côté de la tête. La structure entière du poisson va alors être modifiée pour s'accorder avec cette nouvelle disposition des yeux. Les poissons vont s'aplatir et passer en phase benthique. Cette asymétrie naissante de la morphologie du poisson va s'accompagner d'une pigmentation asymétrique, elle aussi, avec la face dorsale, ou face oculaire, qui va s'assombrir par l'intermédiaire d'une pigmentation plus intense, et la face ventrale, ou face aveugle, qui va s'éclaircir (Inui and Miwa, 2012). Au sein d'une même



**Figure 3 :** Les premières étapes du développement larvaire : l'exemple du bar Européen (*Dicentrarchus labrax*).

**A)** Larve âgée de 1 jour post-éclosion : la larve est transparente, sa bouche et ses mâchoires ne sont pas encore développées, l'œil n'est pas encore pigmenté, la respiration se fait de façon passive par voie cutanée et l'appareil digestif se cantonne à un simple tube droit. **B)** Larve âgée de 5 jours post-éclosion : l'œil commence à se pigmenter et les nageoires pectorales de la larve se forment tandis que la larve continue à s'allonger et à puiser dans ses réserves vitellines. **C)** Larve âgée de 7 jours post-éclosion : la bouche de la larve est ouverte, les yeux sont pigmentés et la larve adopte des épisodes de nage active. **D)** Larve âgée de 12 jours post-éclosion : les réserves vitellines sont totalement résorbées et l'alimentation est totalement établie. **E)** Larve âgée de 20 jours post-éclosion : les vertèbres deviennent visibles. **F)** Larve âgée de 28 jours post-éclosion : les rayons constitutifs de la nageoire caudale commencent à se former dans la région antérieure. **G)** Larve âgée de 35 jours post-éclosion : la nageoire anale poursuit son développement tandis que la nageoire dorsale commence à se former. **H)** Larve âgée de 40 jours post-éclosion : les nageoires dorsale, anale et caudale sont formées. Les écailles apparaîtront vers 75-80 jours après l'éclosion (D'après Barnabé et al., 1976).

espèce, sauf exception des poissons du genre *Psettodes* ou anomalie au cours de la métamorphose, les yeux se retrouvent toujours du même côté de l'animal. Ainsi les espèces dont les 2 yeux vont se situer du côté gauche de l'animal seront dites **senestres**, alors que les espèces dont les 2 yeux vont se situer du côté droit seront dites **dextres** (Inui and Miwa, 2012). Par exemple, le turbot (*Scophthalmus maximus*) est une espèce senestre alors que la sole commune est une espèce dextre.



**Figure 4 :** Les étapes de la métamorphose au cours du développement larvaire chez les poissons plats : l'exemple de la sole commune (*Solea solea*).

**A à G)** Stades larvaires, **H)** Stade Juvénile : **A)** Larve au moment de l'éclosion : la larve est transparente, sa bouche et ses mâchoires ne sont pas encore développées, l'œil n'est pas encore pigmenté, la respiration se fait de façon passive par voie cutanée et l'appareil digestif se cantonne à un simple tube droit. **B)** Larve âgée de 1 jour post-éclosion : la majorité du sac vitellin est résorbé, la mâchoire inférieure se développe et l'œil commence à se pigmenter. **C)** Larve âgée de 3 jours post-éclosion : la bouche de la larve est ouverte, les yeux sont fonctionnels et la larve commence à se nourrir de proies vivantes. **D)** Larve âgée de 9 jours post-éclosion : le muscle commence à se développer au fur et à mesure de la croissance de la larve. **E)** Larve âgée de 15 jours post-éclosion : la métamorphose débute par la nageoire caudale qui devient asymétrique. **F)** Larve âgée de 20 jours post-éclosion : l'œil gauche commence à migrer vers l'œil droit. Le corps continue de s'aplatir. **G)** Larve âgée de 21 jours post-éclosion : l'œil gauche a rejoint la ligne médiodorsale de la tête. Les nageoires dorsale, anale et caudale sont totalement développées et la larve commence à modifier sa nage pélagique pour une position benthique. La pigmentation du corps débute. **H)** Juvénile âgé de 23 jours post-éclosion : les deux yeux sont du même côté de la tête, la pigmentation est achevée, le corps est complètement aplati et l'animal est posé sur le fond.

(D'après Palazzi et al., 2006)

### ***3.2. Le développement larvaire et ses conséquences sur les stades ultérieurs : une histoire de programmation métabolique***

L'**ontogénèse** correspond au développement d'un individu depuis sa conception (fécondation) jusqu'à sa mort. Cette phase du développement représente une période critique durant laquelle l'application d'un stimulus ou la modification des paramètres environnementaux peut engendrer des effets immédiats sur le développement (induction, suppression ou altération de voies physiologiques ou de structures somatiques) pouvant avoir des conséquences physiologiques fonctionnelles sur le long-terme ([Viltart and Vanbesien-Mailliot, 2007](#)).

#### ***3.2.1. Le concept de la programmation métabolique***

La modification sur le long-terme du métabolisme par une perturbation des niveaux cellulaires, moléculaires et biochimiques au cours d'une fenêtre de sensibilité spécifique est définie, chez les mammifères, sous le terme de **programmation métabolique**. Il a ainsi été montré chez les mammifères que l'application d'un stimulus au stade fœtal ou post-natal pouvait engendrer une programmation métabolique se traduisant par une réponse retardée ([Desai and Hales, 1997](#); [Lucas, 1998](#)). Cette réponse retardée est nommée dans la littérature sous le terme « **phénotype programmé** » ([Drake et al., 2005](#)).

Plusieurs mécanismes biologiques pourraient expliquer les réponses à long-terme de la programmation métabolique. Parmi eux, les processus **épigénétiques** (modifications chimiques de l'ADN ou des histones telles que les méthylations, dé-méthylations, acétylations, etc, sans modification de la séquence ADN) peuvent impacter l'empreinte génétique des individus sur le long-terme. Ces processus vont intervenir au cours de la différenciation métabolique, qui est le processus par lequel les cellules d'un individu développent un modèle basal d'expression de gènes stable et inductible ([Waterland and Garza, 1999](#)). Cette différenciation métabolique va dépendre, entre autre, d'enzymes, de facteurs de transcription, d'hormones, de transporteurs transmembranaires, etc. Les modifications épigénétiques engendrées par un stimulus peuvent être transmises, par la mère ou le père, à la descendance si elles se produisent dans les gamètes ([Drake et al., 2005](#); [Ferguson-Smith and Surani, 2001](#); [Waterland and Jirtle, 2004](#)).

La programmation métabolique est donc un processus adaptatif intervenant principalement à un stade précoce du développement et qui se maintient aux stades ultérieurs avec une possibilité de transmission aux futures générations, indifféremment par la lignée

maternelle ou paternelle (Desai and Hales, 1997; Drake et al., 2005; Lucas, 1991; Lucas, 1998; Waterland and Jirtle, 2004).

### *3.2.2. La programmation métabolique appliquée aux poissons marins*

Chez les larves des poissons marins, l'ontogénèse est grandement affectée par les conditions biotiques et abiotiques dans lesquelles elle se déroule du fait de la grande immaturité des larves au moment de leur éclosion, qui naissent à un stade très précoce de leur développement. Ainsi leur ontogénèse va se dérouler, après l'éclosion, au contact direct de leur environnement, conditionnant ainsi la vie entière des individus.

Les effets d'une programmation métabolique chez les poissons ont été étudiés pour la première fois chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par Geurden et al. (2007). Cette étude a montré qu'un stimulus hyperglucidique aigu de 3 jours appliqué dès la première alimentation induisait chez les juvéniles une stimulation de l'expression de deux gènes codant pour des enzymes digestives impliquées dans le métabolisme glucidique, à savoir l'alpha-amylase et la maltase. En revanche, aucune modification du métabolisme hépatique, du transport du glucose, de la glycémie postprandiale ou encore de la croissance n'ont pu être mises en évidence. A la suite de ce travail, une nouvelle étude a montré qu'il était possible d'influencer le métabolisme des acides gras hautement insaturés de juvéniles de bar Européen en appliquant un conditionnement nutritionnel au stade larvaire, entre 6 et 45 jours post-éclosion (Vagner et al., 2007a). Plus récemment, Zambonino-Infante et al. (2013) ont montré chez la sole commune (*Solea solea*) qu'un conditionnement par la température au stade larvaire pouvait influencer la croissance ainsi que la tolérance à l'hypoxie des juvéniles.

Toutefois, les conditionnements précoces appliqués jusqu'ici ont principalement ciblé les effets du régime alimentaire ou de la température. Mais qu'en est-il des effets d'un conditionnement précoce en condition hypoxique ou même d'acidification du milieu ?

## **4. Les effets de l'hypoxie sur les poissons marins**

Les réponses des organismes face à un stress hypoxique ont jusqu'alors été observées à court-terme. De façon générale, il s'agit d'adaptations comportementales, anatomiques et physiologiques qui se mettent rapidement en place et qui s'observent sur des périodes de temps allant de l'heure à la journée. Certaines de ces réponses sont innées, c'est-à-dire génétiquement fixées, et / ou plastiquement développées, c'est-à-dire acquises (Chapman and McKenzie, 2009).

Les effets des épisodes hypoxiques ou anoxiques sur les organismes peuvent aller de la gêne (diminution de la croissance et du développement) à la mort. Ainsi, pour les organismes sessiles qui ne sont pas capables de réduire leur exposition aux faibles niveaux d'oxygène dissout, les épisodes hypoxiques peuvent être létaux alors que les espèces vagiles mettent en place différentes sortes de réponses face à ce type de stress, la première étant la fuite de la zone hypoxique (Essington and Paulsen, 2010; Hofmann et al., 2011).

#### ***4.1. Différents niveaux d'hypoxie pour différents effets***

Il est généralement accepté que les hypoxies en milieu côtier présentent des niveaux d'oxygène dissout de l'ordre de 30% de saturation à l'air (Levin et al., 2009; Middelburg and Levin, 2009; Zhang et al., 2010). Les hypoxies modérées sont décrites à partir de 40% de saturation (Haselmair et al., 2010).

Les effets de l'hypoxie sur les organismes vont être dépendants du niveau d'oxygène du milieu et de l'espèce. Chez les organismes marins, les différents effets observés ont été résumés dans la revue de Hofmann et al. (2011). Ainsi, on peut constater qu'une hypoxie de 40% de saturation va engendrer, chez des individus au stade juvénile ou adulte, des comportements d'évitement et/ou de fuite de la zone concernée chez les espèces pélagiques ou des comportements modifiés pour les espèces benthiques, notamment une diminution des activités.

Les hypoxies sévères peuvent entraîner la mort des organismes, mais généralement les hypoxies conduisent à une adaptation des organismes aux nouvelles conditions de disponibilité en oxygène (Hofmann et al., 2011). La vulnérabilité des poissons marins à l'hypoxie et les adaptations comportementales, anatomiques et physiologiques en résultant vont dépendre des espèces, du stade de développement, de la taille des poissons, de la température de l'eau, de l'intensité de l'hypoxie et du temps d'exposition à ces conditions de faible teneur en oxygène (Chapman and McKenzie, 2009; Diaz and Breitburg, 2009; Pichavant et al., 2000; Shimps et al., 2005). De plus, la tolérance des poissons face à un épisode hypoxique est dépendante de leur histoire de vie. En effet, des poissons ayant été exposés précédemment à des niveaux bas en oxygène dissout mais non létaux présentent une tolérance à l'hypoxie plus élevée que des poissons n'ayant jamais été confrontés à l'hypoxie. Cette augmentation de la tolérance à l'hypoxie est attribuée à des changements opérés au cours d'une exposition antérieure suffisamment longue (Jobling, 1995b). La durée de la période d'exposition nécessaire pour modifier la tolérance à l'hypoxie va dépendre de l'espèce considérée, du niveau d'hypoxie appliqué pendant l'acclimatation et de la durée de

l'exposition. Par exemple, [Fu et al. \(2011\)](#) ont montré que, chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), une acclimatation pendant 48h à 2.78% de saturation à l'air augmentait la tolérance à l'hypoxie des individus 48h après l'exposition. De même, [Yang et al. \(2013\)](#) ont montré que, chez le silure (*Silurus meridionalis*), une acclimatation nocturne pendant 15 jours à 36.3% de saturation à l'air augmentait la tolérance à l'hypoxie des individus 48h après l'exposition. Ces effets d'une acclimatation à l'hypoxie sur la tolérance à l'hypoxie des individus n'a, toutefois, été testée que sur des périodes de temps relativement proches de la période d'acclimatation. On peut donc se demander si ces différences peuvent perdurer sur des périodes de temps plus longues.

#### ***4.2. Des impacts différents de l'hypoxie en fonction du stade du développement***

De nombreuses études ont analysé les réponses des poissons face à un stress hypoxique. Cependant, il est difficile de comparer ces études entre elles du fait des différences observées dans les niveaux et les temps d'exposition à l'hypoxie, la taille et l'âge des individus, les espèces étudiées, la nature du régime alimentaire ou la température appliquée. Toutefois, il est généralement entendu que l'oxygène agit comme un facteur limitant de la croissance.

##### ***4.2.1. L'hypoxie et ses effets sur les jeunes stades***

L'hypoxie a des effets divers sur les embryons, les larves et les juvéniles de poissons ([Ishibashi et al., 2007](#); [Jobling, 1995b](#); [Matozel, 2009](#); [Ozernyuk, 2011](#); [Pelster, 2002](#); [Thetmeyer et al., 1999](#)). Ainsi, l'hypoxie affecte directement ou indirectement :

- 1) La croissance et le développement du poisson via une modification de la prise alimentaire
- 2) La survie de l'organisme via une modulation de son taux métabolique énergétique (dépression métabolique)
- 3) Le flux sanguin via une modification de la viscosité du sang par un changement de l'hématocrite et du nombre de globules rouges
- 4) Le métabolisme anaérobie via l'activité d'enzymes spécifiques
- 5) L'activité cardiaque et l'angiogenèse
- 6) L'hypoxémie.

Certains de ces effets ont eux-mêmes des conséquences sur la capacité d'un individu à tolérer une hypoxie. Selon les espèces, la taille de l'individu, qui peut être elle-même

impactée par une exposition précoce à l'hypoxie, joue un rôle majeur dans la tolérance face à l'hypoxie. Ainsi chez les poissons tambours, *Leiostomus xanthurus*, les individus de petite taille sont plus résistants face à une hypoxie que les individus de grande taille (Shimps et al., 2005). A l'inverse, chez le Menhaden de l'Atlantique, *Brevoortia tyrannus*, les individus de grande taille sont plus tolérants aux épisodes hypoxiques que les individus de petite taille (Shimps et al., 2005).

#### 4.2.1.1. Les effets sur le développement et la croissance

Plusieurs études menées sur plusieurs espèces de poissons ont démontré que des changements intervenaient dans le développement embryonnaire et le taux d'éclosion des œufs exposés à l'hypoxie. Ces changements ont des répercussions sur le développement embryonnaire, la croissance, le taux de survie, les malformations et le développement endocrinien des larves et la qualité des juvéniles qui en résultent (études sur les truites – *Salmo trutta* – de Massa et al. (1999) et Roussel (2007), ou sur la dorade grise – *Acanthopagrus butcheri* – de Hassell et al. (2008), ou sur le poisson zèbre – *Danio rerio* – par Padilla and Roth (2001), Shang and Wu (2004) et Shang et al. (2006), ou sur le saumon Atlantique (*Salmo salar*) – de Hamor and Garside (1976), ou encore sur la rousette – *Scyliorhinus canicula* – de Diez and Davenport (1990)).

Chez les larves et juvéniles de certains poissons, l'exposition à une hypoxie peut être responsable d'un ralentissement du développement et de la croissance. Cette diminution de la croissance au cours d'un épisode hypoxique peut avoir pour origine 2 processus métaboliques (Pichavant et al., 2001) : (1) une augmentation du coût énergétique lié à la ventilation, ce qui diminue la quantité d'énergie disponible pour la croissance ou (2) une diminution de l'alimentation dans le but de sauvegarder l'énergie pour le métabolisme standard, 60% de l'énergie totale du poisson étant consacrée à la prise alimentaire, la digestion et l'assimilation. Cette diminution de l'alimentation impacte le développement de l'organisme en limitant l'apport d'éléments nutritifs nécessaires à la croissance de l'individu. Ainsi, chez des juvéniles de bar Européen il a été observé des diminutions significatives de la croissance et de la prise alimentaire des individus placés pendant un mois à une hypoxie modérée à 40% de saturation à l'air (Thetmeyer et al., 1999).

#### 4.2.1.2. Les effets au niveau du métabolisme énergétique

Il a été montré que, chez de nombreuses espèces, l'intensité de la consommation d'oxygène des jeunes stades de vie d'un organisme augmente ostensiblement alors que dans les stades ultérieurs de développement, i.e. pendant la période de croissance des juvéniles,

l'intensité de cette consommation diminue considérablement (Ozernyuk, 2011). En effet, pendant les périodes de développement embryonnaire et larvaire, le taux d'absorption de l'oxygène augmente plus rapidement que la prise de masse de l'individu, ce qui a pour effet d'élever l'intensité respiratoire. A l'inverse, chez les juvéniles, la prise de masse de l'individu dépasse le taux d'absorption de l'oxygène, ce qui correspond à une diminution de l'intensité respiratoire.

Chez des espèces de poissons plats, la sensibilité des jeunes individus aux conditions environnementales a été observée jusqu'à la fin de la **métamorphose**. Au cours de cette métamorphose, les larves de poissons plats montrent une sensibilité plus élevée aux stress environnementaux, certainement due à une activation du métabolisme énergétique et une demande en oxygène plus forte pour assurer ce changement physique (Ishibashi et al., 2005; Ishibashi et al., 2007; Pfeiler, 2001).

#### 4.2.1.2. Les effets au niveau du système cardiovasculaire

Les espèces marines élevées sous hypoxie révèlent une augmentation de leur **hématocrite**, c'est-à-dire de la proportion totale du volume sanguin occupé par les globules rouges (donc une augmentation du nombre ou de la taille de leur globule rouge) et une diminution du flux sanguin par augmentation de la viscosité du sang, une diminution de leur taux métabolique et une respiration anaérobie efficace (Matozel, 2009). De même, l'activité cardiaque ou l'angiogenèse (formation des vaisseaux sanguins) chez les embryons et larves de poissons peuvent être affectées par un environnement hypoxique (Pelster, 2002). Ainsi, il a été montré chez les larves du poisson zèbre qu'une exposition à une hypoxie modérée de 7 jours pouvait engendrer une réduction de l'activité cardiaque, du débit cardiaque et de la perfusion des organes et une amélioration de la formation de quelques vaisseaux sanguins peu de temps après l'éclosion. De plus, une exposition à une hypoxie modérée peut engendrer une **hypoxémie**, c'est-à-dire une réduction de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine (Hb). Cette hypoxémie est responsable de l'augmentation de la production des tissus cardiaques dans les jeunes stades de développement. Ainsi, l'activité cardiaque peut être stimulée environ 1 jour après l'éclosion en condition hypoxique contre 2 semaines en condition de normoxie (Pelster, 2002).

#### *4.2.2. L'hypoxie et ses effets sur les adultes*

Les effets de l'hypoxie sur les stades adultes s'organisent chez les individus de façon hiérarchique. Ainsi, les poissons adultes confrontés à un épisode hypoxique vont dans un premier temps adapter leur comportement à la situation. En complément des réponses

comportementales, les individus vont effectuer des ajustements anatomiques dans le but d'extraire au mieux l'oxygène du milieu. Ensuite, si les réponses comportementales et/ou anatomiques ne suffisent pas les individus vont déclencher les réponses physiologiques.

Dans tous les cas, la mise en place de chacune des réponses va dépendre de l'histoire de vie des individus. En effet, il a été montré chez certaines espèces de poissons qu'un conditionnement par la température au stade larvaire augmente la tolérance à l'hypoxie chez les poissons adultes (Johnston et al., 1996; Zambonino-Infante et al., 2013). Ainsi, les poissons ayant connu des conditions environnementales modifiées au cours de leur ontogénèse seraient plus résistants à l'hypoxie et enclencheraient leurs mécanismes de réponse face à l'hypoxie plus tardivement.

#### 4.2.2.1 Les réponses comportementales et les ajustements anatomiques associés

Si la concentration en oxygène dissout est suffisamment éloignée du niveau létal, les réponses des organismes face à l'hypoxie seront principalement comportementales pour éviter la zone hypoxique. Ainsi, face à un épisode hypoxique, les poissons montrent 4 types majeurs de réponses comportementales, à savoir : (1) le changement vertical et/ou horizontal de l'habitat (Diaz and Breitburg, 2009), (2) le changement de leur activité, notamment leur activité de nage, dans le but de diminuer leur consommation en oxygène (Chapman and McKenzie, 2009), (3) l'augmentation de leur respiration (Chapman and McKenzie, 2009; Jobling, 1995b) et (4) l'augmentation de l'utilisation de la respiration aquatique de surface (ASR, Aquatic Surface Respiration) (Dalla Via et al., 1998; Kramer, 1987). Les poissons vont adapter leurs réponses comportementales en fonction des contraintes physiologiques qui vont être engendrées par l'hypoxie. Chez les poissons, ces réponses comportementales vont dépendre de l'espèce et du contexte. Ainsi, chez le bar Européen, l'hypoxie ne va pas affecter sa locomotion mais va modifier sa capacité de réponse à un stimulus (Lefrancois and Domenici, 2006) ainsi que sa distribution verticale dans la colonne d'eau (Schurmann et al., 1998). En revanche, la sole commune exposée à l'hypoxie va diminuer son activité de nage spontanée ainsi que son rayon d'activité avant de s'immobiliser entièrement sur le substrat au moment où son métabolisme anaérobie va se déclencher (vers 20% de saturation à l'air) (Dalla Via et al., 1998). De même, toutes les espèces ne pratiquent pas l'ASR. Ainsi le bar Européen et la sole commune ne pratiquent pas l'ASR alors que le mulot gris (*Liza aurata*), la gambusie (*Gambusia affinis*) et les gobies (*Gobiidae* ; Pisces) utilisent ce comportement

comme alternative à une diminution du niveau d'oxygène (Cech et al., 1985; Dalla Via et al., 1998; Domenici et al., 2007; Gee and Gee, 1995).

Certaines des réponses comportementales évoquées peuvent engendrer des modifications anatomiques dans le but d'améliorer l'efficacité de la respiration. Ainsi, la mise en place de l'ASR va généralement être accompagnée de modifications morphologiques au niveau de la tête et de la bouche des individus (Saint-Paul, 1984; Winemiller, 1989). De plus, un accroissement de la vascularisation de la cavité buccale va s'effectuer dans le but d'augmenter l'utilisation de l'oxygène atmosphérique via l'ASR (Diaz and Breitburg, 2009; Olson et al., 1995). Additionné aux modifications anatomiques liées à l'ASR, les poissons vont avoir également la possibilité de mettre en place des Organes Respiratoires Accessoires (ARO, Accessory Respiratory Organs) (Olson et al., 1995) également appelé Organes de Respiration Aérienne (ABO, Air-Breathing Organs) (Chapman and McKenzie, 2009).

Au final, si toutes ces réponses comportementales et ces ajustements anatomiques ne suffisent pas à assurer un maintien du budget énergétique, des mécanismes régulateurs vont être mis en place. De la sorte, des ajustements physiologiques et biochimiques ainsi que des défenses moléculaires vont apparaître (Chapman and McKenzie, 2009).

#### 4.2.2.2. Les adaptations physiologiques

Face à un niveau d'hypoxie qui deviendrait critique pour l'organisme, les poissons vont mettre en place un certain nombre d'adaptations physiologiques dans le but principalement de réduire leur taux métabolique tout en augmentant leur tolérance aux perturbations ioniques et du pH (Diaz and Breitburg, 2009).

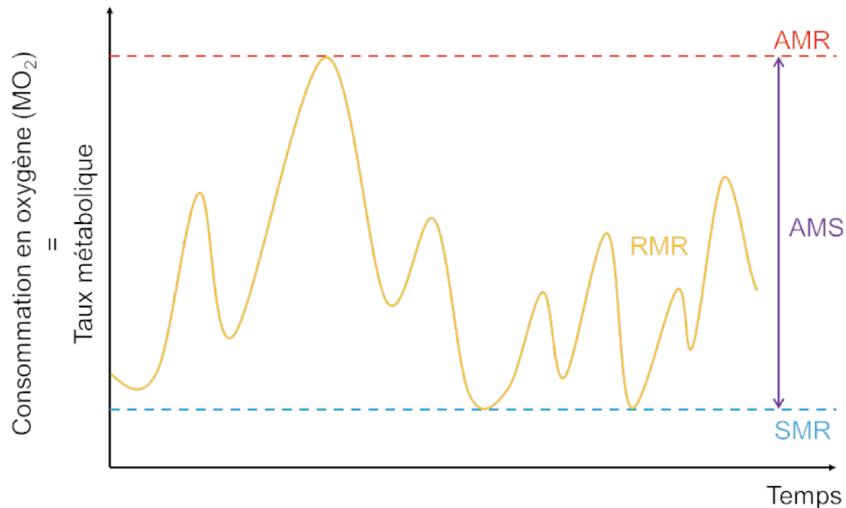
##### ➤ *Le métabolisme de façon générale*

Les épisodes hypoxiques peuvent engendrer des modifications du taux métabolique des organismes. Les organismes utilisent 3 mécanismes principaux pour maintenir leur balance énergétique cellulaire face à une exposition à une hypoxie modérée (Richards, 2009) : (1) l'augmentation de l'absorption de l'oxygène depuis l'environnement hypoxique dans le but de maintenir un minimum de production d'ATP en **aérobie** (dans un milieu contenant de l'oxygène), (2) une forte activation d'un moyen de production d'ATP sans dépendance à l'oxygène, c'est-à-dire en **anaérobie** (dans un milieu ne contenant pas d'oxygène), cette production restant beaucoup moins efficace que la production d'ATP en condition aérobie, et (3) une réduction dans la demande métabolique à travers une suppression de la régulation du taux métabolique.

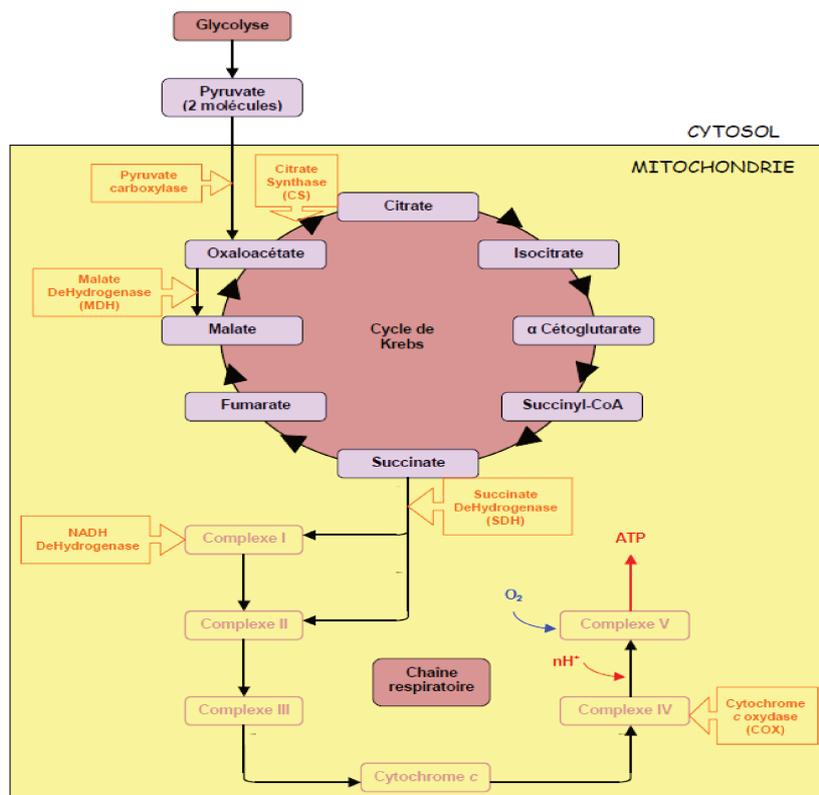
Le **taux métabolique** correspond au taux de consommation en énergie, sous la forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate), de l'organisme. Il est le résultat du bilan entre le **catabolisme**, i.e. l'ensemble des réactions de dégradations moléculaires produisant de l'énergie, et l'**anabolisme**, i.e. l'ensemble des réactions de synthèse des métabolites essentiels à partir des éléments de base, qui consomment de l'énergie. L'évolution de la consommation en oxygène, ou  $MO_2$ , d'un organisme peut être considérée comme un proxy valable de ce taux métabolique. De manière générale, cette consommation en oxygène est plus élevée chez les poissons pélagiques, comme le bar Européen, que chez les poissons benthiques, comme le turbot (*Scophthalmus maximus*) ou la sole commune du fait des activités de nage différentes entre ces espèces (Pichavant et al., 2001).

Il existe 3 types de taux métabolique, estimés en fonction des consommations en oxygène. Ainsi on différenciera le **taux métabolique actif** (AMR, Active Metabolic Rate), qui correspond au taux métabolique maximum observé chez un animal lors d'une activité de nage soutenue, le **taux métabolique de routine** (RMR, Routine Metabolic Rate), qui correspond au taux métabolique d'un animal calme préservé des stimuli extérieurs et dont les mouvements sont ajustés en fonction des conditions, et le **taux métabolique standard** (SMR, Standard Metabolic Rate), qui correspond au taux métabolique minimum observé chez un animal à jeun et au repos, i.e. le moins actif possible (Fry, 1971; Hoar et al., 1979; Lapointe et al., 2006; Matozel, 2009). La différence existante entre le taux métabolique standard (taux métabolique minimum) et le taux métabolique actif (taux métabolique maximum) pour un individu donné correspond au **registre métabolique aérobie** (AMS, Aerobic Metabolic Scope) de cet individu (Figure 5). Le registre métabolique aérobie correspond à la quantité d'énergie aérobie potentiellement disponible pour un organisme à un moment donné, dans un environnement précis et selon son état physiologique (Fry, 1971; Lapointe et al., 2006). C'est à l'intérieur du registre métabolique aérobie qu'oscille le taux métabolique de routine.

Le taux métabolique d'un animal varie au cours d'une seule journée. En effet, la prise de nourriture, par exemple, engendre une augmentation du taux métabolique et du taux de consommation en oxygène, la durée et l'intensité de cette augmentation dépendant de la quantité et de la qualité de la nourriture (Jobling, 1995b; Matozel, 2009). De nombreuses conditions environnementales, telles que la température et la concentration en oxygène dans le milieu, peuvent affecter le taux métabolique de l'animal. Ainsi, une augmentation de la température de l'eau engendre une augmentation du taux métabolique de l'animal. A l'inverse, une diminution de la concentration en oxygène dans l'eau entraîne une diminution



**Figure 5 :** Représentation schématique du taux métabolique maximum ou taux métabolique actif (AMR) et du taux métabolique minimum ou taux métabolique standard (SMR). Le taux métabolique actif (AMR, Active Metabolic Rate) en rouge et le taux métabolique standard (SMR, Standard Metabolic Rate) en bleu constituent les limites définissant le registre métabolique aérobie (AMS, Aerobic Metabolic Scope) en violet, à l'intérieur duquel varie le taux métabolique de routine (RMR, Routine Metabolic Rate) en orange.



**Figure 6 :** Localisation des enzymes spécifiques au métabolisme aérobie intervenant dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire: la Citrate Synthase (CS) et la Cytochrome c OXydase (COX).

du taux métabolique de l'organisme (Claireaux and Lagardere, 1999; Claireaux et al., 2000; Jobling, 1995b; Lapointe et al., 2014; Lefrancois and Claireaux, 2003; Matozel, 2009). En condition d'hypoxie, cette diminution du taux métabolique résulte généralement d'une diminution de la prise alimentaire (Pichavant et al., 2001).

### ➤ *Les mitochondries*

Les mitochondries sont le centre de production de l'énergie sous forme d'ATP (O'Brien, 2011). La capacité métabolique aérobie d'un individu peut être mesurée grâce à l'activité maximale d'enzymes spécifiques à l'aérobie localisées dans la matrice et la membrane mitochondriales : la Citrate Synthase (CS), qui intervient dans le cycle de Krebs, et la Cytochrome c OXYdase (COX), qui intervient dans la chaîne respiratoire (Figure 6) (O'Brien, 2011). Ces deux enzymes peuvent permettre l'estimation du nombre de mitochondries ainsi que leur composition et leurs propriétés (Guderley, 2007; Lucassen et al., 2003), notamment grâce à l'étude du rapport des activités CS/COX (Ibarz et al., 2010; Lucassen et al., 2003).

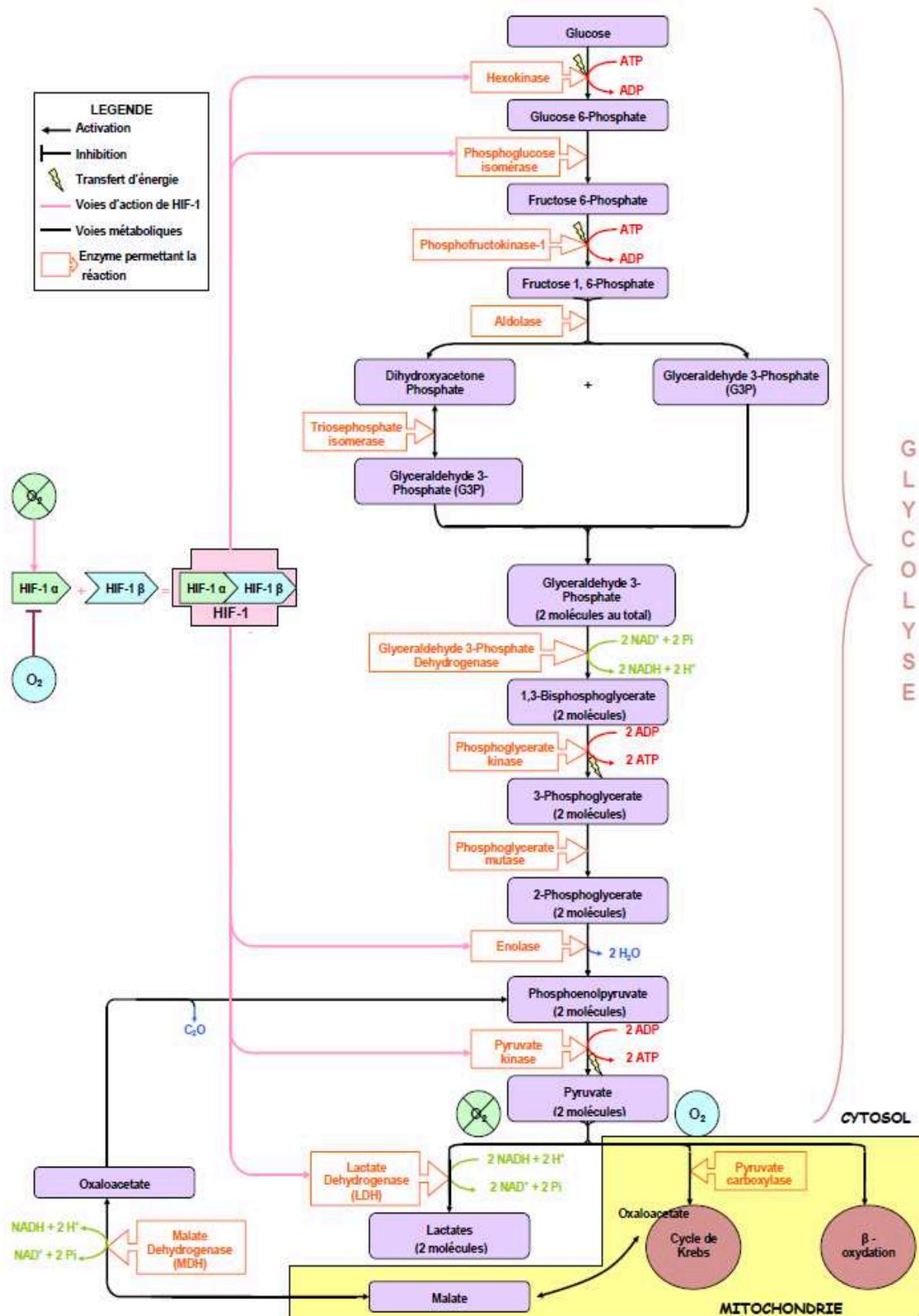
Le nombre de mitochondries au sein des tissus d'un organisme est inversement proportionnel à l'intensité de l'absorption d'oxygène dans l'organisme, i.e. moins la consommation en oxygène est élevée dans les tissus et plus la concentration en mitochondries à l'intérieur de ces tissus sera forte (Ozernyuk, 2011). De plus, des modifications de la composition de la membrane mitochondriale peuvent être responsables de changements qualitatifs dans la fonction mitochondriale. Par exemple, l'augmentation de la synthèse des phospholipides entraîne une augmentation de l'activité de la CS (O'Brien, 2011).

### ➤ *Les acteurs moléculaires*

HIF-1, pour Hypoxia-Inducible Factor 1, est un facteur de transcription hétérodimérique très conservé au sein des espèces (Wu, 2009). Sous sa forme active le facteur de transcription HIF-1 est composé de 2 sous-unités : une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . En présence d'oxygène, la sous-unité  $\alpha$  est très rapidement dégradée ce qui rend le facteur de transcription inactif (Wu, 2002). En absence d'oxygène, la sous-unité  $\alpha$  n'est plus dégradée et se lie à la sous-unité  $\beta$  pour former un complexe protéique. Ce complexe, capable de se lier à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), reçoit des signaux de capteurs moléculaires qui génèrent des molécules signal indiquant un faible taux d'oxygène présent dans le milieu (Wu, 2002). En réponse à ces molécules signal, la protéine HIF-1 va alors réguler la transcription d'un certain nombre de gènes (inductibles par hypoxie) responsables des ajustements biochimique et physiologiques nécessaires à l'adaptation face au stress hypoxique (Wu, 2009). Ce facteur de

transcription régule directement ou indirectement la transcription de plus de 100 gènes aux fonctions diverses (Almeida-Val et al., 2011; Wu, 2002; Wu, 2009). Parmi eux, on trouve le gène codant une hormone glucoprotéique : l'EPO (ErythroPOieitin), qui régule l'érythropoïèse, i.e. la formation des Globules Rouges (GR ou RBC, Red Blood Cell). Son activation, qui se produit dans le rein chez les poissons et dans la moelle osseuse chez l'Homme (Lai et al., 2006), engendre une augmentation du nombre de globules rouges dans les vaisseaux sanguins dans le but d'augmenter l'apport en oxygène. Dans le même but, HIF-1 régule le gène du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui est responsable de l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette protéine permet également l'expression de gènes et d'enzymes intervenant dans le métabolisme du glucose et le métabolisme anaérobie. Ainsi, HIF-1 active le gène codant le transporteur GLUT (GLUcose Transporter) qui régule le transport du glucose. De même, l'activation de diverses enzymes glycolytiques, telles que l'Hexokinase, la Phosphofruktokinase, l'Enolase et la Pyruvate Kinase (PK), permet de stimuler la glycolyse. Cette stimulation va augmenter la concentration intracellulaire en pyruvate, qui est le produit final de la glycolyse. En conditions aérobies, ce pyruvate va subir des phosphorylations oxydatives dans le cycle de Krebs. En conditions anaérobies, le pyruvate est alors transformé en lactates sous l'action de la Lactate DésHydrogénase (LDH), qui est placée sous le contrôle de HIF-1. Cette activation de la LDH a pour effet d'activer et d'augmenter le métabolisme anaérobie (Figure 7). La LDH est une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme énergétique. Elle catalyse l'interconversion du pyruvate en lactate et régule les concentrations de ces 2 métabolites en fonction de la disponibilité en oxygène. Chez les vertébrés, la forme active de la LDH est un tétramère composé de 4 sous-unités polypeptidiques encodé par 2 gènes : le LDH-A et le LDH-B. En cas de normoxie, donc en condition aérobie, l'isoforme LDH-B4, ou isozyme B4, est la plus active et permet la transformation du lactate en pyruvate dans les tissus bien oxygénés comme le muscle cardiaque. A l'inverse, en cas d'hypoxie, donc en condition anaérobie, l'isoforme LDH-A4, ou isozyme A4, est activée par HIF-1 et est responsable de la conversion du pyruvate en lactate dans les tissus pauvrement vascularisés dont la pression partielle en oxygène est faible, à l'instar des muscles squelettiques (Almeida-Val et al., 2011).

Ces activations de la glycolyse et du métabolisme anaérobie permettent de maintenir la production d'ATP malgré l'absence d'oxygène. Cependant cette production d'ATP en condition anaérobie reste beaucoup moins efficace que la production d'ATP en aérobie puisqu'elle permet un gain de 2 molécules d'ATP grâce à la glycolyse alors qu'en condition



**Figure 7 : Voies d'action du facteur de transcription hétérodimérique HIF-1.**

En cas d'hypoxie, le facteur de transcription hétérodimérique HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor - 1) est activé et stimule la glycolyse et le métabolisme anaérobie.

aérobie la glycolyse (2 molécules) associée au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire (34 molécules) permettent de gagner 36 molécules d'ATP (Jobling, 1995b; Richards, 2009).

## **5. Les modèles biologiques choisis : deux espèces marines aux tolérances à l'hypoxie différentes**

Parmi les espèces de poissons marins dont l'élevage en milieu expérimental contrôlé est totalement maîtrisé, le bar Européen et la sole commune représentent deux espèces modèles. Ces deux espèces, qui possèdent une durée de développement larvaire similaire (d'environ 40 jours), peuvent rencontrer au cours de leur développement larvaire dans le milieu naturel des épisodes hypoxiques. Toutefois, le bar Européen et la sole commune présentent des sensibilités différentes à l'hypoxie.

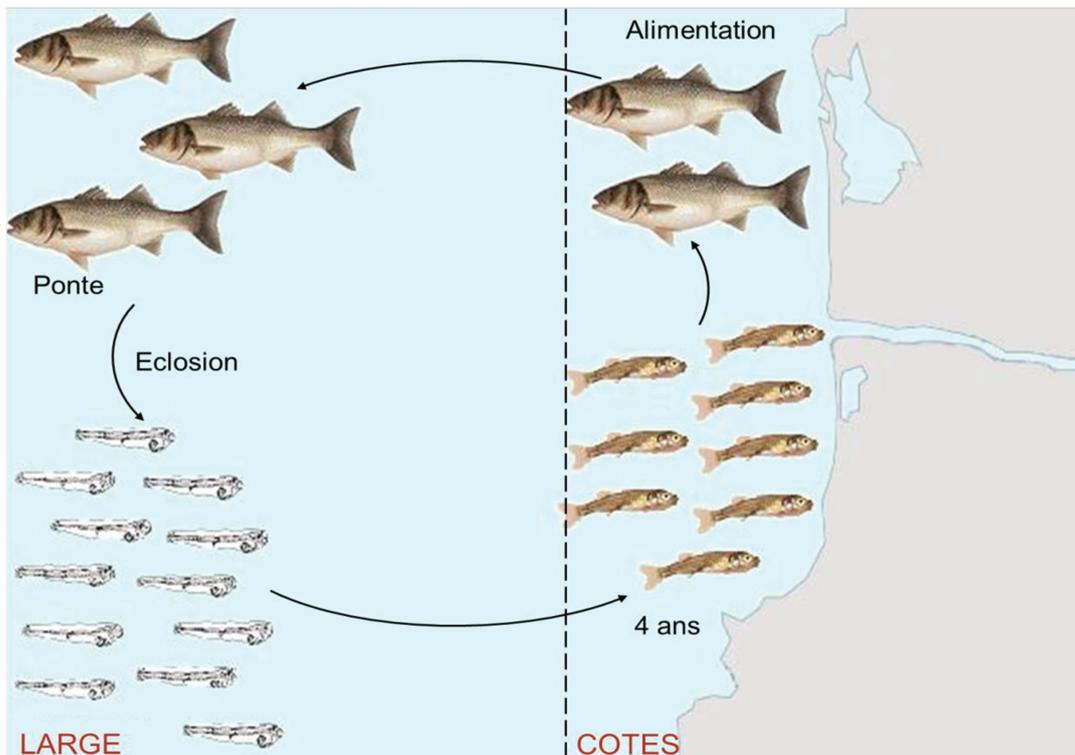
### **5.1. Le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) : une espèce pélagique sensible**

Le bar Européen, qui est un poisson pélagique de la Famille des Moronidae, est un bon modèle de poisson marin de milieu tempéré. Considéré comme espèce sensible à l'hypoxie (Pichavant et al., 2003; Terova et al., 2009), son élevage en milieu expérimental contrôlé est totalement maîtrisé (Barnabé, 1974; Barnabé et al., 1976; Sfakianakis et al., 2013; Vagner et al., 2007b).

#### **5.1.1. Le cycle de vie du bar Européen**

Chez le bar Européen, les adultes vivent au large et accomplissent des migrations annuelles entre les zones côtières d'alimentation et les zones de pontes, ou frayères, au large (Figure 9). Les bars se nourrissent de poissons, de céphalopodes et de crustacés. C'est au printemps que les adultes se rendent sur les zones de pontes avant de retourner à l'automne vers leur zone d'alimentation plus côtières. Les larves de bar Européen commencent donc leur vie au large avant de subir une migration plus ou moins active vers les eaux peu profondes des estuaires tidaux, c'est-à-dire soumis à la marée, et les lagons, qu'ils atteignent 1 mois après leur éclosion de la fin du printemps au début de l'été (Dufour et al., 2009; Jennings and Pawson, 1992; Pickett and Pawson, 1994). Ces zones côtières représentent leurs zones de nourriceries où vont être regroupées toutes les conditions, notamment trophiques, nécessaires à leur développement. Toutefois, les conditions environnementales et trophiques à cette période de l'année ne seront pas toujours optimales pour les larves. Elles pourront ainsi rencontrer dès leur arrivée, i.e. vers 30 jours post-éclosion, des épisodes hypoxiques ou

hyperthermiques. Au stade juvénile, les individus migrent activement vers des eaux plus profondes situées le long de la ligne côtière ou aux abords des estuaires. Ils y restent jusqu'à l'âge de 4 ans. A ce moment de leur vie, ils deviennent matures et rejoignent le large pour y trouver leur zone de pontes et commencer leurs migrations annuelles. Chez cette espèce, les larves et les juvéniles sont des individus estuariens alors que les adultes sont des individus marins subissant des migrations vers les côtes pour leur période d'alimentation (Claireaux and Lagardere, 1999).



**Figure 9 : Cycle de vie du bar Européen *Dicentrarchus labrax*.**

### 5.1.2. Le bar et ses rapports avec l'hypoxie

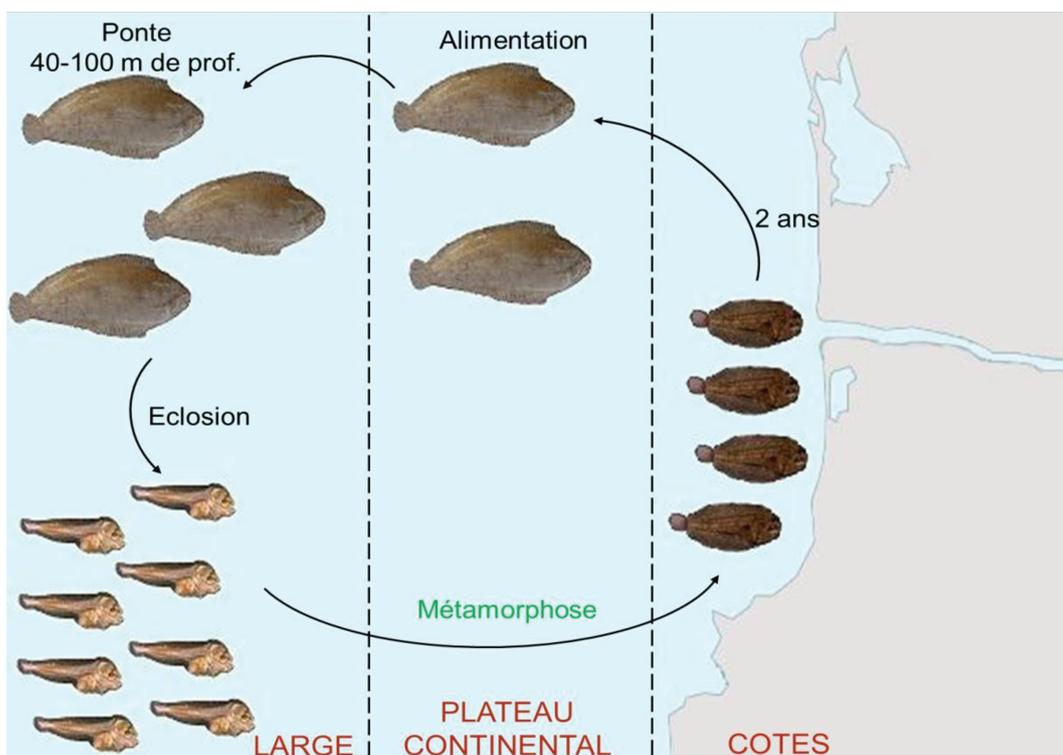
Le bar Européen est une espèce active, à la demande en oxygène forte et ponctuellement exposée à des épisodes hypoxiques dans les estuaires et les ports (Pichavant et al., 2003; Pickett and Pawson, 1994). Cette espèce est un exemple type d'espèce qui utilise les côtes et les estuaires comme zones de nurserie (Vasconcelos et al., 2008). Par conséquent, le bar Européen va rencontrer des épisodes hypoxiques très tôt au cours de son développement. En revanche, à mesure que le bar Européen va grandir et acquérir ses capacités locomotrices, il va être dans la capacité d'éviter ou de fuir les zones hypoxiques (Schurmann et al., 1998).

## 5.2. La sole commune (*Solea solea*) : une espèce benthique résistante

La sole commune, qui est un poisson plat benthique de la Famille des Soleidae, est un bon modèle de poisson plat marin de milieu tempéré, considéré comme une espèce tolérante à l'hypoxie (Cannas et al., 2007; Le Pape et al., 2003) ; son élevage en milieu expérimental contrôlé est totalement maîtrisé (Imsland et al., 2003; Palazzi et al., 2006; Piccinetti et al., 2012).

### 5.2.1. Le cycle de vie de la sole commune

Chez la sole commune, les individus adultes vivent sur le plateau continental. Ils s'y nourrissent la nuit de vers, de mollusques et de petits crustacés. Ils effectuent leur ponte au large dans les eaux d'une profondeur de 40 à 100 mètres. Les larves, qui ne ressemblent pas encore aux adultes, dérivent alors vers les zones côtières et les embouchures des estuaires (Figure 10). Elles y subissent leur métamorphose, c'est-à-dire aplatissement du corps et migration d'un œil sur le dessus de la tête, pour devenir des juvéniles qui ressemblent aux adultes. Les juvéniles vont rester environ 2 ans sur les zones côtières avant de migrer vers le plateau continental. Chez cette espèce, les larves et les juvéniles sont des individus estuariens alors que les adultes sont des individus marins (Cabral et al., 2003).



**Figure 10 :** Cycle de vie de la sole commune *Solea solea*.

### *5.2.2. La sole et ses rapports avec l'hypoxie*

La sole commune est un poisson plat benthique au mode de vie passif et naturellement et fréquemment exposé aux environnements hypoxiques (Dalla Via et al., 1998). Cette espèce est un exemple type d'espèce qui utilise les côtes et les estuaires comme zones de nurseries (Vasconcelos et al., 2008). Par conséquent, la sole commune va rencontrer des épisodes hypoxiques dès son plus jeune âge. En cas d'exposition à un épisode hypoxique, la sole commune va réduire ses activités locomotrices voire même s'immobiliser totalement sur le substrat (Dalla Via et al., 1998).

## **6. Les objectifs de la thèse**

Ce travail de thèse s'inscrit à l'intérieur de ce contexte d'amplification des apparitions d'épisodes hypoxiques dans le milieu marin naturel concomitants à l'arrivée des larves de poissons marins. L'objectif principal de cette étude était donc de comprendre les effets à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur les traits phénotypiques des stades ultérieurs de poissons marins. Dans le but de comprendre la complexité et la diversité des réponses pouvant être observées dans le milieu naturel, une approche de biologie comparée a été mise en place afin de comparer les réponses de deux espèces aux tolérances à l'hypoxie différentes : le bar Européen et la sole commune.

Ainsi, les questions initialement posées par cette thèse étaient :

- Quelles vont être les conséquences d'un épisode hypoxique survenu au cours du développement larvaire sur la physiologie des stades ultérieurs (i.e. les juvéniles et les adultes) ?
- Ces conséquences vont-elles dépendre de la résistance à l'hypoxie de l'espèce considérée ?

Ces questions ont principalement été abordées dans ce projet de thèse par l'examen des impacts d'une hypoxie sur un stade de vie « sensible » tel que le stade larvaire, et l'évaluation des effets à long-terme de cette exposition sur la physiologie des juvéniles.

Pour cela, le projet d'étude a mis en œuvre une approche de biologie comparée entre le bar Européen et la sole commune, qui ont des sensibilités différentes à l'hypoxie bien que présentant une durée de développement larvaire similaire (d'environ 40 jours). Les larves de ces 2 espèces ont été exposées à une hypoxie chronique (8 jours) modérée (40% de saturation à l'air) à partir de 30 jours post-éclosion. Les analyses menées ont eu pour but de caractériser les processus biologiques régulés à court-terme par ces expositions précoces, et leurs

conséquences à long-terme sur la physiologie des poissons. Cette étude a reposé sur des approches expérimentales sur des larves et sur des juvéniles, avec des observations portant sur la croissance, la survie et la morphologie, ou alors avec des outils de mesure aux niveaux cellulaire (protéines, enzymes) et moléculaire (expression de gènes) des effets de l'hypoxie.

La rédaction de cette thèse a été construite sur l'étude en parallèle des effets de l'hypoxie sur le bar Européen (Chapitres I et II) puis sur la sole commune (Chapitre III) tout d'abord à court-terme puis sur le long-terme.

Le premier chapitre sera axé sur la réponse des larves de bar Européen à l'exposition à l'hypoxie. Cette analyse des paramètres physiologiques des larves a deux finalités principales : (1) décrire les réponses des larves face à l'hypoxie en étudiant les modifications physiologiques et métaboliques mises en place par les animaux, et (2) s'assurer que l'épisode hypoxique appliqué est bel et bien ressenti par les animaux.

Le deuxième chapitre sera focalisé sur l'analyse des effets à long-terme de l'exposition à l'hypoxie chronique modérée appliquée au stade larvaire chez le bar Européen. Pour ce faire, les performances physiologiques et métaboliques des juvéniles de bar ont été étudiées afin d'évaluer l'impact de l'épisode hypoxique précoce sur ces stades ultérieurs.

Enfin, le troisième chapitre sera consacré à l'analyse des effets à long-terme d'une exposition à une hypoxie chronique modérée appliquée au stade larvaire chez la sole commune. Cette analyse a été menée en deux temps. Dans un premier temps, les réponses des larves de sole face à l'hypoxie ont été étudiées afin de s'assurer que l'épisode hypoxique appliqué a bel et bien été ressenti par les larves. Dans un second temps, les performances physiologiques et métaboliques des juvéniles de sole ont été étudiées afin d'évaluer l'impact de l'épisode hypoxique précoce sur ces stades ultérieurs.

---

*Chapitre I : Les effets à court-terme sur  
les larves de bar, *Dicentrarchus labrax**

---



## Résumé

### **L'exposition à une hypoxie chronique modérée impacte les traits physiologiques et développementaux des larves de bar Européen (Dicentrarchus labrax)**

L'objectif de ce premier chapitre est d'analyser la réponse des larves de bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) à une exposition à une hypoxie chronique modérée appliquée de 30 jours post-éclosion (d.p.h., Days Post-Hatching) à 38 d.p.h. Cette analyse des paramètres physiologiques des larves a deux finalités principales : (1) décrire les réponses des larves face à l'hypoxie en étudiant les modifications physiologiques et métaboliques mises en place par les animaux, et (2) s'assurer que l'épisode hypoxique appliqué est bel et bien ressenti par les animaux. Au cours de cette étude, nous avons montré que les larves de bar Européen seraient capables de faire face à une diminution de l'oxygène de leur milieu en mettant en place une série de régulations physiologiques limitant les coûts énergétiques et permettant l'amélioration de la production énergétique. Ces régulations semblent toutefois engendrées des coûts métaboliques influençant la croissance et le développement des larves.

Les résultats obtenus font l'objet d'un article accepté dans **Fish Physiology and Biochemistry**.



## Exposure to chronic moderate hypoxia impacts physiological and developmental traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae

Gwenaëlle Vanderplancke · Guy Claireaux · Patrick Quazuguel · Christine Huelvan · Charlotte Corporeau · David Mazurais · José-Luis Zambonino-Infante

Received: 16 September 2014 / Accepted: 1 December 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** Since European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae occurred in coastal and estuarine waters at early life stages, they are likely to be exposed to reduced dissolved oxygen waters at a sensitive developmental stage. However, the effects of hypoxia at larval stage, which depend in part on fish species, remain very poorly documented in European sea bass. In the present study, the impacts of an experimental exposure to a chronic moderate hypoxia (40 % air saturation) between 30 and 38 days post-hatching on the physiological and developmental traits of European sea bass larvae were assessed. This study was based on the investigation of survival and growth rates, parameters related to energy metabolism [Citrate Synthase (CS) and Cytochrome-c Oxidase (COX) activities], and biological indicators of the maturation of digestive function [pancreatic (trypsin, amylase) and intestinal (Alkaline Phosphatase “AP” and Aminopeptidase-N “N-LAP”) enzymes activities]. While condition of hypoxia exposure did not induce any

significant mortality event, lower growth rate as well as CS/COX activity ratio was observed in the Hypoxia Treatment group. In parallel, intestinal enzyme activities were also lower under hypoxia. Altogether, the present data suggest that sea bass larvae cope with moderate hypoxia by (1) reducing processes that are costly in energy and (2) regulating mitochondria functions in order to respond to energy-demand conditions. Both these effects are associated with a delay in the maturation of the digestive function.

**Keywords** Hypoxia · Fish larvae · Energy metabolism · Maturation

### Abbreviations

AP	Alkaline Phosphatase
C	Control group
COX	Cytochrome-c Oxidase
CS	Citrate Synthase
d.p.h.	Days post-hatching
FI	Feed intake
H	Head
HT	Hypoxia treatment
IS	Intestinal segment
N-LAP	Aminopeptidase-N
NS	No significant differences
PS	Pancreatic segment
RMR	Routine metabolic rate
s.e.m.	Standard error of mean
T	Tail

G. Vanderplancke · P. Quazuguel · C. Huelvan · C. Corporeau · D. Mazurais · J.-L. Zambonino-Infante (✉)  
Ifremer, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France  
e-mail: jose.zambonino@ifremer.fr

G. Claireaux  
Université de Bretagne Occidentale, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

## ***Introduction***

Since larvae of marine fish species hatch at an undeveloped stage, their development and ontogeny are liable to be greatly affected by biotic and abiotic conditions. This is especially true in coastal areas, which are nurseries for many marine fish species and where ecosystems are particularly impacted by human activities and global change. Among the environmental factors affecting the world's coastal waters, hypoxia is a major problem and is forecast to increase further under the combined effects of spreading coastal eutrophication and global warming (Diaz, 2001; Diaz and Rosenberg, 1995). Hypoxia episodes often coincide with periods of annual recruitment and the growth of benthic and pelagic fish species occurring in late spring and early summer (Breitburg, 1992; Pihl et al., 1991; Pihl et al., 1992). Understanding the impact of a low oxygen environment on the early life stages of fish is therefore of great importance, since fishery production relies on larval and juvenile recruitment.

Exposure of juveniles or adults from different fish species to hypoxia has been shown to notably affect fish routine metabolic rate (RMR), feed intake (FI), growth, condition factor and concentration of protein, e.g., European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Claireaux and Lagardere, 1999; Pichavant et al., 2001; Thetmeyer et al., 1999); turbot (*Scophthalmus maximus*) (Pichavant et al., 2001; Pichavant et al., 2000); Amazon oscar (*Astronotus crassipinis*) (Almeida-Val et al., 2011); and mummichog (*Fundulus heteroditus*) (Rees et al., 2012). It is supposed that some of these effects can be explained by the hypoxia-induced control of fundamental processes related to energy saving. Long-term exposure to hypoxia in fish has been also shown to affect egg development and hatching success, resulting in malformation, lower fitness and high mortality rates at larval and juvenile stages, e.g., brown trout (*Salmo trutta*) (Massa et al., 1999; Roussel, 2007); black bream (*Acanthopagrus butcheri*) (Hassell et al., 2008); zebrafish (*Danio rerio*) (Padilla and Roth, 2001; Shang and Wu, 2004); and dogfish (*Scyliorhinus canicula*) (Diez and Davenport, 1990). These effects occur due to disturbances in a series of programmed, highly intricate and energy-consuming processes (Ozernyuk, 2011; Wu et al., 2006). Although it is generally accepted that early embryonic developmental stages are particularly sensitive to stresses in fish (Cameron and VonWesternhagen, 1997), post-hatching development also has windows of sensitivity to hypoxia. The effects of hypoxia exposure when applied at larval stages vary widely depending on fish species, hypoxia severity, exposure period and individual adaptive capacities (Anjos et al., 2008; Bickler and Buck, 2007). While Barrionuevo et al. (2010)

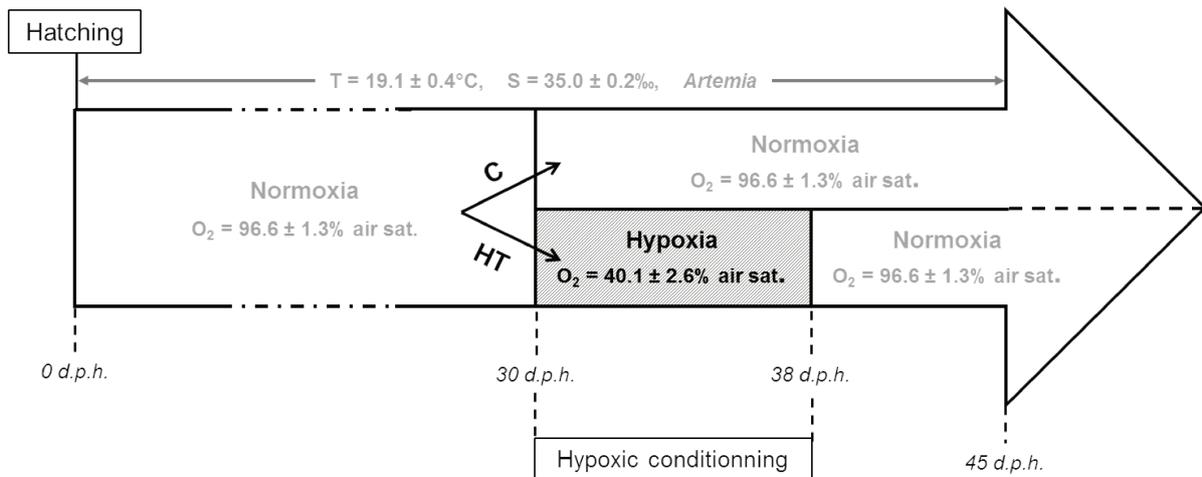
reported that zebrafish did not respond to moderate hypoxia before 30 days post-hatching (d.p.h.), [Pelster \(2002\)](#) showed that exposure of the same species to 7 days of moderate hypoxia affected larval cardiac activity, cardiac output, heart rate, organ perfusion and blood vessel formation. Since hatching of marine fish species occurs at earlier stages of development compared with freshwater species, their ontogenic processes during the larval phase are likely more sensitive to hypoxic episodes. Low tolerance to hypoxia has been observed over the period of metamorphosis in sea bream (*Pagrus major*) ([Ishibashi et al., 2005](#)); Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) ([Ishibashi et al., 2007](#)); and bonefish (*Albula sp.*) ([Pfeiler, 2001](#)). It is supposed that this sensitivity is due to the increase of metabolic rates just before and just after the flexion stage, which is a period of dramatic molecular, physiological and behavioural changes for marine fish species such as European sea bass ([Mazurais et al., 2011](#)). The European sea bass is a highly valued fish that migrates from offshore areas to the coast just after flexion stage, which occurs between 22 and 25 d.p.h. ([Dufour et al., 2009](#); [Jennings and Pawson, 1992](#); [Pickett and Pawson, 1994](#)). This species can therefore be exposed to hypoxic events from this stage onward. However, few studies have been published on the effects of hypoxia on larval development of this marine fish species.

The purpose of the present study was to evaluate the impact of a chronic (between 30 and 38 d.p.h., a natural hypoxia exposure window) moderate (40% air saturation) hypoxia exposure on growth, metabolism and maturation in European sea bass larvae. To gain insight into the energy metabolism of larvae, Citrate Synthase (CS) and Cytochrome c Oxidase (COX) activities were assessed. CS and COX are key mitochondrial enzymes localized in matrix or membrane which fluctuations provide information on the properties and the numbers of the mitochondria present ([Guderley, 2007](#); [Lucassen et al., 2003](#)). CS/COX activity ratio was used in order to estimate changing in mitochondrial size and shape in response to energy-demand conditions as indicated in studies by [Lucassen et al. \(2003\)](#) and [Ibarz et al. \(2010\)](#). Finally, digestive enzyme activities [Trypsin, Amylase, Alkaline Phosphatase (AP) and Aminopeptidase-N (N-LAP)] were used as indicators of the developmental status of the fish larvae.

## ***Material and methods***

### ***Larval rearing***

Post-hatching, larvae of European sea bass were reared under normal oxygen conditions in 8 tanks at  $19.1 \pm 0.4$  °C water temperature and  $35 \pm 0.2$  ‰ salinity, and were fed with *Artemia* until 45 d.p.h according to [Zambonino-Infante et al. \(1996\)](#). The tanks were then divided into two groups of four tanks. The Control group (or C group) was maintained under normal oxygen condition ( $96.6 \pm 1.3$  % air saturation,  $7.10$  mg O<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup>), while larvae from the challenged group, also named Hypoxia Treatment group (or HT group), were subjected to moderate hypoxia ( $40.1 \pm 2.6$  % air saturation,  $2.95$  mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) for 8 days (from 30 to 38 d.p.h., **Fig. 1**). These hypoxia conditions had previously been determined to not induce mortality. During hypoxia exposure larvae of each group were fed with *Artemia*, except 24 h prior to samplings where larvae were left undisturbed and unfed. After the hypoxia exposure, larvae continue to be fed with *Artemia* until the end of experimentations. It was not possible to evaluate feed ingestion throughout this experiment; however, we did not notice any visible change in feeding activity in HT group during or after hypoxia exposure.



**Figure 1 : Schema of hypoxic conditioning at 40% air saturation.** Sea bass larvae were divided into two groups : “C” represents the Control group and “HT” represents the Hypoxia Treatment group in which the level of oxygen was reduced to 40% air saturation for 8 days. Samplings were performed during hypoxia exposure (i.e. at 30, 32, 35 and 38 d.p.h.) and after the end of exposure phase (i.e. at 42 and 45 d.p.h.)

### ***Survival rate and larval growth***

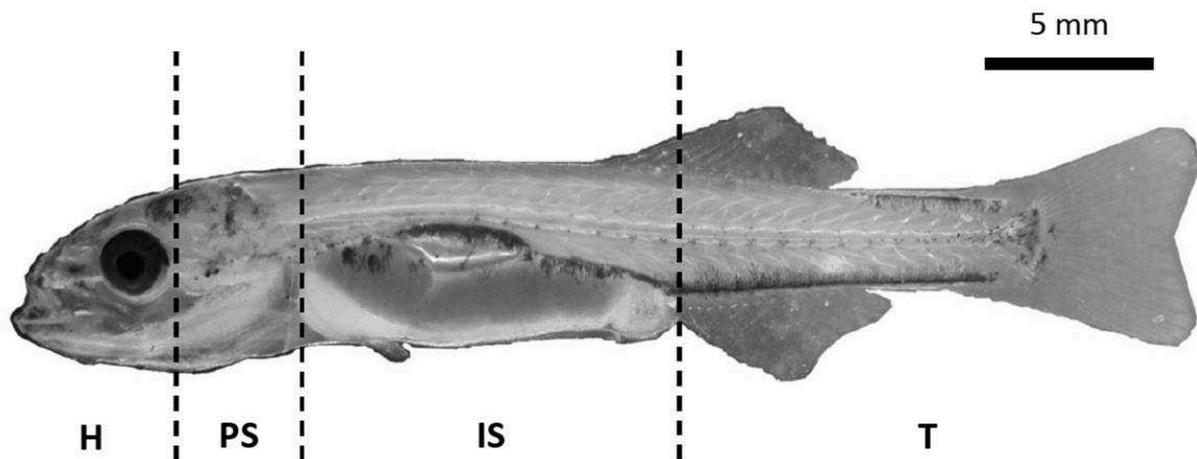
Survival rate was estimated at 45 d.p.h. by counting the number of remaining larvae in each group and taking into account the larvae collected for sampling during the experiment.

Growth was evaluated on four pools (1 pool from each tank) of approximately 40 larvae per sample from the beginning of hypoxia exposure (30 d.p.h.) until 45 d.p.h. (i.e. at 30, 32, 35 and 38 d.p.h – during hypoxia exposure – and at 42 and 45 d.p.h. – after the return to normoxic conditions).

### *Larvae sampling*

During hypoxia exposure, five samplings (at 30, 32, 35 and 38 d.p.h. and 42 d.p.h.) were performed in order to analyse CS and COX activities. For this purpose, in each treatment group, 4 samplings (1 per tank) of 35 or 40 pooled larvae were for protein concentration and enzymes activities assays. Larvae were first placed on a glass maintained at 0°C and dissected under microscope into four parts: head “H” (just behind the eye), pancreatic segment “PS” (just behind the gills) and tail “T” (point between the end of the digestive tract and the anal tail) were discarded, and the intestinal segment “IS” conserved (**Fig. 2**). For each group, pooled IS were then weighed, placed in ice-cold lysis buffer and stored at –80°C until proteins extraction.

For digestive enzymes assays, four samplings (one per tank) of 35 larvae per group were performed at 38 d.p.h. and stored at –20°C. Larvae were placed on an ice-chilled glass and dissected under a microscope into 4 parts: head (H), pancreatic segment (PS) intestinal segment (IS) and tail (T) (**Fig. 2**). PS and IS were then stored at –20°C for later assay of their respective enzymes, as previously described by [Cahu and Zambonino-Infante \(1994\)](#).



**Figure 2 :** Dissection performed on sea bass larvae at each sampling. Larvae were dissected into 4 parts: Head (H), Pancreatic Segment (PS), Intestinal Segment (IS) and Tail (T). H and T were systematically removed. PS were only sampled on 38-day-old sea bass larvae for pancreatic enzymes activity measurements. IS were used for all enzyme assays

*Extractions of proteins from larvae for analysis of CS and COX activities*

Proteins were solubilized by adding 3-6 mL of ice-cold lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% Igepal, 1 tablet of complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Pharma; Basel, Switzerland) in 25 mL buffer, 1% phosphatase inhibitor cocktail III (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, USA) and 5mM NaPPi, pH 7.4. Total proteins and enzymes were then extracted as described by [Le Foll et al. \(2007\)](#). Briefly, total proteins and enzymes lysates were obtained after homogenization with a Pro Polytron® (BioBlock Scientific; Illkirch , Bas-Rhin , France) tissue disruptor. The homogenates obtained were then centrifuged at 3,000 g for 1 h at 4°C. At the end of the centrifugation, the interphase containing proteins and enzymes was collected by carefully pipetting and then centrifuged at 10,000 g for 45 min at 4°C in order to ensure total lipid removal. The new interphase was carefully collected, aliquoted and stored at -80°C.

*Enzymatic activities assays (aerobic metabolism and larval maturation)*

CS activity was assessed in Nunc™ 96-well microplates (Thermo Scientific Inc.; Waltham, MA, USA). Data were obtained with a microplate reader (Bio-Tek® Synergy™ HT; Colmar, Haut-Rhin, France) and then treated with KC4 v3 software. The assay was adapted from [Guderley et al. \(2011\)](#). Briefly, CS activity was assayed for 10 min at wavelength  $\lambda = 412$  nm and temperature  $T = 25^\circ\text{C}$ . The microplate was prepared by mixing 20  $\mu\text{L}$  of sample with 160  $\mu\text{L}$  of a mix consisting of 0.25 mM Acetyl-coA, 0.125 mM DTNB and 86.25 mM Tris-HCl, pH = 8. The reaction was initiated by adding 20  $\mu\text{L}$  5 mM oxaloacetate to each well. The control used for the assay was a commercial enzyme of CS (Sigma-Aldrich® Inc.; St. Louis, MO, USA).

In parallel, COX activity was assessed using Cytochrome c Oxidase Assay Kit, CYTOCOX1 (Sigma-Aldrich® Inc.; St. Louis, MO, USA) following manufacturer's instructions. Briefly, COX activity was assayed for 1 min at wavelength  $\lambda = 550$  nm and temperature  $T = 25^\circ\text{C}$ . The reaction was prepared by mixing 350  $\mu\text{L}$  of assay buffer (10 mM Tris-HCl, 120 mM KCl, pH = 7.0), 80  $\mu\text{L}$  of enzyme buffer (10 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, pH = 7.0) and 20  $\mu\text{L}$  of sample. The reaction was then initiated by adding 50  $\mu\text{L}$  of 0.22 mM Ferrocyclochrome c substrate solution.

Larval development was evaluated as described by [Cahu and Zambonino-Infante \(1995\)](#). Protocols for the homogenisation of the pancreatic segments and intestine, brush border purification, protein dosages and enzymatic assay procedures for Amylase, Trypsin, AP and N-LAP are described in [Zambonino-Infante et al. \(1997\)](#). Enzyme activities were expressed as specific activities, i.e., units per mg of proteins.

### *Statistical analyses*

Data are presented as means  $\pm$  s.e.m. (Standard Error of Mean). Statistical analyses were performed using R software ([R Core Team, 2013](#)). For all analyses, all response variables were checked for normality with the Shapiro test and for equality of variances using the Levene test. A regression was used in order to determine the influence of oxygen treatment on survival. Two-way ANOVAs were then used (except for survival and maturation analyses, for which a regression and a one-way ANOVA were used, respectively) to determine the influence of oxygen treatment, age of larvae (as main effects) and their interaction on each response variable. When the interaction between oxygen treatment and the age of larvae was significant, Student-test were used to determine significant differences among groups within each sampling time. An ANCOVA was used for CS/COX activity ratio analyses in order to determine the influence of oxygen treatment (as main effect) with age of larvae as co-factor. In addition, a Student-test was used to determine significant differences among groups within each sampling time for CS/COX activity ratio and at 30, 38 and 45 d.p.h. for growth rate. Finally, a one-way ANOVA was used in order to determine the influence of oxygen treatment on larval development. Differences were considered significant at the 95% confidence level ( $p$ -value  $< 0.05$ ).

## ***Results***

No variable differed significantly between the Control (C) and the Hypoxia Treatment (HT) groups prior to the hypoxia exposure, i.e. at 30 d.p.h. just before the beginning of exposure.

### *Survival and growth of larvae*

#### *Survival*

No significant mortality events were observed in the tanks during and after the period of exposure to hypoxia. This was confirmed by the survival rate estimated at 45 d.p.h., which

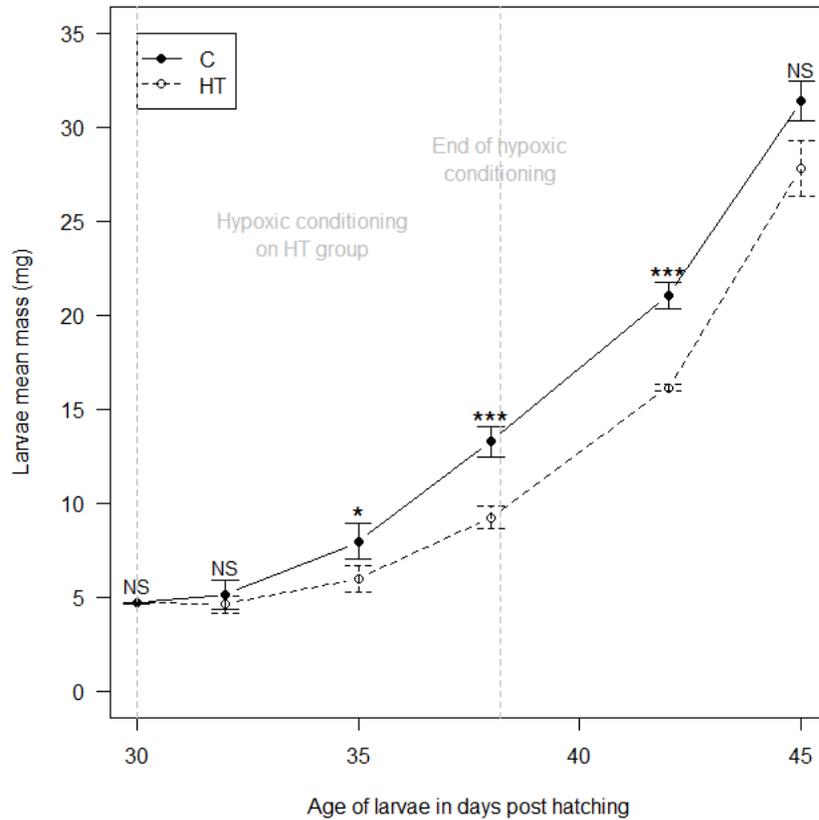
was not significantly different between the two groups ( $C = 44.9 \pm 7.2\%$ ,  $HT = 44.7 \pm 5.3\%$  ;  $p = 1$ ).

### *Larval growth*

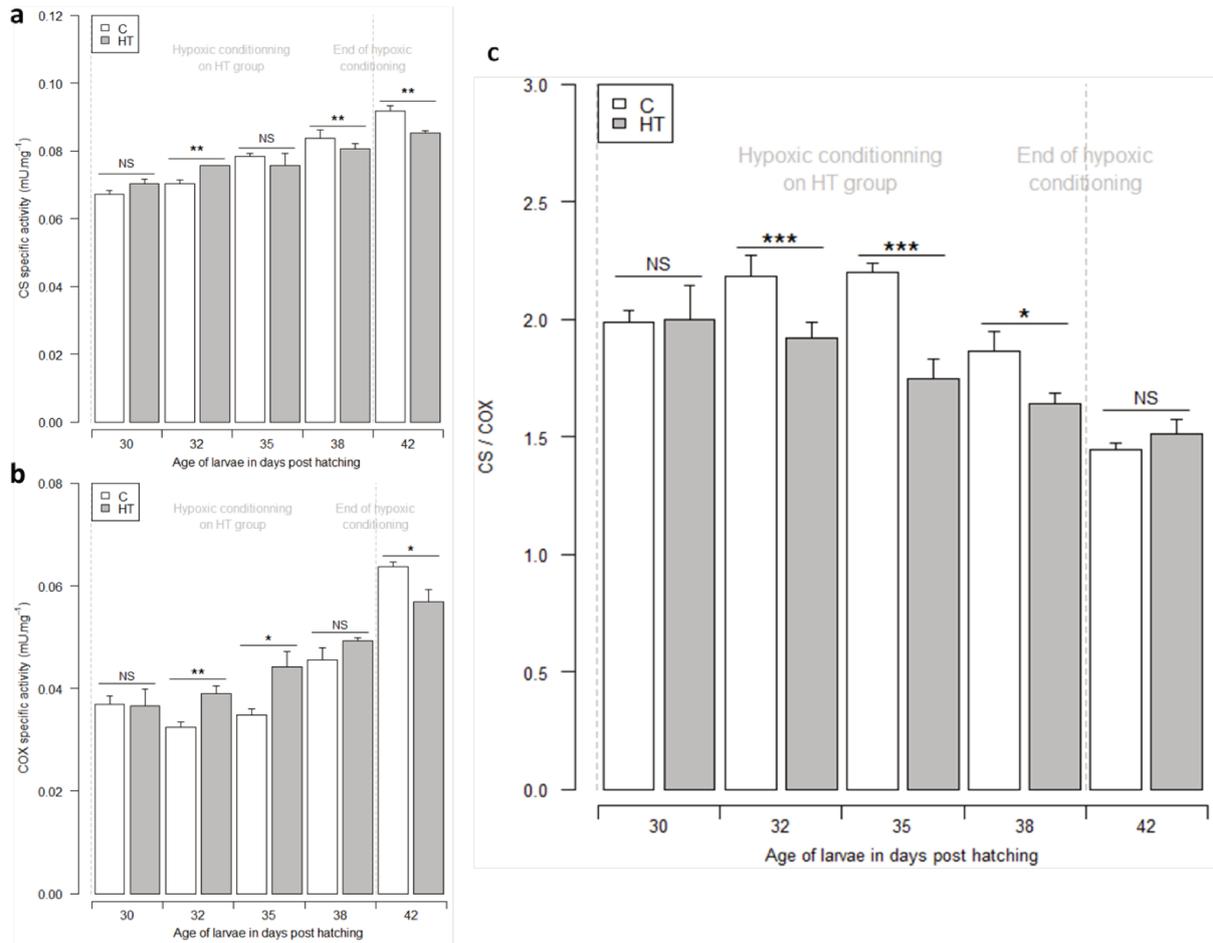
Growth of larvae was monitored from the beginning of hypoxia exposure (30 d.p.h.) until 45 d.p.h. (after the return to normoxic conditions). Data were transformed using cubic root following recommendations of Bureau et al. (2000) (**Fig. 3**). Globally, in both groups, the larval growth rate increased with the age of larvae. Statistical analyses revealed that larval growth was affected by oxygen treatment (two-way ANOVA:  $p < 0.001$ ) and by the age of larvae (two-way ANOVA:  $p < 0.001$ ). The interaction between oxygen treatment and the age of larvae was significant (two-way ANOVA:  $p < 0.01$ ). While the mean larval masses were similar between the two groups at the beginning of hypoxia exposure (30 d.p.h.) ( $C = 4.66 \pm 0.17$  mg ;  $HT = 4.67 \pm 0.16$  mg ; Student-test:  $p > 0.5$ ), they were found significantly different at the end of hypoxia exposure (38 d.p.h.) ( $C = 13.26 \pm 2.29$  mg ;  $HT = 9.23 \pm 1.73$  mg ; Student-test:  $p < 0.01$ ). This data can be related to the significant impact of hypoxia exposure on the growth rate (two-way ANOVA interaction:  $p < 0.01$ ). Furthermore, growth tend to be higher in HT group after hypoxia exposure resulting in similar mass between the two groups at 45 d.p.h. ( $C = 31.40 \pm 2.97$  mg ;  $HT = 27.79 \pm 4.18$  mg ; Student-test:  $p > 0.09$ ).

### *Regulation of Citrate Synthase and Cytochrome c Oxidase activities*

CS and COX activities in the IS of larvae were assessed from the beginning of hypoxia exposure (30 d.p.h.) until 42 d.p.h. (after the return to normoxic conditions) (**Fig. 4**). Overall, CS and COX specific activities increased during larval development in both groups (**Fig. 4 a and Fig. 4 b**) (ANCOVA:  $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively). During hypoxia exposure, i.e. from 30 to 38 d.p.h., CS specific activity was not impacted by hypoxia exposure while COX specific activity was higher in the HT group (ANCOVA:  $p < 0.001$ ). Globally, the CS/COX activity ratio exhibit significant fluctuations throughout the experiment (**Fig. 4 c**) (ANCOVA:  $p < 0.001$ ). During hypoxia exposure, i.e. from 30 to 38 d.p.h., CS/COX activity ratio was lower in the HT group (ANCOVA:  $p < 0.001$ ). The effect of the oxygen treatment on CS/COX activity ratio is particularly marked at 32, 35 and 38 d.p.h. (Student-test:  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). There was no more difference in CS/COX activity ratio between C and HT groups 96h (42 d.p.h.) after the return to normoxic conditions (Student-test:  $p > 0.05$ ).



**Figure 3 :** Sea bass larvae mass for Control “C” (—) and Hypoxia Treatment “HT” (---) groups. Results are expressed as mean mass larvae  $\pm$  s.e.m. (n = 4 pools of 40 larvae). Statistical analyses revealed that larval growth rate was affected by the oxygen treatment (Two-way ANOVA:  $p < 0.001$ ) and the age of larvae (Two-way ANOVA:  $p < 0.001$ ). Significant interaction between the oxygen treatment and the age of larvae (Two-way ANOVA:  $p < 0.01$ ) indicated that the effects of time on growth (i.e. the growth rate) depend upon the oxygen treatment. Additional statistical analyses (represented by asterisks) indicated significant differences in mass between the Control and Hypoxia Treatment groups (Student-test: significant codes : \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , NS = No Significant differences). Refer to “Material and methods” section for more details on the statistical analyses



**Figure 4 : Regulation of Citrate Synthase (CS) and Cytochrome c Oxidase (COX) activities** for Control “C” (white bars) and Hypoxia Treatment “HT” (grey bars) groups. **A)** Specific enzymatic activity of CS, **B)** Specific enzymatic activity of COX and **C)** Ratio between enzymatic activity of CS and enzymatic activity of COX. Results are given  $\pm$  s.e.m. (n = 4 pools of 40 larvae). Statistical analyses revealed that COX specific activity and CS/COX activity ratio was affected by the oxygen treatment (ANCOVA:  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively) and by the age of larvae (ANCOVA:  $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). In parallel, CS specific activity was not affected by the oxygen treatment (ANCOVA:  $p > 0.7$ ) but was affected by the age of larvae (ANCOVA:  $p < 0.001$ ). Additional statistical analyses (represented by asterisks) indicated significant differences between the Control and Hypoxia Treatment groups (Student-test: significant codes : \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , NS = No Significant differences)

### *Maturation of larvae digestive functions*

Activities of digestive enzymes were determined in both the C and HT groups at 38 d.p.h. (**Table 1**). For pancreatic enzymes, larvae from the HT group exhibited 25% lower trypsin specific activity and showed a significantly 150% higher amylase specific activity than the C group (one-way ANOVA:  $p_{\text{Trypsin}} < 0.01$ ,  $p_{\text{Amylase}} < 0.05$ ). For the intestinal enzymes, larvae exposed to hypoxia exhibited AP and N-LAP specific activities significantly lower than those from the C group by 78% and 53%, respectively (one-way ANOVA:  $p_{\text{AP}} = 0.01$ ,  $p_{\text{N-LAP}} < 0.01$ ).

**Table 1: Specific activities of digestive enzymes.** Results are given in milli-units per mg of protein ( $\text{mU} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ )  $\pm$  s.e.m. ( $n = 4 * 35$  larvae). Within any one column, means with the same superscript letter are not significantly different ( $p$ -value  $> 0.05$ ). C = Control group; HT = Hypoxia treatment group; AP = Alkaline Phosphatase; N-LAP = Aminopeptidase-N.

	Pancreatic enzymes		Intestinal enzymes	
	Trypsin	Amylase	AP	N-LAP
C	42.03 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup>	243.89 $\pm$ 22.56 <sup>a</sup>	1242.59 $\pm$ 253.57 <sup>a</sup>	204.12 $\pm$ 43.10 <sup>a</sup>
HT	31.41 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>	608.16 $\pm$ 112.74 <sup>b</sup>	276.96 $\pm$ 89.67 <sup>b</sup>	96.84 $\pm$ 6.81 <sup>b</sup>

## Discussion

Since they arrive on the coastline around one month after hatching (Dufour et al., 2009; Jennings and Pawson, 1992), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) are likely to experience hypoxia episodes at the end of the larval period. However, the impact of hypoxic events on their physiology at this developmental stage is still largely unknown. The present study was intended to assess the effects of moderate hypoxia (40% air saturation) applied for a duration of 8 days on 30 day-old sea bass larvae. The hypoxia treatment did not induce any significant mortality. Moreover no significant impact on skeletal deformity rate was observed in juveniles originated from larvae of HT group (data not shown). The absence of effect on survival and malformation rates in the preset study differs from previous data showing that moderate hypoxia induces lower survival rates and higher frequency of vertebral column deformities in first feeding yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) (Wexler et al., 2011) and Atlantic salmon alevins (*Salmo salar*) (Sanchez et al., 2011) respectively. This apparent

discrepancy of response is consistent with the well admitted species-specific as well as stage-specific response of fish to hypoxia constraint (Richards et al., 2009).

We observed a lower mass in larvae from the HT group at the end of hypoxia exposure resulting from a reduction of growth during the exposition compared to the C group. Evaluation of food intake in larvae is not really easy and necessitates the use of  $^{14}\text{C}$ -labelled feeds (Kolkovski et al., 1997), which was not possible to perform during this experiment. However, it has been well described that hypoxia usually induces reduction in food ingestion (Lakani et al., 2013; Pichavant et al., 2001; Pichavant et al., 2000; Thetmeyer et al., 1999). Seven days after the return under normoxic conditions (i.e. at 45 d.p.h.), larvae from HT group recovered the same weight as those from the C group (Fig. 3) suggesting a potential compensatory growth. Yet, such a compensatory growth after hypoxia exposure was previously shown in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) (Wei et al., 2008); it is likely that a higher number of sampling points after the return under normoxic conditions would have permitted to point out compensatory growth in our study.

In the present study, the lower trypsin specific activity in larvae originated from the HT group suggested that one week moderate hypoxia exposure impaired ingestion of fish. As mentioned by Zambonino-Infante and Cahu (2001), pancreatic maturation in sea bass larvae has been completed by 25 d.p.h. and trypsin activity can be directly related to the dietary protein intake from 35 d.p.h. Therefore, a decrease in trypsin specific activity observed after 35 d.p.h. is generally related to undernutrition (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). Again, in the present study, even if we observed that larvae exposed to 40% air saturation hypoxia continued to have a certain feeding activity, we cannot exclude that they reduced their food consumption, compared to control larvae. Furthermore, in our study, the larvae which have experienced hypoxia exposure exhibited higher amylase specific activity at the same stage of development than larvae from C group. It is well documented that amylase specific activity decrease throughout the larval stage (Péres et al., 1996; Ribeiro et al., 1999; Zambonino-Infante and Cahu, 2001). This difference indicates that the normal decrease of amylase specific activity in larvae was delayed in the HT group. In parallel, the lower AP and N-LAP specific activities in larvae from the HT group revealed that the maturation of the enterocytes was impaired by the hypoxia episode. In marine fish species, particularly European sea bass, it is well admitted that the settlement of an efficient intestinal membrane digestion (characterised by the concomitant increase in AP and N-LAP specific activities) occurred around 30 d.p.h. at 19°C (Cahu and Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante and Cahu, 2001). In the present study, these developmental delays could also have contributed to a

growth depression as long as the sea bass larvae were exposed to hypoxia, as already observed in fish larvae (Perez-Dominguez and Holt, 2006; Wexler et al., 2011).

We also found a down-regulation of CS/COX activity ratio in the HT group during hypoxia exposure. This down-regulation disappeared after the return in normoxic conditions (Fig. 4 c). This down-regulation of CS/COX activity ratio was mainly due to a significant increase of COX specific activity (Fig. 4 b) more than a decrease of CS specific activity (Fig. 4 a). The CS is a key enzyme localized in the mitochondrial matrix and is involved in the Krebs' cycle whereas COX is the terminal electron acceptor of the electron transport chain located in the mitochondrial inner membrane. These two enzymes are of great importance in aerobic metabolism and provide information on respiration metabolism capacity. The fluctuations of these two key mitochondrial enzymes provide information on the properties and the numbers of the mitochondria present (Guderley, 2007; Lucassen et al., 2003). CS/COX activity ratio could be used in order to estimate changes in mitochondrial size and shape in response to energy-demand conditions (Ibarz et al., 2010). In consequence, the decrease in CS/COX activity ratio observed in our study during the hypoxia period could reflect a lower citrate synthesis over respiratory chain capacities of mitochondria in the larvae from the HT group (Lucassen et al., 2003) as well as a modification of the size and the shape of mitochondria (Ibarz et al., 2010). The similar CS/COX activity ratio observed at 42 d.p.h. indicated that such mitochondrial changes were transient.

It is interesting to note that the decrease in CS/COX activity ratio in HT group coincided with a growth depression, but we were not able to establish a significant relationship between growth rate and CS/COX activity ratio. Such relationship has yet been reported by Mathers et al. (1992) in the saithe (*Pollachius virens*).

### ***Conclusion***

Altogether, the results obtained suggest that sea bass larvae are able to implement physiological regulations in order to cope with a moderate decrease in ambient oxygen. However, these regulations seemed to have a metabolic cost that impacted growth and development, but not survival. Such consequences could have a strong impact on fish larvae activities, especially on their capacities to escape predation, which could adversely affect the recruitment of sea bass.

## **Funding**

The first author was supported by a joint Ifremer–Région Bretagne doctoral grant.

## **Author contributions**

Study conception and design: G. Vanderplancke, D. Mazurais, J-L. Zambonino-Infante

Animal experiments: G. Vanderpancke, P. Quazuguel

Acquisition and analysis of data: G. Vanderplancke, C. Huelvan

Interpretation of data: G. Vanderpancke, C. Corporeau, D. Mazurais, J-L. Zambonino-Infante

Drafting of manuscript: G. Vanderplancke, D. Mazurais

Critical revision: D. Mazurais, J-L. Zambonino-Infante, G. Claireaux

## **Competing interests**

No competing interests declared.

---

*Chapitre II : Les effets à long-terme sur  
les juvéniles et pré-adultes de bar,  
Dicentrarchus labrax*

---



## Résumé

### **Un épisode hypoxique survenu au cours du développement larvaire impacte à long-terme les performances physiologiques et métaboliques des juvéniles de bar Européen (*Dicentrarchus labrax*)**

L'objectif de ce deuxième chapitre est d'analyser les effets à long-terme de l'exposition à l'hypoxie chronique modérée appliquée au stade larvaire chez le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*). Pour ce faire, les performances physiologiques et métaboliques des juvéniles de bar ont été étudiées afin d'évaluer l'impact de l'épisode hypoxique précoce sur ces stades ultérieurs. Un an après l'exposition de 8 jours des larves de bar Européen (de 30 à 38 d.p.h.) à une hypoxie modérée (40% de saturation à l'air), les analyses phénotypiques réalisées montrent un effet à long-terme de l'exposition précoce sur le taux de croissance, mais pas sur la tolérance à l'hypoxie. La différence de croissance observée n'étant pas imputable à une prise alimentaire différente (quantité d'ingéré similaire dans les 2 groupes), l'étude des taux métaboliques des individus a été entreprise. Ces dernières analyses ont permis de mettre en évidence un processus digestif diminué associé à une altération des processus enzymatiques impliqués dans la digestion résultant en une allocation énergétique moindre pour la croissance.

Les données recueillies montrent donc qu'une exposition précoce à un épisode hypoxique peut impacter les traits phénotypiques du bar Européen sur le long-terme.

Une partie des résultats obtenus fait l'objet d'un article accepté dans **Marine Biology**.



## Hypoxic episode during the larval period has long-term effects on European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*)

Gwenaëlle Vanderplancke · Guy Claireaux ·  
Patrick Quazuguel · Lauriane Madec · Serena Ferraresso ·  
Armelle Sévère · José-Luis Zambonino-Infante · David Mazurais

Received: 24 July 2014 / Accepted: 11 December 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Hypoxia episodes have been generally studied over the last decade for their lethal consequences in coastal areas, which are nurseries for several fish species. The possible long-lasting effects of non-lethal hypoxia exposures at larval stage are, however, poorly documented. We investigated the long-lasting phenotypic impact of an experimental exposure to moderate hypoxia (40 % air saturation) between 30 and 38 days post-hatching in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). At the juvenile stage, our data indicate that this early hypoxia exposure impacted on juvenile growth rate but not on hypoxia tolerance. Growth depression was associated with a regulation of metabolism as suggested by a decrease in blood glycaemia, a decreased hepatic expression of the glucose transporter *glut2* and of *acaca* involved in fatty acid synthesis as well as an increased hepatic expression of glycolytic *ldh-a*, which is a target gene of hypoxia inducible factors (HIFs). Interestingly, while fish were not exposed to hypoxia, the cellular oxygen sensor *egln3* gene, which is also a target of HIFs, exhibited higher expression level in the hepatic tissue of

juveniles that have experienced hypoxia at larval stage. Even if further studies are needed to evaluate the functional significance of such effects and to decipher the underlying molecular mechanisms, the present data evidence that early life exposure to a hypoxia event has long-lasting impact on sea bass juvenile physiology.

### List of abbreviations

<i>acaca</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha
C	Control group
Ct	Cycle threshold
dph	Days post-hatching
E	Primer efficiency
<i>efl<math>\alpha</math></i>	Elongation factor-1, isoform alpha
<i>Egln3</i>	Egg-laying defective nine 3
ELHT	Early life hypoxia treatment group
<i>glut2</i>	Glucose transporter 2
HCT	Hypoxic challenge Test
HIF	Hypoxia inducible factor
<i>igf-1</i>	Insulin-like growth factor-1
<i>Ldh-a</i>	Lactate dehydrogenase-a
NI	Not investigated
pH	Power of hydrogen
PIT	Passive integrated transponder
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RT	Reverse transcription
s.d.	Standard deviation

Communicated by H. Pörtner.

G. Vanderplancke · P. Quazuguel · L. Madec · A. Sévère ·  
J.-L. Zambonino-Infante · D. Mazurais (✉)  
LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD, Centre de Brest, Ifremer,  
ZI de La Pointe Du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France  
e-mail: david.mazurais@ifremer.fr

G. Claireaux  
UBO, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD, Ifremer, ZI de la  
Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

S. Ferraresso  
Department of Comparative Biomedicine and Food Science,  
University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro,  
Italy

### Introduction

Over the past 50 years, global warming and anthropogenic activities have greatly influenced coastal marine

ecosystems with profound and diverse consequences on water temperature, pH and dissolved oxygen. The occurrence of low dissolved oxygen (hypoxia) events in the world's coastal waters is becoming a major problem under the combined effects of expanding coastal eutrophication and global warming (Diaz, 2001; Diaz and Rosenberg, 1995). These hypoxic events are particularly severe in shallow coastal areas, compromising the survival, growth and recruitment of the young fish species that use these areas as nursery (Breitburg, 1992; Pihl et al., 1991; Pihl et al., 1992). Hypoxic events have been shown to affect a broad range of physiological, developmental and behavioural processes with consequences thereof particularly in terms of growth and survival (Engstrom-Ost and Isaksson, 2006; Geist et al., 2013; Ishibashi et al., 2007; Johnston et al., 2013; McKenzie et al., 2008; Yamanaka et al., 2013). These effects vary widely depending on fish species, hypoxia severity and duration, exposure period and individual acclimation capacities. Nevertheless, a common feature of hypoxia tolerance is the ability to regulate metabolism according to oxygen availability (Ishibashi et al., 2007; McKenzie et al., 2008). The physiological regulation underlying the phenotypic plasticity required to survive in adverse or unpredictable conditions during larval ontogeny could also result in long-lasting effects on animal performance and fitness at the adult stage (Desai and Hales, 1997; Hamdoun and Epel, 2007; Johnston and Temple, 2002; Lindström, 1999; Monaghan, 2008; Thompson, 1999). Marine fish species that exhibit a rapid rate of growth and development at larval stage may be particularly prone to such long-term effects. Long-term impact on fitness has been shown in fish following thermal variation in the larval environment (Johnston et al., 1996; Zambonino-Infante et al., 2013). However, until now, the long-term consequences of plasticity that allows fish larvae to meet the challenges of a temporarily hypoxic environment are unknown.

It is well documented in vertebrates, including fish, that preconditioning adult tissues to low oxygen availability improves subsequent tolerance to hypoxia and ischemia (Cook et al., 2013; Kohin et al., 2001; Lu et al., 2005; Mulvey and Renshaw, 2000). Energy-saving combined with hypometabolism are thought to be involved in the development of such preconditioning-induced hypoxic tolerance (Lu et al., 2005; Mulvey and Renshaw, 2000). It is accepted that Hypoxia Inducible Factors (HIFs), which transduce reduced oxygen availability into adaptive cellular responses based on the regulation of gene expression, contribute to the protective effects of ischemic preconditioning (for review see Semenza, 2011). A beneficial transgenerational effect of parental hypoxic exposure on hypoxia tolerance of offspring has been demonstrated in zebrafish (*Danio rerio*) indicating epigenetic mechanisms underlying these effects (Ho and Burggren, 2012). Even if epigenetic modulation can occur throughout

life, it is now admitted that the early life stage of organisms is highly susceptible to such regulation since it is a period of rapid cell division and epigenetic remodelling (Perera and Herbstman, 2011). The resulting developmental plasticity allows the organism to make anticipatory responses to the external environment by altering the course of cellular and organ differentiation.

In the European sea bass, spawning takes place off shore and larvae drift to coastal nurseries that they will reach at approximately flexion stage (Dufour et al., 2009; Jennings and Pawson, 1992). From that stage until they become sufficiently mobile, young sea bass will be exposed to the environmental fluctuations that characterize coastal ecosystems, including hypoxic events.

In the present study, we hypothesized that a moderate hypoxic episode (40% air saturation) occurring at ecological relevant windows of larval development could have long-lasting effects on the physiological performance of the resulting juveniles. Growth rate as well as tolerance to a standardized hypoxic challenge (Roze et al., 2013) was used to evaluate the global physiological status of juveniles. Considering that hypoxia is known to influence the energy metabolism through HIF signalling cascade, we wondered if early exposure to hypoxia could also have abiding effects on molecular actors involved in these pathways. In order to test this hypothesis, some molecular and biochemical parameters related to metabolism and HIF pathway have been addressed.

### ***Material and methods***

#### ***(a) Animals***

##### ***Phase 1: Larval rearing and treatments***

One day post hatching (dph) larvae of European sea bass were purchased from a commercial hatchery (Aquastream, Ploemeur, France). They were distributed among 8 tanks supplied with open flow and aerated sea water (temperature:  $19.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ; salinity:  $35 \pm 0.2$ ). Larvae were fed with Artemia until the end of larval development according to Zambonino-Infante et al. (1996). From 30 to 38 dph, water oxygenation in 4 of the tanks (early life hypoxia treatment, labelled ELHT) was reduced to approximately 40 % while it was maintained at full saturation in the other 4 tanks (normoxic treatment, labelled N). Hypoxia was generated by bubbling  $\text{N}_2$  in a gas equilibration column placed upstream from the experimental tank. Dissolved  $\text{O}_2$  was monitored daily using an Odeon oxygen meter (ODEON

Classic OPTOD, Caudan, France). The water quality parameters (salinity, temperature, pH) were also daily checked in each tank during the experiment. The level of hypoxia was established on the basis of a preliminary study which showed that below 40 % air saturation the survival of 30 dph sea bass larvae is significantly reduced. At the end of hypoxia-exposure, i.e. at 38 dph, larvae were returned to normal oxygen condition until 45 dph (end of phase 1). Survival rates were evaluated for each experimental group at the end of larval development (i.e. 45 dph).

### ➤ *Sampling*

At 38 dph, i.e. just before returning hypoxic groups to normal oxygenation conditions, 12 pools of 3 larvae were sampled from each tank, euthanized with an excess of anaesthetic and processed for RNA extractions. Seven days later (45 dph), 50 larvae from each tank were euthanized with excess of anaesthetic and individually weighed.

### *Phase 2 : Juvenile rearing treatments*

#### ➤ *Intermediate growing phase*

At 50dph, replicate tanks were pooled in one, 1 m<sup>3</sup>-tank per treatment (normoxia; 19.1 ± 0.4°C). Fish were then fed with a commercial diet (NeoSupra, Coopérative Le Gouessant, Lamballe, Côtes-d'Armor, France). At 119 dph, 40 fish from the ELHT and C tanks were selected to represent the frequency distribution of mass in their tank of origin i.e. C: 4.7 ± 1.7 g; H 4.7 ± 2.1 g. They were tagged subcutaneously (Passive Integrated Transponder; PIT-tag) for individual identification and pooled in the same 2 m<sup>3</sup>-tank. Fish were fed with NeoGrower commercial diet (Coopérative Le Gouessant, Lamballe, Côtes-d'Armor, France) and maintained at 24°C. From day 344 to day 358, fish were fed by hand three times a day to visual satiety (visual observation of first feed refusal) over 30-min periods. The quantity of feed distributed per day was recorded, normalized to the biomass in each group and corresponded to the normalized food ingestion rate (NFIR, expressed in percentage). Physiological performance (growth rate and hypoxia tolerance), biochemical (glycaemia) and molecular (gene expressions) evaluations of fish were performed between 295 to 365 dph.

#### ➤ *Hypoxia Challenge Test (HCT)*

At 253 dph, feeding was discontinued for 48h before a standardized hypoxia challenge test was conducted in the rearing tanks according the protocol described in [Roze et al. \(2013\)](#). Briefly, water oxygenation was initially decreased from 100 % air saturation (air sat) down to 10 % air sat within one hour, followed by a slower descent at 1.2 % air sat per hour until the

experiment ended (approximately 4 % air sat). Ambient oxygenation was controlled by bubbling nitrogen in the intake of a submersible pump placed in the tank. Dissolved O<sub>2</sub> was continuously monitored using two oxygen meters distributed in the tank (ODEON Classic OPTOD, Caudan, France). The hypoxia challenge test (HCT) consisted in identifying fish (PIT tag reading) as they lost their capacity to maintain their equilibrium. Upon identification, fish were quickly placed in a fully aerated tank for recovery. The corresponding time and oxygenation level were recorded. The HCT ended when the last fish was recovered.

### ➤ *Growth monitoring*

Fish from each group were weighed at 295, 309, 329, 343 and 361 dph after light anaesthesia (phenoxyethanol: 200 ppm).

### ➤ *Blood and tissue samples*

At 365 dph, 48 h prior to sampling, individuals were left undisturbed and unfed. Fifteen fish from each group were anesthetized (phenoxyethanol, 200 ppm) and a 1-mL blood was drawn from their caudal vein using a heparinized syringe. The fish were then euthanized with an excess of anaesthetic, their livers excised and a piece of white muscle dissected from the dorsal region. Samples were weighed and quickly placed in liquid nitrogen. Fish from both groups were sampled alternately. Since, time of day is believed to influence blood parameters e.g., glycaemia, as well as gene expression, sampling time was used as cofactor in the statistical analyses. Tissue samples were kept at –80°C until analyses.

All experiments were conducted in strict compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

## *(b) Analytical methods*

### *Glycaemia*

Blood samples were centrifuged at 10,000 g for 8 min at 4°C and the plasma was carefully collected, aliquoted and stored at –20°C. Glycaemia was assessed using glucose RTU™ kit (bioMérieux; Marcy l’Etoile, Rhône, France) according to the manufacturer’s instructions.

### Gene expression analysis

#### ➤ *Preparation of total RNA*

Samples (50 to 100 mg) were placed in 1 mL of Extract-all reagent (Eurobio; Courtaboeuf, Essone, France) and homogenised using a Pro Polytron® (BioBlock Scientific; Illkirch, Bas-Rhin, France) tissue disruptor for 30 s. Total RNA was extracted following the manufacturer's instructions. Potential contaminating DNA was removed using an RTS DNase™ Kit (MoBio Laboratories Inc.; Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. The quantity and purity of RNA were assessed using a ND-1000 NanoDrop® spectrophotometer (Thermo Scientific Inc.; Waltham, MA, USA). The integrity of RNA was determined by electrophoresis using an Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). RNA samples were stored at –80°C until use.

#### ➤ *cDNA synthesis*

After extraction, total RNA was reverse transcribed into cDNA using an iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 µg total RNA was reverse transcribed into cDNA in a volume of 20 µL, composed of 15 µL of sample, 4 µL 5x iScript™ Reaction Mix, containing oligo(dT), random primers and RNaseA inhibitor, and 1 µL of iScript™ Reverse transcriptase. Reverse transcription (RT) was performed using a Thermo-cycler TC-152 (Techne Barloworld Scientific; Stone, Staffordshire, UK). cDNA was stored at –20°C until use. RT negative controls (no reverse transcriptase) were performed on each sample.

#### ➤ *Real time PCR (qPCR)*

Prior to analysis, PCR efficiency was estimated for each primer pair using serial dilutions (from 1/5 to 1/320) of a pool of cDNA. Primer efficiency (E) was determined using the slope of the standard curves obtained by the formula  $E = 10^{\frac{-1}{slope}}$ . Through this analysis we ensured that PCR efficiencies ranged from 95% to 105% for each primer pair. Primers were designed using Primer3 software v.0.4. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), based on sequences available from ncbi ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), the sigenae website (<http://www.sigenae.org/>) or a specific sea bass database developed by Ferrarresso et al. (2010) (<http://enne.cribi.unipd.it:5556/biomart/martview/>) (Table 1).

For each sample, qPCR were performed in triplicate using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Briefly, qPCR amplifications were carried out in a final well volume of 15 µL

**Table 1 :** Forward and Reverse Primer sequences used for quantitative PCR. \* used as housekeeping gene.

Gene name (abbreviations)	Accession number on ncbi (S), unipid (#) or sigenae (\$) database	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Elongation Factor 1 ( <i>ef1</i> ) *	AJ866727.1 (S)	5'-GCTTCGAGGAAATCACCAG-3'	5'-CAACCTCCATCCCCTTGAAC-3'
Glucose transporter 2 ( <i>glut2</i> )	EF014277.p.d1.5 (\$)	5'-CAGCTGATCGTTGCACTCAT-3'	5'-TGTGGCATAGACTGGCTGAG-3'
Acetyl-CoA Carboxylase Alpha ( <i>acaca</i> )	DLPD17871 (#)	5'-AGGCTCATGGGTGGTGATAG-3'	5'-GTACCTTCAGCCCTCCAGCAC-3'
EGL Nine Homolog 3 ( <i>egl/n3</i> )	DLPD06823 (#)	5'-TCCCTACTCCACCAGGTACGC-3'	5'-GCAGTCATGTTTGCTCTCCA-3'
Hypoxia inducible factor, isof. 1 alpha ( <i>hif-1α</i> )	DLPD10800 (#)	5'-CCAAGAGAGGAGGCTTTGTG-3'	5'-GCCACTGAGCACAAAAGTTGA-3'
Hypoxia inducible factor, isof. 3 alpha like ( <i>hif-3α-like</i> )	DLPD00697 (#)	5'-GACCTTCCTCAGCAGTTTCG-3'	5'-CTGAATCATCAGCTGGGACA-3'
Lactate dehydrogenase, isof. a ( <i>ldh-a</i> )	DV216873.p.d1.5 (\$)	5'-GAAGCTCATCAGCCATGTGA-3'	5'-TCACACAGGTCCCTTGAGCAG-3'
Insulin-like Growth Factor ( <i>igf-1</i> )	AJ579342.1 (S)	5'-TACTGTGCACCTGCCAAGAC-3'	5'-CTGTGCTGCTCCACGCTCTG-3'

containing 5  $\mu$ L cDNA (1/20 dilution) and 10  $\mu$ L reaction mix, composed of 7.5  $\mu$ L iQ™ SYBR® Green Supermix, containing antibody-mediated hot-started iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers and fluorescein; 1.5  $\mu$ L RNase/DNase free water and 0.5  $\mu$ L of each primer (10 mM). Runs started with a 3 min activation of the hot-started iTaq DNA polymerase at 95°C. Then, 45 PCR amplification cycles, consisting of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C, were performed for all primer pair sets, using an automated iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, USA). In order to evaluate the quality of amplification, melt curve analyses were performed at the end of the PCR protocol. RT negative controls were used as template in order to ensure the absence of residual DNA contamination.

### ➤ *Relative quantification*

For each sample, the corresponding Ct (Cycle threshold) value was determined automatically using Bio-Rad iQ5 software. The relative quantity of messenger was normalised and measured by Bio-Rad iQ5 software using the  $\Delta\Delta$ Ct method. The elongation factor 1-alpha (*ef1a*) gene was chosen as housekeeping gene since its mRNA levels did not exhibit any significant variation between samples (relative standard deviation < 5%) or between the two experimental groups (one-way ANOVA:  $p > 0.5$ ). *Ef1a* gene was already used as reference gene in previous study related to the investigation of target genes expression during hypoxia exposure of fish (e.g. [Olsvik et al., 2013](#)).

### (c) *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using R software ([R Core Team, 2013](#)). For all analyses, variables were checked for normality (Shapiro test) and equality of variances (Levene test). Linear regression was performed to analyse survival rates at the end of larval development. Larval mass at 45 dph were compared using Student-test. One way ANOVA (ELHT versus C) was used for larvae gene expression analyses. ANCOVA have been applied on glycaemia and juvenile gene expression analyses using sampling time as a cofactor and early life oxygenation conditions as the main effect. To analyse potential impact of early oxygenation conditions on growth, a repeated measure mixed model approach was conducted where five time points (295, 309, 329, 343 and 361 dph) were repeated measures of mass for each fish. Finally, a Mantel-Cox model (also called logRank test) was used for the hypoxic challenge analysis, with early life oxygen treatment as main effect. Differences were considered significant at the 95% confidence level ( $p$ -value < 0.05).

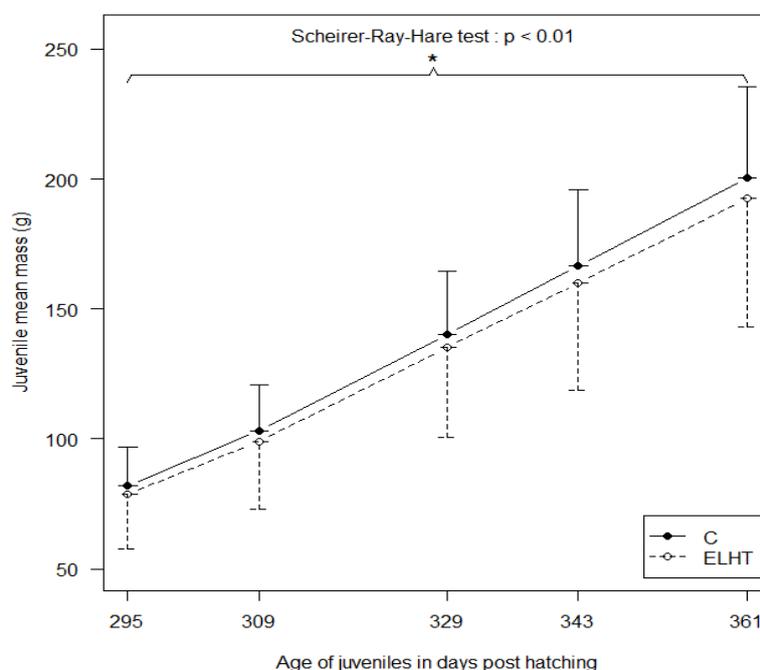
## Results

### *Effect of hypoxia exposure during the larval stage*

Growth ( $C = 31.4 \pm 1.1$  mg;  $ELHT = 27.8 \pm 1.5$  mg;  $p > 0.09$ ) and survival rate ( $C = 44.9 \pm 7.2\%$ ;  $ELHT = 44.7 \pm 5.3\%$ ;  $p = 1$ ) were similar in the C and ELHT groups at the end of larval development (45 dph). While levels of hif mRNAs (hif-1 $\alpha$  and hif-3 $\alpha$ -like) were not significantly influenced by hypoxia, the amount of egl3 transcripts was significantly higher (400 %) in larvae that had been exposed to low ambient oxygenation (**Table 2**). Concerning genes involved in metabolism, the quantities of ldh-a and glut2 transcripts were significantly higher (21.3% and 46%, respectively) in the hypoxic environment contrary to acaca, which exhibited lower mRNA levels (11%).

### *Effect of larval hypoxia exposure on juvenile growth*

Growth of juveniles was monitored from 295 dph, i.e. 257 days after the hypoxia exposure ended (**Fig. 1**). Juvenile growth rate was significantly affected by early life oxygen treatment (repeated measures mixed model:  $p < 0.05$ ) with a 5% lower growth rate in the ELHT group compared to the C group. No significant difference in feed intake was observed between the two groups ( $NFIR_C = 1.6 \pm 0.001\%$ ;  $NFIR_{ELHT} = 1.6 \pm 0.001\%$ ).



**Figure 1:** Mean mass of European sea bass juveniles previously exposed (ELHT : - -) or not (C : -) to a moderate hypoxia episode during larval development ( $\pm$  s.d.,  $n = 40$  per group). Asterisk indicates significant differences in growth rate between the C and ELHT groups (Scheirer-Ray-Hare test:  $p < 0.01$ ).

**Table 2.: Relative expression levels of genes involved in the HIF pathway, metabolism, growth and epigenetic regulation.** Analysis was performed on RNA from whole European sea bass larvae exposed (H) or not (C) to hypoxia (n for each group = 12 pools of 3 larvae) and from hepatic and muscular tissues of juveniles from Early Life Hypoxia Treatment (ELHT) or Control (C) groups (n for each group = 15 juveniles). P-value was calculated from an ANCOVA analysis. NI = Not Investigated.

Biol. process	Genes	Tissue and life stage											
		Whole larvae				Liver of juvenile				Skeletal muscle of juvenile			
		C	H	p-value	(H-C)/C (%)	C	ELHT	p-value	(ELHT-C)/C (%)	C	ELHT	p-value	(ELHT-C)/C (%)
HIF pathway	<i>hif-1α</i>	0.82	0.83	0.779	+ 1.2	1.15	1.09	0.509	- 5.6	1.08	1.05	0.504	- 2.8
	<i>hif-3α-like</i>	0.73	0.80	0.052	+ 9.6	0.99	0.98	0.689	- 1.2	1.06	1.10	0.684	+ 3.8
	<i>egln3</i>	<b>0.15</b>	<b>0.75</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>+ 400.0</b>	<b>0.47</b>	<b>0.69</b>	<b>0.004</b>	<b>+ 46.2</b>	<b>0.97</b>	<b>1.18</b>	<b>0.090</b>	<b>+ 21.6</b>
Metabolism	<i>glut2</i>	<b>0.58</b>	<b>0.85</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>+ 46.6</b>	<b>1.15</b>	<b>1.01</b>	<b>0.032</b>	<b>- 12.3</b>	<b>0.81</b>	<b>0.97</b>	<b>0.58</b>	<b>+ 19.7</b>
	<i>acaca</i>	<b>1.00</b>	<b>0.89</b>	<b>0.001</b>	<b>- 11.0</b>	<b>0.90</b>	<b>0.69</b>	<b>0.025</b>	<b>- 23.3</b>			<i>NI</i>	
	<i>ldh-a</i>	<b>0.75</b>	<b>0.91</b>	<b>0.028</b>	<b>+ 21.3</b>	<b>0.82</b>	<b>1.02</b>	<b>0.021</b>	<b>+ 23.9</b>	<b>0.88</b>	<b>0.91</b>	<b>0.518</b>	<b>+ 3.4</b>
Growth	<i>igf-1</i>			<i>NI</i>		0.93	0.81	0.385	- 12.4	0.72	0.63	0.280	- 12.5

### *Effect of larval hypoxia exposure on glycaemia in juveniles*

Blood glycaemia was assessed in juveniles from both two groups at 365 dph. Glycaemia was significantly lower in juveniles from the ELHT group (+16 %) than from the C group (C =  $8.0 \pm 1.2$  mmoles.L<sup>-1</sup>, ELHT =  $6.7 \pm 0.8$  mmoles.L<sup>-1</sup>; ANCOVA:  $p < 0.001$ ).

### *Effect of larval hypoxia exposure on the expression of genes involved in metabolism, oxygen sensing and growth in juveniles*

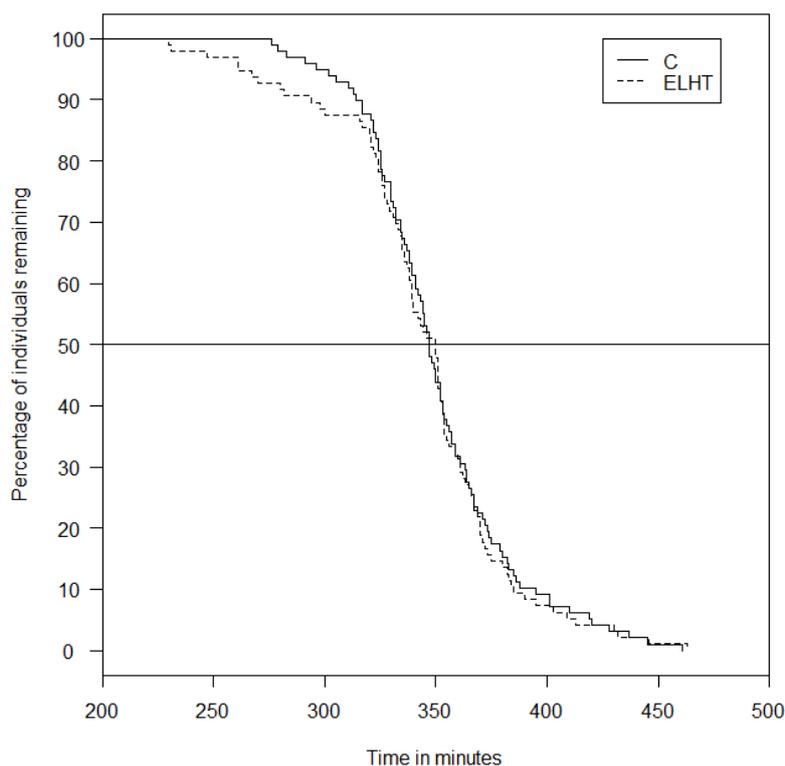
Real time PCR analysis (**Table 2**) showed significant increase of liver Idh-a expression (23.9 %) in juveniles from ELHT group. The glucose transporter glut2 exhibited also significant decreased (12.3%) expression in the liver of ELHT group. By contrast, there was no significant difference in the transcript levels of Idh-a and glut2 genes in the white muscle between the two groups. Acaca gene exhibited lower mRNA levels (23.3%) in the liver of juveniles from ELHT group compared with the C group. However, its expression was not significantly regulated in the white muscle tissue.

While hepatic and muscular levels of hif mRNAs (hif-1 $\alpha$  and hif-3 $\alpha$ -like) were not significantly impacted by early exposure to hypoxia, levels of egl3 transcripts were significantly higher in the liver (46.2%) but not in the skeletal muscle ( $p = 0.09$ ) of the ELHT group compared with the C group.

Finally, qPCR investigation did not reveal any differential expression of the Insulin-like Growth Factor-1 (igf-1) gene in hepatic nor in muscular tissues.

### *Effect of larval hypoxia exposure on juvenile tolerance to an acute hypoxia challenge*

Comparison of experimental groups with regard to hypoxia tolerance showed no statistically significant difference (**Fig.2**). Time to cull 50 % of the population was 346.9 min in the C group and 349.9 minutes in the ELHT group; Mantel-Cox model:  $p > 0.5$ ).



**Figure 2 :** Kaplan-Meier probability plot of tolerance time during a Hypoxia Challenge Test in juveniles (253 d.p.h.) from Control (C : -) and Early Life Hypoxia Treatment (ELHT : - -) groups (n = 40 per group). The horizontal line indicates time for removal of half of the population (T50). Statistical analysis showed that tolerance to hypoxia was not significantly different between the two groups (Mantel-Cox model:  $p > 0.5$ ).

### *Discussion*

The present work demonstrates that early life exposure to a moderate hypoxic event has long-lasting effects on the phenotype of a marine fish species. It is noteworthy that compared to the normoxic group, the hypoxic constraint applied in the present study did not induce significant mortality. This strongly suggests that no selection occurred under low oxygenation towards specific physiological performance. Rearing conditions were chosen to be appropriate for harmonious larval and juvenile development. The efficient growth rates that we observed for both larval and juvenile periods are evidence of this suitability, which strengthens the validity of physiological data obtained.

Early exposure to moderate hypoxic conditions had a long-term impact on fish growth rate. There have been few reports, until now, of any delayed effect of hypoxia on growth. Work by [Craig et al. \(2007\)](#) and [Eby et al. \(2005\)](#) only addressed an indirect delayed effect of hypoxia exposure on the growth of fish fleeing from hypoxic areas to oxygenated but

confined areas. Present data suggest that a delayed effect on growth rate following exposure of fish to low oxygen concentrations can also result from a direct impact of an early hypoxic stress on fish physiology. Immediate stunting induced by hypoxia has been observed in various fish species at different life stages [e.g. Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) (McNatt and Rice, 2004), red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Perez-Dominguez and Holt, 2006), summer flounder (*Paralichthys dentatus*), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) (Stierhoff et al., 2006), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) (Wexler et al., 2011) and great sturgeon (*Huso huso*) (Lakani et al., 2013)]. The short-term impact on growth is known to be due to reduced feed intake and metabolic depression (Pichavant et al., 2000; Stierhoff et al., 2006). It is noteworthy that the hypoxic constraint experienced by the larvae between 30 and 38 dph did not significantly affect their mass at the end of larval development (i.e. 45 dph). Since exposure to hypoxia was expected to induce immediate growth impairment due to reduced feed intake and metabolic depression, the similarity of the mean weight observed in both groups at 45 dph may be explained by a compensatory growth occurring in larvae from the ELHT group between 38 and 45 dph. Feed intake of larvae was not monitored during exposure to hypoxia since it would have required radiolabeled nutrients (Conceicao et al., 2007) but the respective up and down-regulation of *ldh-a* and *acaca* genes observed at 38 dph suggested a possible regulation of metabolic processes during larval exposure to hypoxia.

It has been suggested that compensatory strategies occurring during early life stages, even if they offer immediate benefits, involve functional trade-offs which may result in lower fitness at later life stage (Burton et al., 2011; Metcalfe and Monaghan, 2001; Metcalfe and Monaghan, 2003; Monaghan, 2008). The long-term impact of hypoxia exposure on juvenile growth that we observed may result from just such a physiological trade-off. It is indeed noteworthy that the reduced growth observed in the ELHT group was not a consequence of lower feed intake and that it was not associated to modification in the expression of the growth-related gene *igf-1*.

The subsequent impacts on physiological performance of stressful conditions experienced during early development have been suggested to involve metabolic disorders (Burton et al., 2011; Metcalfe and Monaghan, 2003). Even if present gene expression data should be taken with caution since they do not reflect the concentration and/or activity of the related proteins, the down-regulation of *acaca* gene and the up-regulation *ldh-a* gene in the hepatic tissue of juveniles support this idea. Such regulation suggests that juveniles that experienced low oxygen conditions at the larval stage are likely to exhibit a metabolism with specific features observed in organisms acutely exposed to hypoxia (Richards, 2009) i.e. a

tendency to activate the anaerobic metabolism and to limit the functioning of energy consuming (e.g. fatty acid synthesis) metabolic pathways in the liver. Additional biochemical analyses (e.g. activity of key enzymes of aerobic and anaerobic metabolic pathways such as LDH-a, citrate synthase or citrate oxidase) would be necessary to confirm a metabolic depression-related impaired growth in the juveniles that experienced low oxygen concentration during the larval stage. Moreover, the repeatability of our data related to metabolic parameters would deserve to be confirmed by multiple measurements.

The lower glycaemia and the down-expression of the glucose transporter *glut2* in the liver of juveniles from the ELHT group supports long-lasting impact of hypoxia exposure on glucose metabolism. The lower glycaemia combined with the down-expression of *glut2* supports good correlation between *glut2* expression in liver and blood glucose observed by [Hall et al. \(2006\)](#) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Since regulation of plasma glucose concentration results from a complex interplay between several tissues (muscle, liver, brain, fat, gut and others...), further investigation will be necessary to decipher the different pathways involved in the control of energy metabolism and particularly glucose metabolism. Present data reveal that *glut2*, *acaca* and *ldh-a* gene expressions were not significantly modulated in muscle suggesting that muscular metabolism of juveniles would be less sensitive to early hypoxia exposure.

Even if the molecular mechanisms underlying this plastic physiological response still need to be deciphered, results obtained in the present work suggest that the HIF pathway might be involved in the determination of this phenotype. Juveniles preconditioned to hypoxia during their larval stage exhibit a higher expression of the *egln3* gene in the hepatic tissue. *Egln3* is involved in the hydroxylation of HIF proteins and it is considered as a cellular oxygen sensor. It has been shown to be a privileged target gene of HIFs in mammals ([Pescador et al., 2005](#)). In addition, hepatic *ldh-a* expression and blood glucose concentration that we found regulated in juveniles preconditioned to hypoxia, are two biological parameters known to be influenced by HIF signalling ([Firth et al., 1995](#); [McClain et al., 2013](#)). It is then reasonable to assume a regulation of HIF pathway in juveniles previously exposed to hypoxia, although we failed to detect any significant regulation of HIF gene at the transcriptional level. This hypothesis has to be confirmed in a near future by the investigation of post transcriptional regulation of HIFs (e.g. hydroxylation, acetylation).

One other interesting result of the present study is that similar regulations of *egln3* and *ldh-a* genes were found in larvae under hypoxic conditions and in the liver of subsequent juveniles although maintained under normoxic conditions. This data suggests that

transcriptional imprinting could have occurred during the early exposure to hypoxia. Although further investigations will be necessary to determine the molecular mechanisms underlying this regulation, we assume that an epigenetic modulation could be responsible for such hypoxia-induced transcriptional imprinting as already reported in fish (Ho and Burggren, 2012).

No effect of hypoxia preconditioning on hypoxia tolerance was observed in the present work. This result is counterintuitive since preconditioning was also associated with changes in molecular components believed to be involved in the response to reduced oxygen availability. This is also contrasting with previous reports suggesting that hypoxia acclimation improved hypoxia tolerance in fish (Fu et al., 2011; Yang et al., 2013). However, our result was based on an acute hypoxic challenge and cannot predict responses of preconditioned juveniles to chronic hypoxic constraints.

### ***Conclusion***

Altogether the results of present study provide evidences that early exposure to moderate hypoxia impacts the subsequent fish growth and some metabolic parameters. This data is interesting since it could inform decisions aimed at anticipating the ecological and economical consequences of climate-related changes in production systems. From an animal production perspective, it could also provide an interesting tool for the aquaculture industry to capitalize on phenotypic plasticity, and not only genetic selection, to optimize production in a changing environment.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank Helen McCombie for her help with editing the English language.

The first author was supported by a joint Ifremer–Région Bretagne doctoral grant.

### **Competing interests**

No competing interests declared.



**Article en cours de rédaction - La fonction digestive des juvéniles de bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) est affectée par un événement hypoxique intervenu au cours du développement larvaire**

Vanderplancke Gwenaëlle <sup>1\*</sup>, Claireaux Guy <sup>2</sup>, Quazuguel Patrick <sup>1</sup>, Huelvan Christine <sup>1</sup>,  
Nicolas Le Bayon <sup>1</sup>, Louis Bourdonnay <sup>1</sup>, Alexia Dubuc <sup>1</sup>, Pierre Quéau <sup>1</sup>, Zambonino-Infante  
José-Luis <sup>1</sup>, and Mazurais David <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> UBO, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France.

**Mots-clés:** Hypoxie, Programmation environnementale, Larves de poissons marins, Digestion, Assimilation, Métabolisme



### ***Résumé***

Des bars Européen (*Dicentrarchus labrax*) exposés à une hypoxie chronique (8 jours) modérée (40% de saturation à l'air) au stade larvaire (groupe ELHT, Early Hypoxia Treatment), montrent une croissance plus faible au stade juvénile que des individus n'ayant jamais connu d'épisode hypoxique (groupe C, Contrôle). Cette différence de croissance n'étant pas imputable à une prise alimentaire différente (quantité d'ingéré similaire dans les 2 groupes), l'hypothèse de métabolismes différents résultant en une allocation énergétique moindre pour la croissance a été émise et a fait l'objet d'études complémentaires. Les déterminations des taux métaboliques standards et actifs n'ont pas révélé de différence significative entre le groupe ELHT et le groupe C. Par contre les SDA (Specific Dynamic Action) correspondant à l'énergie mobilisée par l'ingestion, l'absorption et la transformation des nutriments, appréhendées à travers l'étude de la consommation d'oxygène postprandiale, présentent des caractéristiques différentes en fonction des groupes. L'impact de l'exposition précoce à un environnement hypoxique sur le processus digestif est confirmé par les mesures de bilan énergétique qui révèlent, à ingestion égale, une quantité d'énergie non assimilée dans les fèces plus importante dans le groupe ELHT. Des dosages enzymatiques réalisés au niveau intestinal suggèrent fortement que la différence d'assimilation observée pourrait résulter, au moins en partie, d'une activité moindre des enzymes impliquées dans la digestion des protéines.

### ***Introduction***

En situation d'hypoxie les poissons peuvent présenter une diminution de croissance qui a été jusqu'ici principalement attribuée à une baisse de la prise alimentaire et donc globalement de l'énergie ingérée. La quantité d'énergie disponible pour la croissance dépend du registre métabolique de l'animal, à savoir la quantité d'énergie qui peut être mobilisée à un instant donné dans un environnement donné pour répondre à ses besoins métaboliques (Fry, 1971; Lapointe et al., 2006). Cette quantité mobilisable d'énergie correspond à la différence entre le taux métabolique actif (AMR, Active Metabolic Rate) et le taux métabolique basal (SMR, Standard Metabolic Rate). Il a été observé chez les poissons en situation d'hypoxie des diminutions de ces taux métaboliques et notamment de l'AMR (Wang et al., 2009). La baisse de l'énergie disponible pour le poisson en situation d'hypoxie peut aussi résulter d'une diminution de l'efficacité d'assimilation, qui peut être évaluée par la mesure de l'énergie allouée à la digestion (SDA, Specific Dynamic Action) (Bernier et al., 2012; Saravanan et al.,

2013; Wang et al., 2009). Plus généralement, chez des animaux qui ne sont pas en période de reproduction, la quantité d'énergie allouée à la croissance va globalement correspondre à la différence entre l'énergie ingérée au travers l'alimentation (gain) et la somme des énergies dépensées dans le métabolisme et excrétées dans les urines et les fèces (pertes) (Wang et al., 2009). Les effets immédiats de l'hypoxie sur la croissance et les paramètres métaboliques ont été largement décrits (Claireaux and Lagardere, 1999; Dan et al., 2014; Lapointe et al., 2014; Pichavant et al., 2001; Pichavant et al., 2000; Stierhoff et al., 2009; Thetmeyer et al., 1999; Wang et al., 2009; Wei et al., 2008), et sont généralement réversibles lorsque les poissons reviennent en situation de normoxie. Nous avons montré que des poissons ayant vécu un épisode hypoxique modéré de 8 jours au cours de leur développement larvaire (groupe ELHT, Early Life Hypoxia Treatment) présentaient une croissance plus faible au stade juvénile que des individus élevés en condition de normoxie (groupe C, Contrôle) (Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans *Marine Biology*). Cette diminution de la croissance n'est pas consécutive à une prise alimentaire – ou ingéré – différente entre les deux groupes. Ce résultat suggère pour la première fois que l'hypoxie vécue pendant les stades précoces de vie a un effet à long-terme sur la croissance des poissons, qui pourrait possiblement résulter de métabolismes différents se caractérisant notamment par une allocation d'énergie moindre pour la croissance. Les effets à long-terme de l'hypoxie n'ont fait l'objet que de peu d'études chez les poissons (Cook et al., 2013; Mulvey and Renshaw, 2000) et le résultat de Vanderplancke et al. offre des perspectives intéressantes pour mieux appréhender la dynamique des populations dans le milieu naturel.

Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si la différence de croissance observée pour le groupe de poissons ayant subi l'exposition précoce à l'hypoxie était associée à des modifications (1) des métabolismes basaux (SMR), actifs (AMR) et liés à la digestion (SDA), (2) de l'assimilation de la nourriture par les animaux et (3) de l'activité des enzymes digestives des individus des 2 groupes.

### ***Matériel et Méthodes***

Les 47 poissons (24 individus issus du groupe C et 23 individus issus du groupe ELHT), de sexe indéterminé, et destinés aux expérimentations suivantes, ont été prélevés au hasard à 450 d.p.h. dans les populations expérimentales. Ils ont été pesés (C =  $314.7 \pm 15.9$  g, ELHT =  $305.0 \pm 13.9$  g) puis maintenus en conditions normoxiques à une température de 20°C et à 32.2‰ de salinité. Les poissons ont été nourris, sauf mention contraire, ad libitum au cours de

l'intégralité des expérimentations avec l'aliment commercial « Neo Grower Extra Marin » (Coopérative Le Gouessant ; Lamballe, Côtes d'Armor, France), composé de 43% de protéines et de 20% de lipides.

### Mesures des taux métaboliques

#### ➤ *Mesure de la SDA et du SMR*

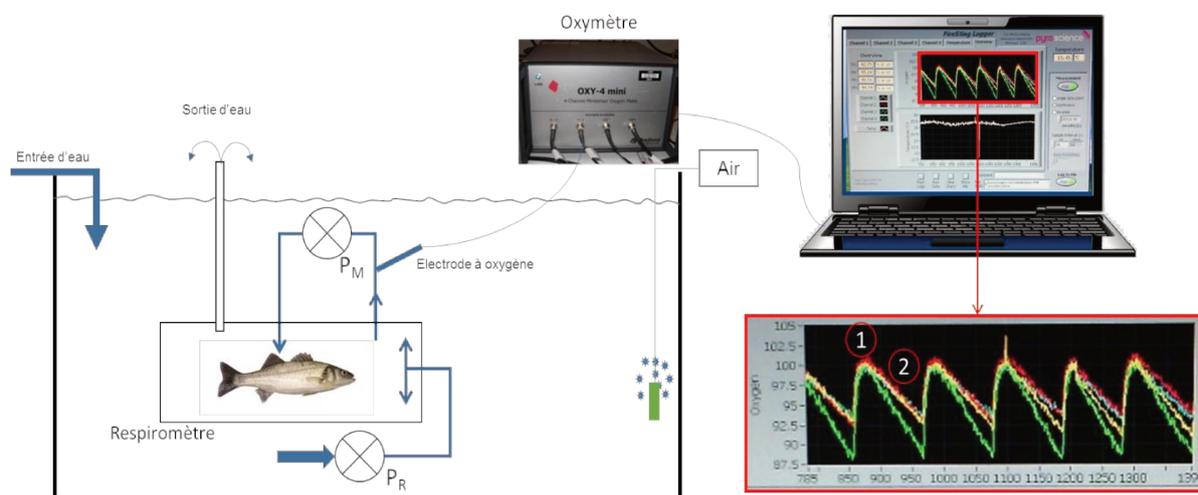
De 455 à 478 d.p.h., les 24 juvéniles du groupe C et les 23 juvéniles du groupe ELHT ont été placés en respirométrie statique afin de déterminer leur taux métabolique basal et leur métabolisme digestif. Les mesures du taux métabolique associé à la digestion (SDA) et du taux métabolique basal (SMR) ont été effectuées à l'aide de respiromètres d'une contenance de 8L. Ces respiromètres étaient alimentés pendant 5 min toutes les 4 min avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-réglée à 20°C. La teneur en oxygène du respiromètre était mesurée en continu via une électrode reliée à un oxymètre elle-même reliée à un système d'enregistrement des données. Les mesures des consommations en oxygène (MO<sub>2</sub>) ont été effectuées pendant les phases de 4 min au cours desquelles l'eau n'était pas renouvelée (**Fig. 1**). Dans un premier temps, la SDA a été mesurée pendant environ 35 h en introduisant un individu dans le respiromètre immédiatement après lui avoir fait ingérer à l'aide d'une sonde gastrique une quantité d'aliment (1.5 g d'eau distillée pour 1 g d'aliment) correspondant à 1.5% de sa masse corporelle. L'animal était alors laissé dans le respiromètre pendant 3 jours afin qu'il récupère, qu'il soit à jeun et qu'il se place en situation de repos afin de permettre la mesure du SMR. Chaque individu était pesé en entrée et en sortie du respiromètre. Des mesures de MO<sub>2</sub> sur le respiromètre vide ont été effectuées afin d'estimer la consommation en oxygène d'origine bactérienne en vue d'appliquer d'éventuelles corrections.

Les consommations en oxygène pour la SDA et le SMR, exprimée en mgO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, ont été calculées suivant la formule 1 :

$$MO_2 = \Delta[O_2] \times [O_2] \times \frac{(Vol_R - Vol_I)}{M}$$

où :  $\Delta[O_2]$  = variation de la teneur en oxygène de l'eau contenue dans le respiromètre au cours de la phase de mesure,  $[O_2]$  = concentration en oxygène de l'eau à saturation à 20°C et à une salinité de 34‰ (soit 7.44 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), Vol<sub>R</sub> = volume d'eau contenu dans le respiromètre (en L), Vol<sub>I</sub> = volume de l'animal dans le respiromètre avec une densité égale à 1 (en L) et M = Masse du poisson (en kg).

Les consommations en oxygènes correspondant au SDA ont été transformées en nombre de calories en utilisant le coefficient oxycalorique (Vinberg, 1971). Il a été possible de définir trois paramètres qui caractérisent la SDA : la hauteur du pic de consommation d'oxygène, sa durée et sa magnitude.



**Figure 1 : Schéma du dispositif de respirométrie statique.** Les respiromètres de 8L étaient placés dans un bac de 100L où l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-régulée à 20°C circulait. La pompe  $P_R$  assurait le renouvellement de l'eau à l'intérieur du respiromètre pendant que la pompe  $P_M$  assurait la circulation de l'eau à l'intérieur du respiromètre afin de permettre la mesure de l'oxygène. Le niveau d'oxygène contenu dans le respiromètre était mesuré via une électrode à oxygène elle-même reliée à un oxymètre. Les mesures s'effectuaient pendant les phases de 4 min ② suivant les périodes de renouvellement de l'eau du respiromètre de 5 min ①. Le poisson était placé dans le respiromètre immédiatement après lui avoir fait ingérer à l'aide d'une sonde gastrique une quantité d'aliment (1.5 g d'eau distillée pour 1 g d'aliment) correspondant à 1.5% de sa masse corporelle. Son SDA était alors mesuré pendant environ 35h. L'animal était alors laissé dans le respiromètre pendant 3 jours afin qu'il récupère, qu'il soit à jeun et qu'il se place en situation de repos afin de permettre la mesure du SMR.

### ➤ *Mesure de l'AMR*

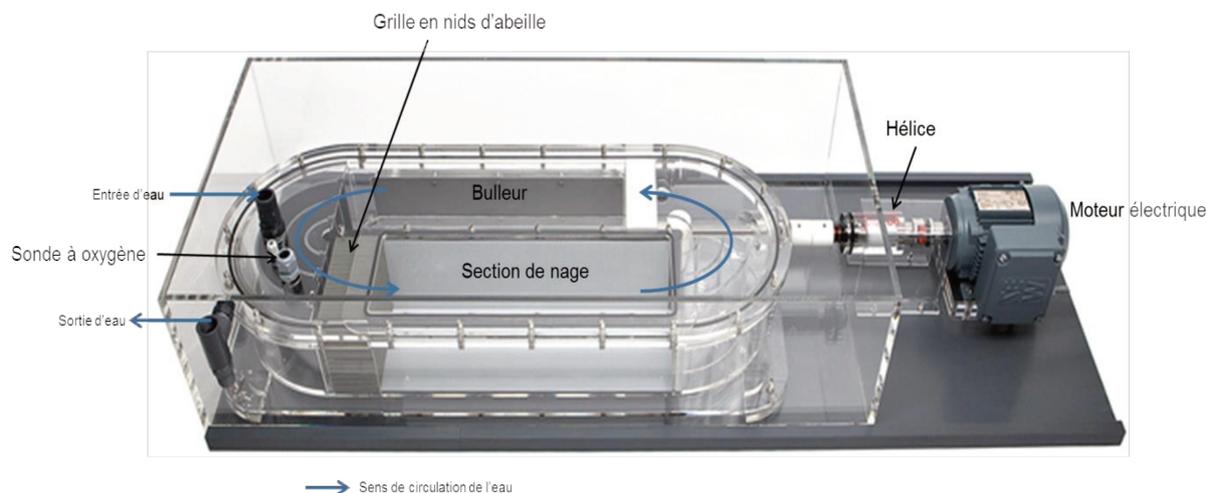
De 478 à 494 d.p.h., les 24 juvéniles du groupe C et les 23 juvéniles du groupe ELHT ont été placés en tunnel de nage afin de déterminer leur taux métabolique actif. Les mesures du taux métabolique actif (AMR) ont été effectuées à l'aide d'un tunnel de nage d'une

capacité de 29L (Loligo Systems, Tjele, Danemark). Le tunnel de nage était alimenté avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-régulée à 20°C. La section de nage était longue de 50 cm, large de 14 cm, haute de 14 cm pour un volume de 9.8 L. Un courant d'eau laminaire était assuré au sein de la chambre de nage par une grille en nids d'abeille, placée en amont de la chambre. La vitesse de l'eau au sein du tunnel de nage était modulée via un moteur électrique relié à une hélice et à un variateur de fréquence. La teneur en oxygène du respiromètre était mesurée en continu via une électrode reliée à un oxymètre elle-même reliée à un système d'enregistrement des données (**Fig. 2**). Les mesures de l'AMR ont été réalisées après les mesures de la SDA et de la SMR en respirométrie statique. Par conséquent, les animaux étaient à jeun depuis au moins 12h. Suite au transfert d'un individu dans le tunnel de nage, celui-ci était laissé au calme et sans perturbations extérieures pendant 2 h afin de respecter une phase d'acclimatation (Roze et al., 2013). La vitesse de l'eau était alors augmentée, à raison de 1.7 cm.s<sup>-1</sup> toutes les 15s, jusqu'à ce que l'animal ne puisse plus maintenir sa position dans la chambre de nage et vienne prendre appui sur la paroi grillagée du fond de la chambre. A ce moment-là, la vitesse de l'eau était ramenée à 10 cm.s<sup>-1</sup> et le suivi automatique de la teneur en oxygène du respiromètre était alors déclenché pour une période de 3h. A ces fins, le tunnel de nage était alimenté en eau de mer pendant 6 min toutes les 3 min. Les mesures des consommations en oxygène (MO<sub>2</sub>) ont été effectuées pendant les phases de 3 min au cours desquelles l'eau n'était pas renouvelée. Des mesures de MO<sub>2</sub> sur le tunnel de nage vide ont été effectuées afin d'estimer la consommation en oxygène d'origine bactérienne en vue d'appliquer d'éventuelles corrections.

Les consommations en oxygène pour l'AMR, exprimée en mgO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, ont été calculées suivant la formule 2 :

$$MO_2 = (P_p - P_b) \times \frac{\alpha_{O_2}/100}{M/1000} \times Vol \times 60$$

où : P<sub>p</sub> = pente maximale de consommation d'oxygène obtenue chez le poisson, P<sub>b</sub> = pente de consommation bactérienne, α<sub>O<sub>2</sub></sub> = coefficient de solubilité de l'oxygène à 20°C et à une salinité de 34‰ (soit 2.539 d'après Weiss, 1970), M = Masse du poisson (en kg) et Vol = volume d'eau contenu dans la section de nage du tunnel de nage (en L).



**Figure 2 : Schéma du dispositif de tunnel de nage.** Le tunnel de nage de 29L était alimenté avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-réglée à 20°C. La vitesse de l'eau au sein du tunnel de nage était modulée via un moteur électrique relié à une hélice et à un variateur de fréquence. Le niveau d'oxygène contenu dans le respiromètre était mesuré via une électrode à oxygène elle-même reliée à un oxymètre. Les mesures ont été effectuées pendant 3h après un test d'effort (nage forcée) mené jusqu'à épuisement de l'animal. Pour les mesures, le tunnel de nage était alimenté en eau de mer pendant 6 min toutes les 3 min. Les mesures des consommations en oxygène ( $MO_2$ ) ont été effectuées pendant les phases de 3 min au cours desquelles l'eau n'était pas renouvelée. (Source de l'image : <http://qubitsystems.com>)

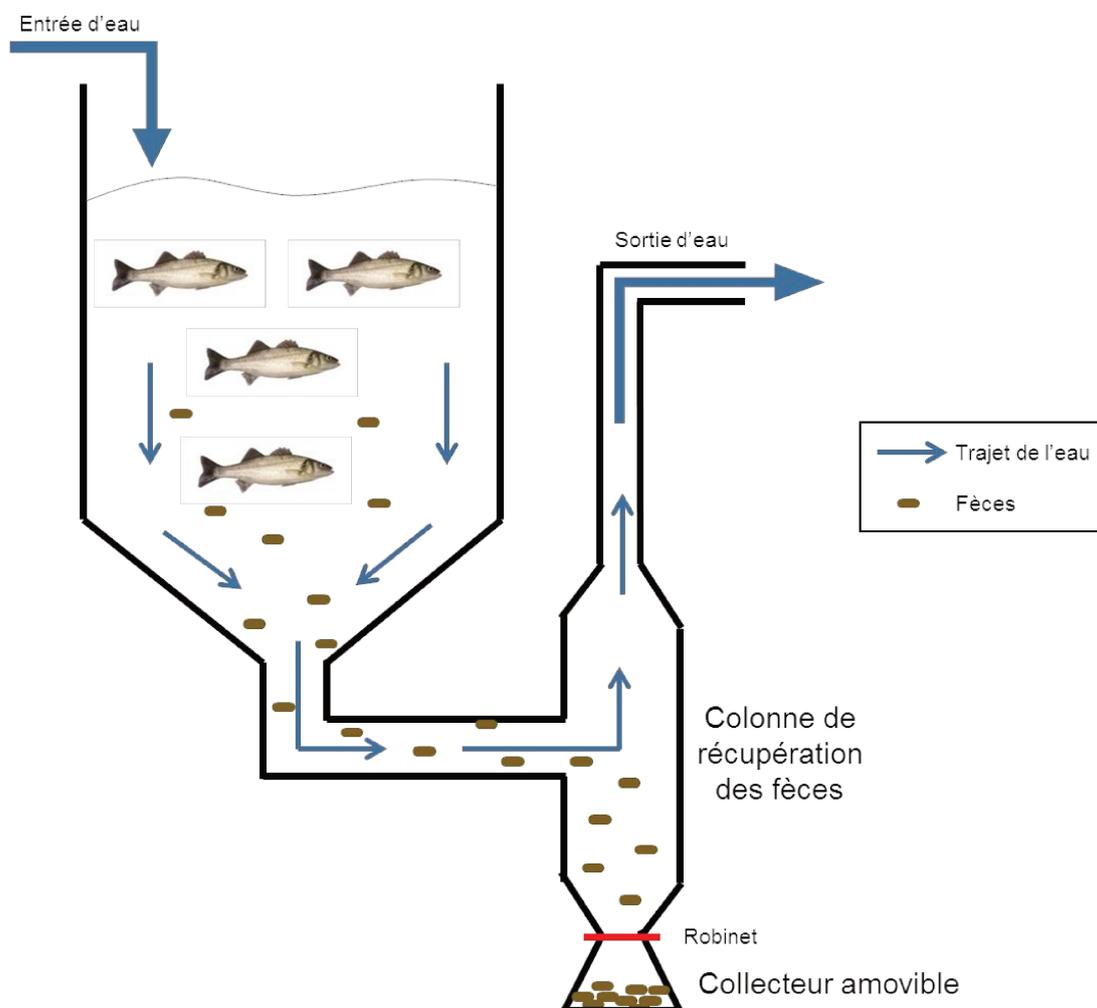
### Mesures du contenu énergétique des fèces

#### ➤ *Dispositif expérimental, distribution des repas et recueil des fèces*

De 554 à 620 d.p.h., les 24 juvéniles du groupe C et les 23 juvéniles du groupe ELHT ont été placés dans deux bassins cylindro-coniques de 900L équipés de colonnes de récupération des fèces (**Fig. 3**). Les bassins étaient alimentés en circuit ouvert ( $450 \text{ L.h}^{-1}$ ) avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-réglée à 20°C. Tous les 15 jours, les poissons étaient changés de bassin expérimental afin d'éliminer le facteur bac.

Pour chaque groupe, les valeurs d'ingéré ont été recalculées ( $C = 1.3 \pm 0.001\%$ , ELHT =  $1.4 \pm 0.001\%$ ) dans le but de définir la quantité d'aliment à distribuer afin de s'assurer que la totalité de l'aliment distribué est ingéré (0.8% de la biomasse pour les 2 groupes). Les animaux ont été placés en photopériode 12h-12h et nourris manuellement pendant 10 minutes, avec la quantité d'aliment calculée précédemment, tous les 3 jours. A l'issue de chaque

distribution de repas, les fèces étaient récupérées en trois fois au cours des 48h suivantes (à 24h, 32h et 48h). Pour ce faire, l'alimentation en eau du bassin était temporairement interrompue, la salinité de l'eau du bassin était mesurée et les fèces étaient récoltées dans les collecteurs amovibles.



**Figure 3 :** Schéma du dispositif de récupération des fèces. Deux bassins cylindro-coniques de 900L étaient alimentés en circuit ouvert ( $450 \text{ L.h}^{-1}$ ) avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-régulée à  $20^\circ\text{C}$ . Les animaux ont été placés en photopériode 12h-12h et nourris manuellement pendant 10 minutes, avec une quantité d'aliment correspondant à 0.8% de la biomasse du bassin, tous les 3 jours. A l'issue de chaque distribution de repas, les fèces étaient récupérées en trois fois au cours des 48h suivantes (à 24h, 32h et 48h). Pour ce faire, l'alimentation en eau du bassin était temporairement interrompue, la salinité de l'eau du bassin était mesurée et les fèces étaient récoltées dans les collecteurs amovibles.

### ➤ *Analyse des échantillons*

Les fèces récupérées étaient laissées en décantation pendant 15 min. Le surnageant était alors éliminé et le culot était centrifugé à 1 500 tours/min pendant 6 min. A l'issue de la centrifugation, le surnageant était éliminé et les fèces étaient pesées avant (poids humide) et après (poids sec) passage à l'étuve à 110°C pendant 24h. Cette dernière étape permettait de déterminer la quantité de sel contenu dans l'échantillon. A l'issue du séchage des fèces, les échantillons étaient broyés au broyeur à billes, puis les échantillons d'un même groupe étaient poolés et homogénéisés. La mesure du contenu énergétique des fèces était alors effectuée en utilisant une bombe calorimétrique adiabatique IKA C 4000 A. Pour cela, environ 0.3 g d'échantillon était enveloppé dans un morceau de papier de valeur énergétique connue. L'échantillon était alors placé dans la chambre de réaction dans laquelle était injecté de l'oxygène à une pression de 30 bars. La température initiale dans la chambre de réaction était mesurée. La combustion de l'échantillon était déclenchée en utilisant un fil de platine et un fil de coton dont les valeurs énergétiques étaient également connues. La température de la chambre à la fin de la combustion était alors mesurée. La capacité thermique du calorimètre étant connue, la quantité de chaleur produite par la combustion était déterminée en corrigeant avec les valeurs de chaleur apportées par le système de mise à feu. Pour chaque échantillon, la mesure a été réalisée 5 fois.

### *Analyses des activités enzymatiques*

Les 47 juvéniles de bar (24 dans le groupe C et 23 dans le groupe ELHT) âgés de 823 d.p.h. sont restés à l'abri de perturbations extérieures et à jeun pendant 8 h. Pour les prélèvements, les animaux ont été légèrement anesthésiés avec 200 ppm de phénoxyéthanol avant d'être euthanasiés par excès d'anesthésiant. Les cæca pyloriques ont été séparés des intestins. Ces derniers ont été disséqués sur une plaque de verre maintenue à 0°C avant d'être stockés à -20°C.

Les bordures en brosse ont été extraites des échantillons d'intestin d'après la méthode décrite par [Crane et al. \(1979\)](#). Le dosage des protéines a ensuite été effectuée par la méthode de [Bradford \(1976\)](#) avant de doser les activités enzymatiques de l'Acaline Phosphatase (AP), la Leucine-Alanine Peptidase (Leu-Ala), l'Amino-peptidase-N (N-LAP) et la Sucrase suivant les méthodes décrites par [Bessey et al. \(1946\)](#), [Nicholson and Kim \(1975\)](#), [Maroux and Louvard \(1975\)](#) et [Dahlqvist \(1968\)](#), respectivement. Les activités enzymatiques ont été exprimées comme des activités spécifiques, c'est-à-dire en unité par mg de protéines.

## ***Résultats et Discussion***

### ***Etude des différents taux métaboliques (SMR, AMR et SDA)***

Les analyses par respirométrie des taux métaboliques indiquent que ni le SMR, ni l'AMR des juvéniles ne sont significativement affectés par le conditionnement hypoxique précoce (Tests-t de Student :  $p > 0.05$  pour les 2 paramètres) (**Tableau 1**). Ce résultat suggère que l'exposition précoce à une hypoxie modérée n'a pas modifié significativement le registre métabolique des poissons sur le long-terme et qu'ils présentent donc une quantité d'énergie mobilisable similaire pour répondre à leurs besoins métaboliques dans les deux groupes. Pourtant, le taux métabolique lié à la digestion (magnitude de la SDA) apparaît significativement plus faible (7.7%) dans le groupe ELHT ( $C = 9.35$  kJ, ELHT = 8.63 kJ ; Test-t de Student :  $p < 0.05$ ) (**Tableau 1**). Sachant que cet investissement énergétique dans la digestion a été évalué à quantité d'ingéré égale, cet impact sur la SDA révèle que les juvéniles ayant été exposés à une hypoxie au stade larvaire allouent moins d'énergie aux processus digestifs. Ces effets à long-terme se différencient de la réponse physiologique mesurée chez des poissons en situation d'hypoxie. Il est en effet admis que des poissons en hypoxie présentent une diminution de la hauteur du pic de consommation d'oxygène pendant la période postprandiale sans que leurs taux énergétiques associés à la digestion soient affectés en raison de l'augmentation de la durée de digestion (Eliason and Farrell, 2014; Jordan and Steffensen, 2007). Dans notre étude, l'allongement significatif (5h, Test-t de Student :  $p < 0.04$ ) de la durée de digestion chez les juvéniles issus du groupe exposé à une hypoxie modérée au stade larvaire n'a pas permis de compenser la plus faible amplitude d'énergie allouée à la digestion pendant la période postprandiale.

Puisque la SDA correspond à l'énergie mobilisée par l'ingestion, l'assimilation et la transformation des nutriments, et que les différences de SDA ont été obtenues à ingestion égale, nous avons cherché à savoir si l'exposition précoce à une hypoxie modérée avait impacté les processus d'assimilation.

### ***Etude de l'assimilation de la nourriture***

Nos résultats indiquent que les fèces du groupe ELHT contiennent 3.6% d'énergie en plus que les fèces produites par les individus du groupe C ( $C = 19.4 \pm 0.38$  kJ.g<sup>-1</sup>, ELHT =  $20.1 \pm 0.35$  kJ.g<sup>-1</sup> ; Tests-t de Student :  $p < 0.04$ ). Ces données traduisent une moins bonne assimilation, à ingestion égale, chez les poissons du groupe ELHT.

**Tableau 1 : Mesures des paramètres métaboliques par respirométrie** (SMR = Standard Metabolic Rate ; AMR = Active Metabolic Rate ; SDA = Specific Dynamic Action). Les résultats sont respectivement exprimés en  $\text{mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \pm \text{s.e.m.}$  (Standard Error of Mean, Erreur Standard à la Moyenne), en kilojoules (kJ) et en  $\text{h} \pm \text{s.e.m.}$ . Au sein d'une même ligne, les moyennes avec la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (Test-t de Student,  $p\text{-value} > 0.05$ ). C = groupe Contrôle ( $n=24$ ) ; ELHT = Exposé à l'Hypoxie au Stade Larvaire ( $n=23$ ).

	C	ELHT	(ELHT-C)/C (%)
SMR ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	$93.8 \pm 4.4^a$	$89.5 \pm 4.0^a$	- 4.6
AMR ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	$530.2 \pm 21.4^a$	$549.9 \pm 28.8^a$	+ 3.7
SDA ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	<b><math>209.2 \pm 9.8^a</math></b>	<b><math>193.0 \pm 5.3^b</math></b>	<b>- 7.7</b>
SDA (kJ)	<b><math>9.35^a</math></b>	<b><math>8.63^b</math></b>	<b>- 7.7</b>
Durée SDA (h)	<b><math>35.8 \pm 1.58^a</math></b>	<b><math>40.8 \pm 1.8^b</math></b>	/

**Tableau 2 : Activités spécifiques des enzymes intestinales.** Les résultats sont exprimés en  $\text{mU} \cdot \text{mg}$  de protéines<sup>-1</sup>  $\pm \text{s.d.}$  (Standard Deviation). Au sein d'une même ligne, les moyennes avec la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur,  $p\text{-value} > 0.05$ ). C = groupe Contrôle ( $n=24$ ) ; ELHT = Exposé à l'Hypoxie au Stade Larvaire ( $n=23$ ) ; AP = Phosphatase Alcaline ; N-LAP = Aminopeptidase-N ; Leu-Ala = Leucine-Alanine peptidase.

	C	ELHT	(ELHT-C)/C (%)
AP	<b><math>4599.2 \pm 908.8^a</math></b>	<b><math>3860.6 \pm 1049.4^b</math></b>	<b>- 16.1</b>
N-LAP	<b><math>2363.2 \pm 251.9^a</math></b>	<b><math>2067.5 \pm 227.8^b</math></b>	<b>- 12.5</b>
Leu-Ala	<b><math>1936.7 \pm 340.0^a</math></b>	<b><math>1449.5 \pm 284.2^b</math></b>	<b>- 25.2</b>
Sucrase	$223.7 \pm 52.9^a$	$233.5 \pm 58.2^a$	+ 4.4

L'assimilation se produisant essentiellement au niveau de l'intestin, nous avons cherché à savoir si la différence observée pouvait être expliquée, au moins en partie, par une capacité digestive plus faible (réduction de la surface d'absorption ou des activités des enzymes digestives).

### *Etude des activités spécifiques des enzymes digestives*

La capacité digestive peut être évaluée au travers de l'étude de certaines fonctions intestinales, et notamment des activités spécifiques de plusieurs enzymes digestives impliquées dans différents processus d'hydrolyse et d'absorption. Parmi ces enzymes, l'activité de l'Alcaline Phosphatase (AP) localisée au niveau des bordures en brosse des entérocytes (Geddes and Philpott, 2008) est un bon indicateur de l'intégrité fonctionnelle de l'intestin. Les activités de l'Amino-peptidase-N et de la Leucine-Alanine peptidase informent sur la capacité d'hydrolyse des protéines, et la Sucrase est impliquée dans la digestion des glucides.

Les lipides sont dégradés par une lipase sécrétée au niveau du pancréas qui est un organe diffus difficile à isoler. Par conséquent, seules les enzymes impliquées dans la digestion des protéines et des glucides ont été analysées dans cette étude, les prélèvements ayant été effectués sur la partie intestinale des animaux. Même si des enzymes impliquées dans la digestion des lipides existent au niveau des intestins, leur analyse n'a pas été possible, les outils nécessaires aux dosages n'étant pas disponibles au laboratoire.

Nos analyses révèlent que les activités enzymatiques de la Phosphatase Alcaline, de l'Amino-peptidase-N et de la Leucine-Alanine peptidase sont significativement impactées par le conditionnement hypoxique précoce (ANOVA à un facteur :  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  et  $p < 0.001$ , respectivement) (**Tableau 2**), avec une activité de l'AP plus faible de 16.1%, une activité de la N-LAP plus faible de 12.5% et une activité de la Leu-Ala plus faible de 25.2% chez les individus du groupe ELHT. La diminution d'activité de l'AP dans le groupe ELHT suggère une atteinte de l'intégrité morphologique et fonctionnelle des entérocytes. L'impact au niveau morphologique pourrait éventuellement être confirmé par un examen histologique ultérieur de coupes intestinales.

L'étude des activités enzymatiques de la N-LAP et de la Leu-Ala nous indique que la capacité digestive des individus issus du groupe ELHT est inférieure à celle des individus issus du groupe C. Ces deux enzymes protéolytiques hydrolysent les liaisons peptidiques des

protéines de façon complémentaire. Ainsi, la N-LAP, localisée dans la membrane des bordures en brosse, hydrolyse les chaînes peptides du côté N-terminal des protéines et produit des peptides courts qui vont être transportés dans le cytosol des entérocytes où la Leu-Ala va terminer l'hydrolyse de ces peptides courts (Cahu et al., 1998; Zambonino-Infante and Cahu, 2001). La diminution des activités de ces deux enzymes dans le groupe ELHT suggère un impact du conditionnement hypoxique sur la capacité des individus à digérer et par conséquent à assimiler les protéines qui représentent la principale source d'énergie pour ces animaux.

A l'inverse, l'activité de la sucrase, disaccharidase membranaire jouant un rôle important dans la digestion des glucides, n'est pas affectée par le conditionnement hypoxique précoce (ANOVA à un facteur :  $p > 0.3$ ) (**Tableau 2**).

En conclusion, le conditionnement hypoxique précoce aurait donc diminué la capacité des individus à digérer et assimiler les protéines, principale source d'énergie chez les poissons, entraînant une perte énergétique au travers des fèces plus importante et une diminution du métabolisme digestif. Cette diminution de la capacité digestive a probablement contribué à la diminution de la croissance observée chez les individus exposés à l'hypoxie au stade larvaire.

---

*Chapitre III : Les effets d'une  
exposition précoce à une hypoxie  
modérée chronique sur la sole (Solea  
solea)*

---



Ce troisième chapitre, porte sur l'étude des effets à long-terme du même type d'exposition précoce chez une espèce plus tolérante à l'hypoxie que le bar Européen, à savoir la sole commune (*Solea solea*). L'objectif de cette étude, au-delà de la connaissance des impacts à long-terme d'une contrainte hypoxique précoce chez cette espèce benthique, était d'évaluer la variabilité inter-espèce dans la réponse physiologique. Dans cette optique, le protocole expérimental suivi (modalité de l'exposition à l'hypoxie) et les paramètres physiologiques analysés (performances physiologiques, caractéristiques métaboliques) étaient, autant faire se peut, les mêmes que ceux mis en œuvre pour le bar Européen. Le suivi de la prise alimentaire et l'analyse de l'assimilation énergétique n'ont cependant pas pu être réalisés en raison des contraintes liées au modèle. En effet, la sole commune présentant une alimentation principalement nocturne et variable d'un jour à l'autre ([Mas-Munoz et al., 2011](#)), la mesure de la quantité d'aliment ingéré reste difficilement réalisable. Cette quantification peut être réalisée en utilisant un aliment incorporant du plomb, distribué sur une période relativement longue, et un procédé de radiographie ([Lund et al., 2013](#)), mais la mise en place de ce type de mesure reste onéreuse et difficile. De même, le faible volume stomacal de cette espèce engendrant des processus digestifs rapides ([Couturier, 2007](#)), la détermination de l'assimilation énergétique chez nos individus n'a pas été possible.



**Article en cours de rédaction - Conditionnement hypoxique au stade larvaire chez la sole : des effets potentiels sur le long-terme**

Vanderplancke Gwenaëlle <sup>1\*</sup>, Claireaux Guy <sup>2</sup>, Quazuguel Patrick <sup>1</sup>, Huelvan Christine <sup>1</sup>,  
Isabelle Percelay <sup>1</sup>, Zambonino-Infante José-Luis <sup>1</sup>, et Mazurais David <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> UBO, LEMAR UMR 6539 CNRS-UBO-IRD-Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France.

**Mots-clés:** Hypoxie, Effets à long-terme, Larves de poissons marins, Sole commune, Performances physiologiques et métaboliques



## ***Résumé***

Les zones estuariennes et côtières représentent des zones de nourriceries pour de nombreuses espèces de poissons plats tout juste métamorphosés tels que la sole commune (*Solea solea*). Or, ces aires subissent des épisodes hypoxiques de plus en plus fréquents et marqués. Même si les espèces de poissons présentent, aux stades juvénile et adulte, une relative tolérance à l'hypoxie, les effets à long-terme d'une exposition précoce à un environnement appauvri en oxygène, sont peu connus. La présente étude a donc eu pour objectif d'analyser les effets occasionnés par une exposition précoce à l'hypoxie sur les performances physiologiques et métaboliques de juvéniles de sole commune. Des larves de soles âgées de 32 jours post-éclosion ont été soumises à une hypoxie chronique modérée (40% de saturation à l'air) pendant 8 jours. En parallèle, des larves de soles ont été élevées en condition normale d'oxygène pour constituer un lot témoin. A l'issue de la phase larvaire, aucun impact de l'exposition à l'hypoxie en termes de survie, de taux de croissance et de développement larvaire (analyse des activités spécifiques des enzymes digestives) n'a pu être détecté. Cependant, la contrainte hypoxique a été ressentie physiologiquement par les larves comme en témoigne la modulation de l'expression des gènes (Pyruvate Kinase *pk* et Lactate Dehydrogenase *ldh-a*) impliqués dans le métabolisme anaérobique. A la suite de la phase larvaire, les juvéniles ont été placés en conditions normales d'oxygénation pendant 384 jours. A l'issue de cette période, les juvéniles de soles ayant été exposés à l'hypoxie au stade larvaire présentent des meilleurs taux de croissance ainsi que des meilleures tolérances à l'hypoxie et à la thermie. Par ailleurs, l'analyse des paramètres métaboliques révèle que l'exposition précoce à l'hypoxie induit une diminution du registre métabolique sur le long-terme résultant d'une baisse du taux métabolique actif. L'ensemble des données obtenues au cours de cette étude indique un effet à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur les performances physiologiques et métaboliques de la sole commune. Nos résultats suggèrent que ces effets mettent en jeu des compromis physiologiques dans l'allocation énergétique de l'animal.

## ***Introduction***

Une étude récente a permis de mettre en évidence chez le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) des effets à long-terme d'une hypoxie modérée appliquée au stade larvaire sur différents paramètres physiologiques des juvéniles (baisse des taux de croissance, diminution de la glycémie, régulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme)

(Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans *Marine Biology*). Ces effets à long-terme constituent les prémices à la compréhension des effets d'un conditionnement hypoxique précoce chez le bar Européen qui est une espèce de poisson marin relativement sensible à l'hypoxie (Pichavant et al., 2003; Terova et al., 2009). Toutefois, ces effets à long-terme ne sont probablement pas généralisables à toutes les espèces de poissons puisqu'il est admis que les sensibilités vis-à-vis de contraintes hypoxiques sont espèces-spécifiques (Richards, 2011). Ces sensibilités différentes vis-à-vis de l'hypoxie ont jusqu'à présent été montrées à travers les études de réponses physiologiques à court-terme que ce soit aux stades juvénile ou adulte. Ainsi, certaines espèces comme le turbot (*Scophthalmus maximus*) et le bar Européen, présentent une diminution de croissance en situation d'hypoxie du fait de la diminution de leur prise alimentaire (Pichavant et al., 2003; Pichavant et al., 2001; Pichavant et al., 2000), alors que d'autres espèces, comme le qingbo (*Spinibarbus sinensis*), présentent une augmentation de croissance liée à une augmentation d'ingéré (Dan et al., 2014). Cette sensibilité espèce-spécifique n'a jusqu'à présent pas été abordée dans le cas d'étude d'effets à long-terme suite à un conditionnement précoce.

L'objectif de la présente étude est donc d'analyser les effets occasionnés à long-terme par une exposition à une hypoxie modérée (40% de saturation à l'air) en fin de développement larvaire (entre 32 et 40 jours post-éclosion – d.p.h., Days Post-Hatching) chez une espèce marine considérée comme plus tolérante à l'hypoxie que le bar Européen, à savoir la sole commune (*Solea solea*) (Cannas et al., 2007; Dalla Via et al., 1997; Le Pape et al., 2003). Cette espèce, de par sa présence dans les zones côtières et estuariennes à la fin de la phase larvaire, est susceptible d'être soumise à des épisodes hypoxiques dès son plus jeune âge (Breitburg, 1992; Cabral et al., 2003; Diaz and Rosenberg, 1995; Pihl et al., 1992; Vasconcelos et al., 2008). Les expressions des gènes de la Pyruvate Kinase (pk) et de la Lactate Dehydrogenase (ldh-a), connus pour être régulés en situation d'hypoxie (Almeida-Val et al., 2011; Dehne et al., 2007; Firth et al., 1995; Le Moullac et al., 2007; Marti et al., 1994), ont été suivies durant l'exposition des larves à l'hypoxie afin de déterminer si ces dernières ressentent la contrainte environnementale. Les effets à long-terme ont été abordés à travers l'évaluation de performances physiologiques (croissance, tolérances aux test aigus d'hypoxie et de thermie) et métaboliques [taux métabolique basal (SMR, Standard Metabolic Rate) et taux métabolique actif (AMR, Active Metabolic Rate)] chez des juvéniles d'environ 1 an.

### ***Matériel et méthodes***

Toutes les manipulations d'animaux ont été réalisées en respectant la Charte de Soins et d'utilisation des Animaux de Laboratoire (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

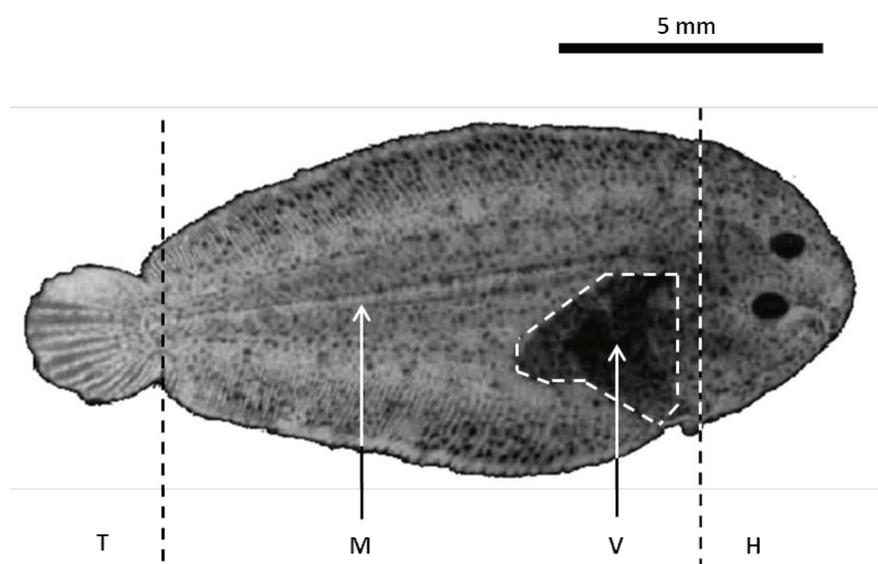
#### ***Phase 1 : L'élevage larvaire et les traitements appliqués***

Des œufs de sole commune (*Solea solea*) ont été achetés auprès d'une écloserie commerciale (IMARES-Solea BV, Ijmuiden, Hollande) avant d'être placés en incubation à l'obscurité totale, à une température de  $14^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  et à  $35 \pm 0.2$  ‰ de salinité suivant les recommandations de [Devauchelle et al. \(1987\)](#). Après leur éclosion, les larves de sole ont été dénombrées et réparties dans 8 bassins où elles ont été élevées sous des conditions normales d'oxygène, à une température de  $19.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  et à  $35 \pm 0.2$  ‰ de salinité, et nourries avec de l'Artémia pendant toute la phase larvaire (jusqu'à 45 d.p.h.) en accord avec les recherches de [Howell \(1997\)](#). Deux groupes de 4 bassins ont été constitués. Le premier groupe de bassin, également appelé groupe de Contrôle (groupe C), a été maintenu sous des conditions d'oxygénation normales ( $96.6 \pm 1.3\%$  de saturation à l'air,  $7.28 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant que le second groupe, ou groupe conditionné à l'hypoxie au stade larvaire (groupe ELHT, Early Life Hypoxia Treatment), a été soumis à une hypoxie modérée ( $40.1 \pm 2.6$  % de saturation à l'air,  $3.02 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant 8 jours (de 32 à 40 d.p.h.). Les conditions hypoxiques appliquées ont préalablement été testées et établies comme n'induisant pas de mortalité. A la fin de l'exposition à l'hypoxie, c'est-à-dire à 40 d.p.h., les larves ont été remises dans des conditions d'oxygénation normales jusqu'à 45 d.p.h. (fin de la phase 1). Le nombre de larves initialement présentes dans chaque bassin étant connu, le taux de survie a alors été évalué pour chaque groupe expérimental à la fin du développement larvaire (i.e. 45 d.p.h.) en comptant le nombre de larves restantes dans chaque groupe et en prenant en compte le nombre de larves prélevées pendant les échantillonnages.

#### **Echantillonnages**

Au cours du conditionnement hypoxique, la croissance a été évaluée en pesant individuellement 4\*15 larves (c'est-à-dire 15 larves par bassin, soit 60 larves par groupe), euthanasiées par excès d'anesthésiant, pour chaque groupe (C et ELHT) à 32, 34 et 40 d.p.h. A 40 d.p.h. (avant le retour en conditions d'oxygénation normales), 12 pools (3 pools par bassin) de 15 larves ont été prélevés au sein de chaque groupe (C et ELHT), euthanasiés par excès d'anesthésiant et préparés pour des extractions d'ARN. Les larves prélevées ont été

placées sur une plaque en verre maintenue à 0°C et disséquées sous microscope en quatre parties : la tête « H » (Head) et la queue « T » (Tail) qui ont été éliminées et les viscères « V » et le Muscle « M » qui ont été regroupés séparément (12 pools de viscères et 12 pools de muscle par groupe), pesés et conservés dans de l'Extract-All froid (Eurobio ; Courtaboeuf, Essone, France) avant d'être stockés à -80°C pour les analyses moléculaires (**Fig. 1**). En parallèle, 4\*80 larves (80 larves par bassin) ont été prélevées dans chaque groupe et euthanasiées par excès d'anesthésiant. Les larves prélevées ont été placées sur une plaque en verre maintenue à 0°C et disséquées sous microscope en quatre parties : la tête « H » (Head), le Muscle « M » et la queue « T » (Tail) qui ont été éliminées et les viscères « V » ont été stockés à -20°C pour analyser ultérieurement les activités spécifiques des enzymes digestives (**Fig.1**).



**Figure 1** : Dissections réalisées sur les larves de sole à chaque temps de prélèvement. Les larves ont été disséquées en 4 parties : la tête (H, Head), les Viscères (V), le Muscle (M) et la queue (T, Tail). Les segments H et T ont été systématiquement enlevés. Les viscères et le muscle ont été conservés séparément en vue d'analyses ultérieures.

### Analyses des expressions de gènes

#### ➤ Préparation des ARN totaux

Les échantillons (50 à 100 mg), préalablement placés dans 1 mL d'ExtractAll (Eurobio ; Courtaboeuf, Essone, France), ont été homogénéisés avec un broyeur « Pro polytron® » (BioBlock Scientific ; Illkirch, Bas-Rhin, France) pendant 30 s. L'ARN total a été extrait en suivant les instructions du fournisseur. Les contaminations potentielles d'ADN ont été éliminées en utilisant le kit « RTS DNase™ » (MoBio Laboratories Inc. ; Carlsbad, CA,

USA) en suivant les recommandations du fabricant. La quantité et la pureté des ARN ont été mesurées avec un spectrophotomètre ND-1000 NanoDrop® (Thermo Scientific Inc. ; Waltham, MA, USA). L'intégrité des ARN extraits a été déterminée par électrophorèse avec un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc. ; Santa Clara, CA, USA). Les échantillons d'ARN ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

➤ *Synthèse des ADNc*

Après son extraction, l'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit « iScript™ cDNA Synthesis » (BioRad Laboratories Inc. ; Hercules, CA, USA) en suivant les instructions du fournisseur. Succinctement, 1 µg d'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc dans un volume de 20 µL composé de 15 µL d'échantillon, 4 µL de « 5x iScript™ Reaction Mix » contenant des oligo(dT), des primers aléatoires et un inhibiteur RNaseA, et 1µL de « iScript™ Reverse transcriptase ». La transcription inverse (RT, rétro-transcription) a été réalisée en utilisant un Thermo-cycler TC-152 (Techne Barloworld Scientific ; Stone, Staffordshire, UK). Les ADNc obtenues ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Des contrôles négatifs de RT (sans reverse transcriptase) ont été effectués pour chaque échantillon.

➤ *PCR en temps réel (qPCR)*

Avant l'analyse, l'efficacité des PCR a été estimée pour chaque paire d'amorces en effectuant une série de dilution (de 1/5 à 1/320) d'un pool d'ADNc. L'efficacité de la réaction (E) a été déterminée en utilisant la pente des droites obtenue avec la gamme de dilution, calculée selon la formule 2 :  $E = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}}$ . Avec cette analyse, nous nous assurons que l'efficacité des PCR se situe entre 95% et 105% pour chaque couple d'amorce. Les amorces ont été dessinées à partir des séquences d'ADNc aimablement fournies par l'équipe du Département de Biomédecine comparative et de Sciences alimentaire de l'Université de Padova en Italie en utilisant le logiciel « Primer3 v.0.04. » (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Pour chaque échantillon, les qPCR ont été réalisées en triplicat en utilisant le « iQ™ SYBR® Green Supermix » (BioRad Laboratories Inc. ; Hercules, CA, USA) en suivant les recommandations du fabricant. En résumé, les amplifications par qPCR ont été réalisées sur un volume final de 15 µL contenant 5 µL d'ADNc (dilution 1/20) et 10 µL de mélange réactionnel, composés de 7.5 µL de « iQ™ SYBR® Green Supermix », 1.5 µL d'eau sans RNase/DNase et 0.5 µL de chaque amorce (10mM). Les qPCR étaient initiées par une phase d'activation de la iTaq DNA polymérase à démarrage à chaud à 95°C pendant 3 min. Ensuite,

45 cycles d'amplification, consistant en 30s à 95°C suivi de 1 min à 60°C, ont été réalisés pour chaque paire d'amorces en utilisant un « iCycler MyiQ™ Single Coor Real-Time PCR Detection System » (BioRad Laboratories Inc. ; Hercules, CA, USA). Dans le but d'évaluer la qualité de l'amplification, des analyses de courbes de fusion ont été menées à la fin des protocoles de PCR. Des contrôles négatifs de RT ont été utilisés afin de s'assurer de l'absence de contamination par de l'ADN génomique résiduel.

### ➤ *Quantification relative*

Pour chaque échantillon, la valeur du seuil de cycles (Ct, Cycle threshold) correspondant a été déterminée automatiquement à l'aide du logiciel Bio-Rad iQ5. La quantité relative de messagers a été corrigée et déterminée avec le logiciel Bio-Rad iQ5 en utilisant la méthode du  $\Delta\Delta Ct$ . Le gène Elongation Factor 1 ( $ef1\alpha$ ) a été choisi comme gène de référence étant donné que ses niveaux d'ARNm ne montraient pas de variation significative entre les échantillons (déviations standard relatives < 5%) ou entre les deux groupes expérimentaux (ANOVA à un facteur :  $p_{\text{Muscle}} > 0.1$ ,  $p_{\text{Viscères}} > 0.1$ ).

### *Analyses des activités enzymatiques*

Les segments pancréatiques et intestinaux ont été disséqués sur la partie viscérale, sous microscope et sur une plaque de verre maintenue à 0°C.

Le développement larvaire a été évalué comme décrit par Cahu and Zambonino-Infante (1995). Les protocoles pour l'homogénéisation des segments pancréatiques et intestinaux, pour la purification des bordures en brosse, pour les dosages des protéines et des activités enzymatiques de l'Amylase, la Trypsine, l'Alcaline Phosphatase (AP) et Aminopeptidase-N (N-LAP) sont décrits dans les travaux de Zambonino-Infante et al. (1997). Les activités enzymatiques ont été exprimées comme des activités spécifiques, c'est-à-dire en unité par mg de protéines.

## *Phase 2 : L'élevage des juvéniles et les analyses effectuées*

### *Phase intermédiaire de croissance*

A l'issue de la phase 1, i.e. à 45 d.p.h., les répliquats de bassin ont été rassemblés dans des bassins de 1 m<sup>3</sup> (1 par groupe). Les poissons ont ensuite été sevrés avec l'aliment commercial « Gemma » (Skretting ; Fontaine les Vervins, Aisne, France). A la fin du sevrage les juvéniles ont été nourris avec l'aliment commercial « NeoSupra » (Coopérative Le Gouessant ; Lamballe, Côtes d'Armor, France), composé de 58% de protéines et de 13% de lipides, jusqu'à atteindre la taille suffisante pour passer sur l'aliment commercial

« NeoRepro » (Coopérative Le Gouessant ; Lamballe, Côtes d'Armor, France), composé de 50% de protéines et de 11% de lipides. Les poissons ont ainsi été maintenus dans des conditions optimales (normoxie, température à  $19.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ , absence de perturbations extérieures) pendant 12 mois (jusqu'à 424 d.p.h.).

A la fin de cette phase intermédiaire de croissance (à 424 d.p.h.), les poissons de chaque groupe ont été séparés en 2 lots distincts afin d'étudier les performances des individus. Le premier lot a été utilisé afin de réaliser un suivi de croissance des animaux alors que le second lot a été utilisé pour exécuter des approches analytiques. Ces lots de poissons ont été constitués en respectant la distribution de masse de la population originelle et en prenant soin de conserver des groupes homogènes en masse entre les groupes et entre les lots (**Tableau 1**). Les poissons de chaque lot ont alors été identifiés par une injection en sous-cutanée d'un transpondeur passif intégré (PIT-tag, Passive Integrated Transponder) avant d'être rassemblés dans un même bassin de  $2 \text{ m}^3$  (1 bassin par lot). Les poissons ont été nourris avec l'aliment commercial « NeoRepro » (Coopérative Le Gouessant ; Lamballe, Côtes d'Armor, France), composé de 50% de protéines et de 11% de lipides, et maintenus à température ambiante. Des analyses physiologiques et biochimiques ont ensuite été réalisées de 648 à 787 d.p.h. Au cours de l'ensemble des expérimentations menées, nous nous sommes assurés que les deux lots constitués évoluaient de la même manière en terme de croissance.

**Tableau 1 : Masse moyenne pour chaque groupe au sein des deux lots de poissons constitués pour les expérimentations au stade juvénile.** Les résultats sont exprimés en grammes (g)  $\pm$  s.d. (Standard Deviation, Déviation Standard). Au sein d'une même colonne et d'une même ligne, les moyennes avec la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (p-value > 0.05). C = groupe Contrôle ; ELHT = Traité à l'Hypoxie au Stade Larvaire.

	Premier lot		Deuxième lot	
	Nombre d'individus	Masse moyenne	Nombre d'individus	Masse moyenne
C	150	$30.2 \pm 11.2^a$	150	$30.0 \pm 12.3^a$
ELHT	150	$30.7 \pm 11.9^a$	150	$30.6 \pm 11.2^a$

### Suivi de croissance

Dans le premier lot, les poissons de chaque groupe (n = 150 par groupe) ont été pesés à 424, 648, 690, 718 et 753 d.p.h. après une anesthésie légère à l'aide de 200 ppm de phénoxyéthanol.

*Challenge hypoxique (HCT, Hypoxic Challenge Test)*

Dans le second lot, les 290 juvéniles (145 dans chaque groupe suite à des mortalités intervenues depuis 424 d.p.h.) âgés de 649 d.p.h. sont restés à l'abri de perturbations extérieures et à jeun pendant 48 h. L'oxygénation de l'eau a alors été diminuée de 100% à 10% en 1h20 puis la diminution a été ralentie à raison de  $- 1.4\%.hr^{-1}$  jusque 2.5%. Le niveau d'oxygénation de l'eau était contrôlé par un oxymètre (ODEON Classic OPTOD® Oxygen Meter ; Neotek-Ponsel ; Caudan, Morbihan, France) et régulé par un système d'injection de bulles d'azote au travers une pompe submersible placée dans le bassin expérimental 48 h avant le HCT. Au moment où les poissons perdaient leur équilibre, ils étaient retirés du bassin expérimental, identifiés (lecture du PIT-tag) et rapidement placés dans un bassin de récupération aux conditions d'oxygénation maximale. Le temps et le niveau d'oxygénation correspondants à la perte d'équilibre du poisson étaient enregistrés. Le challenge a pris fin quand le dernier poisson a été transféré dans le bassin de récupération. Ce challenge a permis d'établir la performance des individus de chaque groupe face un épisode hypoxique en mesurant leur temps de résistance.

*Challenge thermique (TCT, Thermic Challenge Test)*

Dans le second lot, les 236 juvéniles (133 dans chaque groupe suite à des mortalités intervenues depuis le HCT à 649 d.p.h.) âgés de 656 d.p.h. sont restés à l'abri de perturbations extérieures et à jeun pendant 48 h. La température de l'eau a alors été augmentée de 15°C (température ambiante au moment du TCT) à 25°C en 2h puis l'augmentation a été ralentie à raison de  $+ 1.2^{\circ}C.hr^{-1}$  jusque 31°C. La température de l'eau était contrôlée avec un capteur OPTOD® (ODEON Classic OPTOD® Oxygen Meter ; Neotek-Ponsel ; Caudan, Morbihan, France Neotek-Ponsel ; Caudan, Morbihan, France) et régulée par un système de pompes submersibles thermo-réglables placées dans le bassin expérimental 48 h avant le TCT. Au moment où les poissons perdaient leur équilibre, ils étaient retirés du bassin expérimental, identifiés (lecture du PIT-tag) et rapidement placés dans un bassin de récupération aux conditions d'oxygénation normales et à la température de 15°C. Le temps et la température correspondants à la perte d'équilibre du poisson étaient enregistrés. Le challenge a pris fin quand le dernier poisson a été transféré dans le bassin de récupération. Ce challenge a permis d'établir la performance des individus de chaque groupe face une augmentation de la température en mesurant leur temps de résistance.

Mesures des taux métaboliques et détermination du registre métabolique aérobie

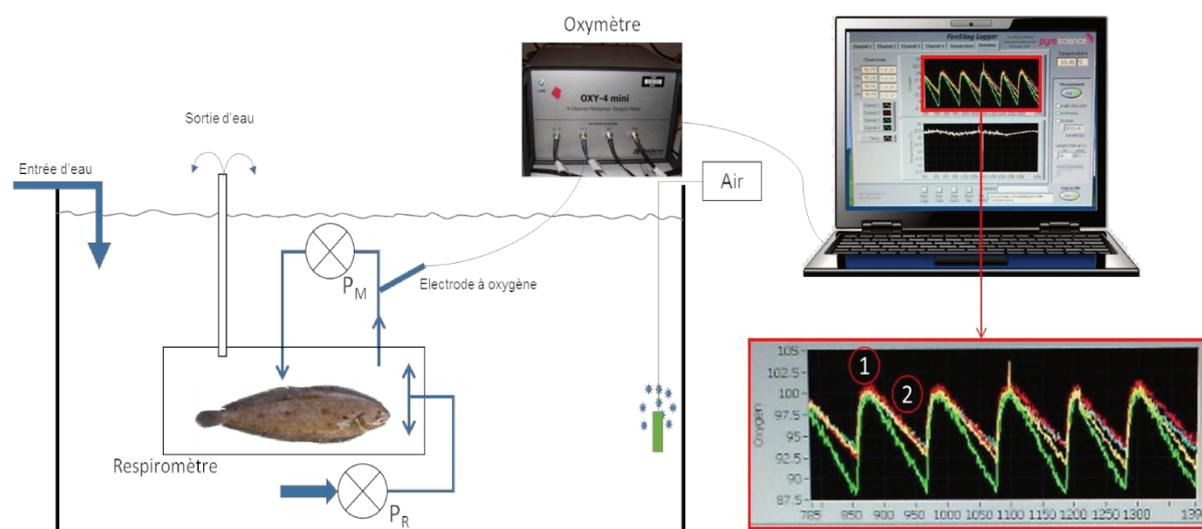
De 732 à 769 d.p.h., au sein du second lot, 21 juvéniles du groupe C et 19 juvéniles du groupe ELHT ont été placés en respirométrie statique afin de déterminer leur registre métabolique aérobie. Les individus ont été sélectionnés de manière à ce que les masses moyennes ( $\pm$  s.d.) soient identiques entre les deux groupes, i.e. C =  $62.0 \pm 12.3$  g et EHLT =  $58.5 \pm 11.8$  g (ANOVA à 1 facteur :  $p > 0.3$ ) afin de ne pas attribuer les différences potentiellement observées aux différences de masses. Les mesures du taux métabolique actif (AMR, Active Metabolic Rate) et du taux métabolique basal (SMR, Standard Metabolic Rate) ont été effectuées à l'aide de respiromètres d'une contenance de 2L. Ces respiromètres étaient alimentés pendant 5 min toutes les 15 min avec de l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-régulée à 15°C. La teneur en oxygène du respiromètre était mesurée en continu via une électrode reliée à un oxymètre elle-même reliée à un système d'enregistrement des données. Les mesures des consommations en oxygène ( $MO_2$ ) ont été effectuées pendant les phases de 15 min au cours desquelles l'eau n'était pas renouvelée (**Fig. 2**). Dans un premier temps, l'AMR a été mesurée pendant 2 h en introduisant un individu dans le respiromètre immédiatement après un épisode de nage forcée jusqu'à épuisement, i.e. absence de réactions de l'animal à un stimulus. L'animal était alors laissé dans le respiromètre pendant 3 jours afin qu'il récupère, qu'il soit à jeun et qu'il se place en situation de repos afin de permettre la mesure du SMR. Chaque individu était pesé en entrée et en sortie du respiromètre. Des mesures de  $MO_2$  sur le respiromètre vide ont été effectuées afin d'estimer la consommation en oxygène d'origine bactérienne en vue d'appliquer d'éventuelles corrections.

Les consommations en oxygène pour l'AMR et le SMR des soles, exprimée en  $mgO_2 \cdot h^{-1}$ , ont été calculées suivant la formule 1 :

$$MO_2 = \Delta[O_2] \times [O_2] \times (Vol_R - Vol_I)$$

où :  $\Delta[O_2]$  = variation de la teneur en oxygène de l'eau contenue dans le respiromètre au cours de la phase de mesure,  $[O_2]$  = concentration en oxygène de l'eau à saturation à 15°C et à une salinité de 32‰ (soit  $8.27 mgO_2 \cdot L^{-1}$ ),  $Vol_R$  = volume d'eau contenu dans le respiromètre (en L) et  $Vol_I$  = volume de l'animal dans le respiromètre avec une densité égale à 1 (en L).

Le registre métabolique aérobie (AMS, Aerobic Metabolic Scope) des individus a alors été déterminé en calculant la différence entre l'AMR et le SMR.



**Figure 2 : Schéma du dispositif de respirométrie statique.** Les respiromètres de 2L étaient placés dans un bac de 100L où l'eau de mer, bio-filtrée et aérée, thermo-régulée à 15°C circulait. La pompe  $P_R$  assurait le renouvellement de l'eau à l'intérieur du respiromètre pendant que la pompe  $P_M$  assurait la circulation de l'eau à l'intérieur du respiromètre afin de permettre la mesure de l'oxygène. Le niveau d'oxygène contenu dans le respiromètre était mesuré via une électrode à oxygène reliée à un oxymètre. Les mesures s'effectuaient pendant les phases de 15 min ② suivant les périodes de renouvellement de l'eau du respiromètre de 5 min ①. Le poisson était placé dans le respiromètre immédiatement après un épisode de nage forcée (activité soutenue) puis l'AMR était mesurée pendant 2h. L'animal était alors laissé dans le respiromètre pendant 3 jours afin qu'il récupère, qu'il soit à jeun et qu'il se place en situation de repos afin de permettre la mesure du SMR.

### *Les analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2013). Pour chaque analyse, les variables analysées ont toutes été préalablement testées pour vérifier si elles remplissaient les conditions d'application des tests paramétriques, à savoir la Normalité (test de Shapiro) et l'Homoscédasticité (test de Levene). Ensuite, les tests appropriés ont été appliqués aux données. Les différences sont considérées comme significatives au niveau de confiance de 95% ( $p$ -value < 0.05).

### *Tests sur les données du stade larvaire*

Pour étudier l'effet de l'exposition à l'hypoxie sur la survie des larves, une régression a été utilisée. Une régression linéaire a été appliquée sur les données de croissance larvaire afin

de déterminer l'impact du traitement hypoxique. Une ANOVA à un facteur a ensuite été utilisée afin de déterminer les effets du conditionnement hypoxique sur les activités des enzymes digestives et sur les expressions de gènes.

### Tests sur les paramètres étudiés à long-terme

Afin de vérifier la constitution de lots similaires en masse, un test t de Student a été appliqué sur les données de masse à 424 d.p.h. Une régression linéaire a ensuite été appliquée sur les données de croissance afin de déterminer les effets du conditionnement hypoxique précoce. Un modèle de Mantel-Cox (également appelé test de logRank) a été utilisé pour les analyses des challenges hypoxique et thermique afin de déterminer l'impact du traitement hypoxique précoce. Enfin, les données relatives au registre métabolique ont été analysées en trois temps. Tout d'abord, une ANOVA a été utilisée afin de déterminer l'existence d'une relation entre la masse des individus et leurs taux métaboliques standard et actif. Ensuite, une ANCOVA a été appliquée sur les données de taux métaboliques afin de déterminer l'effet du conditionnement hypoxique (facteur principal) en fonction de la masse (co-facteur) sur chacun d'entre eux. Finalement, une régression linéaire a été utilisée pour déterminer si les différences de taux métaboliques observées étaient dues à une relation avec la masse modifiée.

## **Résultats**

### *Effets de l'exposition à l'hypoxie pendant le stade larvaire*

Les analyses réalisées à 32 d.p.h. (i.e. avant l'exposition à l'hypoxie) sur les différents paramètres d'intérêt (croissance, paramètres biochimiques et moléculaires) n'indiquent pas de différences significatives entre les futurs groupes C et ELHT (résultats non montrés).

### Evaluation de la croissance, de la survie et de la maturation des larves

Ni la croissance (C = + 78.96 ± 25.60 mg ; ELHT = + 82.35 ± 19.88 mg) ni la survie (C = 45.3 ± 13.5 % ; ELHT = 52.0 ± 17.1 %), évaluées en fin de développement larvaire (i.e. à 45 d.p.h.), n'ont été significativement affectées par l'exposition à l'hypoxie (Régressions :  $p_{\text{Survie}} > 0.6$  ;  $p_{\text{Croissance}} > 0.7$ ).

Les activités des enzymes digestives, qui renseignent sur la maturation des fonctions digestives, ont été analysées pour les deux groupes C et ELHT à 40 d.p.h. (192 h après le début de l'exposition à l'hypoxie). Que ce soit pour les enzymes pancréatiques (Amylase et

Trypsine) ou intestinales (AP et N-LAP), aucune différence significative d'activité spécifique n'a été mise en évidence entre les deux groupes (ANOVA à 1 facteur :  $p > 0.5$ ) (**Tableau 2**).

*Analyse de l'expression de deux gènes clés (pk et ldh-a) impliqués dans le métabolisme anaérobique*

Les niveaux d'expression relatifs des gènes pk et ldh-a ont été analysés pour les deux groupes C et ELHT à 40 d.p.h. (192 h après le début de l'exposition à l'hypoxie) par PCR quantitative. Les analyses ont été réalisées d'une part sur le muscle et d'autre part sur les viscères (**Tableau 3**). Alors que les niveaux d'ARN pour le gène pk sont significativement plus faibles de 22.8% dans le muscle des larves exposées à l'hypoxie, aucune différence d'expression n'a pu être mise en évidence dans les viscères pour ce même gène. A l'inverse, les niveaux d'ARN pour le gène ldh-a sont significativement plus élevés de 57.1% dans les viscères des larves exposées à l'hypoxie alors qu'aucune différence d'expression n'a pu être mise en évidence dans le muscle pour ce gène.

*Effets à long-terme sur la croissance des juvéniles*

Les masses moyennes des deux sous-groupes ont été constituées de telle façon à ce qu'elles respectaient la moyenne des groupes principaux et leur distribution en taille au début du suivi de croissance, i.e. à 424 d.p.h. (ANOVA à un facteur :  $p > 0.8$ ). La croissance des juvéniles de sole a été suivie de 424 d.p.h. à 753 d.p.h., i.e. 384 jours après la fin de l'exposition à l'hypoxie (**Fig. 3**). Le suivi réalisé a montré que la croissance des juvéniles exposés à l'hypoxie au stade larvaire était plus élevée que celle des juvéniles issus du groupe témoin C (Régression linéaire :  $p < 0.05$ ).

*Effets à long-terme sur la tolérance à l'hypoxie et à la thermie des juvéniles*

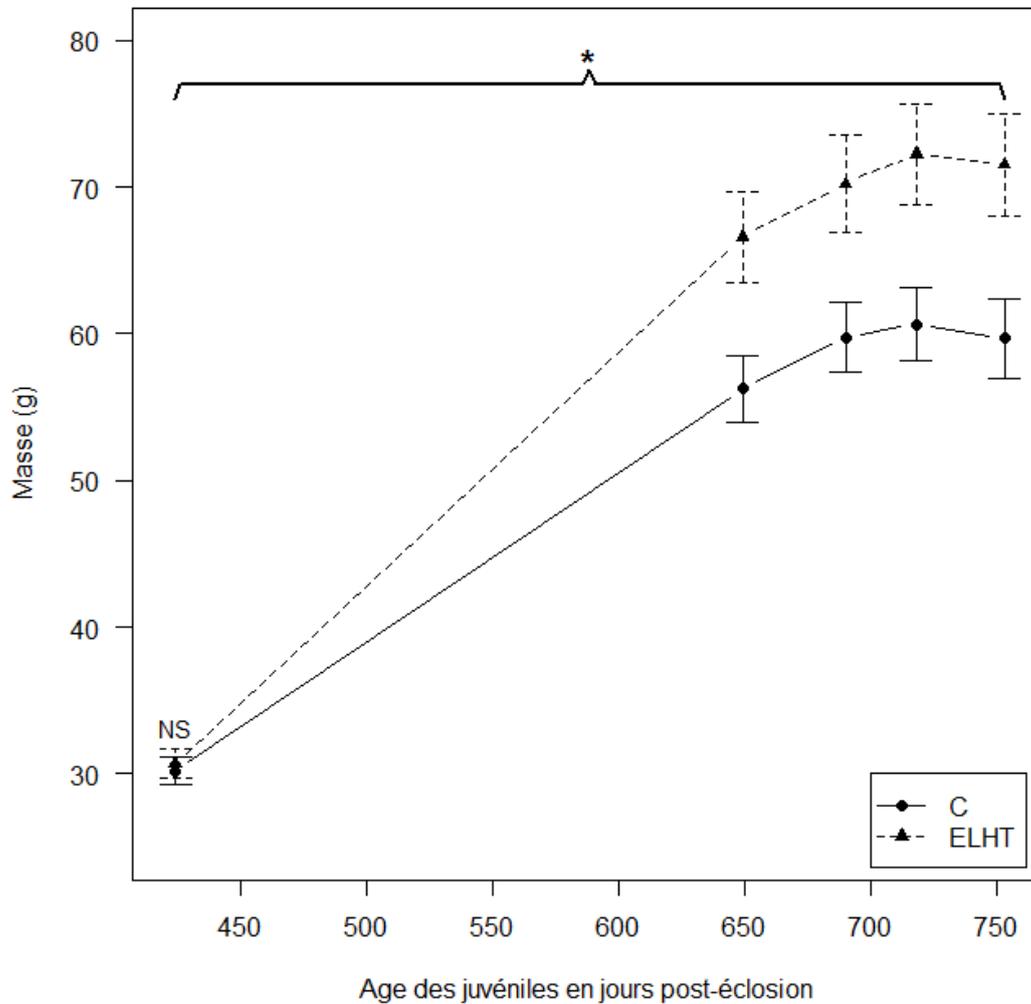
L'étude du HCT (**Fig. 4, a**) et du TCT (**Fig. 4, b**) permet de déterminer pour chaque groupe, le temps de tolérance moyen (T50) à la contrainte étudiée. Les animaux issus du groupe ELHT présentent des tolérances à l'hypoxie ( $T50 \approx 287.1$  min) ainsi qu'à la thermie ( $T50 \approx 431.8$  min) significativement plus élevées que les individus issus du groupe témoin ( $T50_{\text{hypoxie}} \approx 262.2$  min et  $T50_{\text{thermie}} \approx 421.2$  min ; Modèle de Mantel-Cox :  $p < 0.03$  et  $p < 0.01$  ; respectivement).

**Tableau 2 : Activités spécifiques des enzymes digestives.** Les résultats sont exprimés en milli-unités par milligrammes de protéines ( $\text{mU} \cdot \text{mg} \text{ protéines}^{-1}$ )  $\pm$  s.e.m. (Standard Error of Mean, Erreur Standard à la Moyenne) ( $n= 4 * 80$  larves). Au sein d'une même colonne, les moyennes avec la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ( $p\text{-value} > 0.05$ ). C = groupe Contrôle ; ELHT = Traité à l'Hypoxie au Stade Larvaire ; AP = Alcaline Phosphatase ; N-LAP = Aminopeptidase-N.

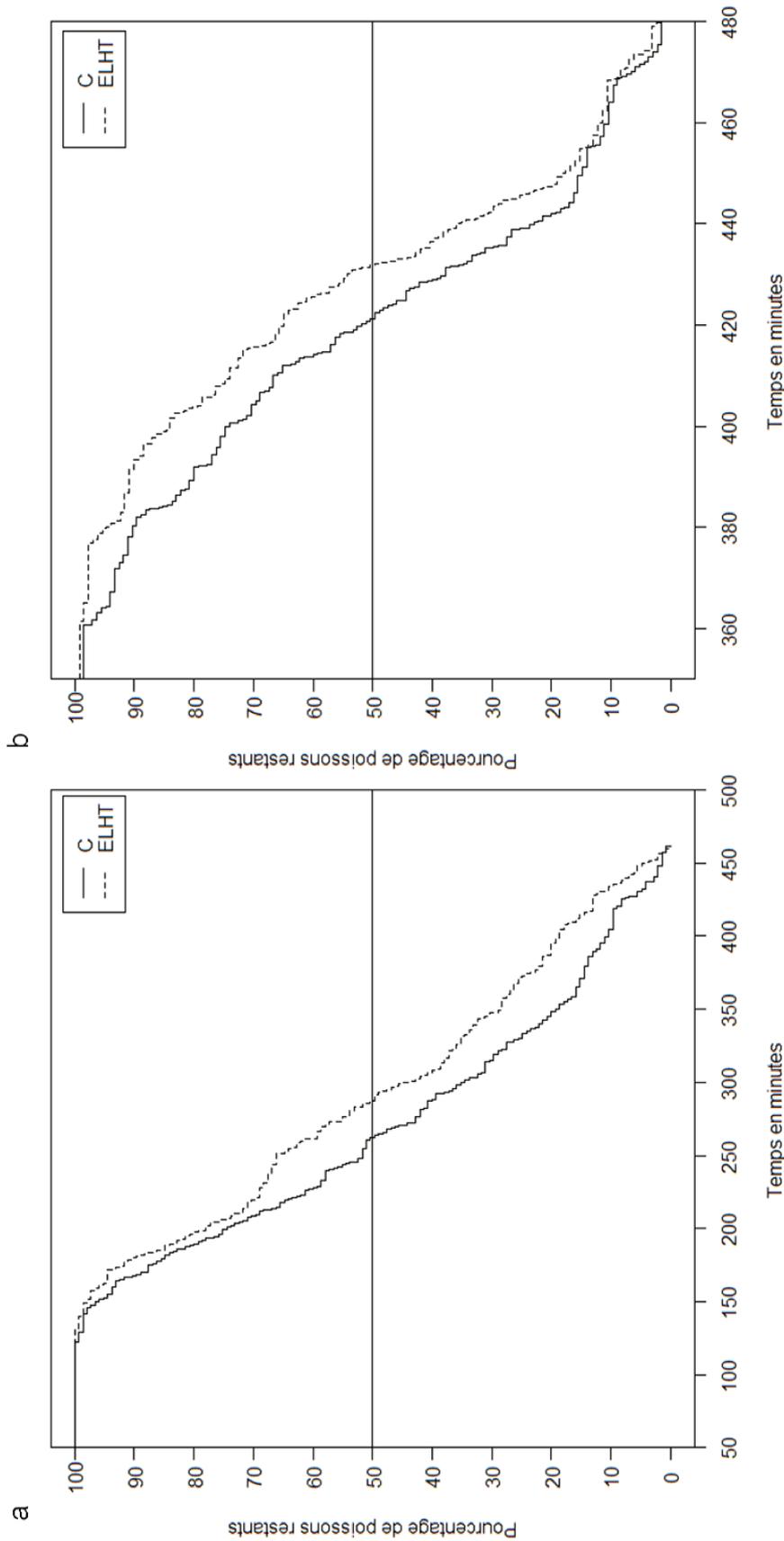
	Enzymes pancréatiques		Enzymes intestinales	
	Trypsine	Amylase	AP	N-LAP
C	14.29 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	994.10 $\pm$ 118.89 <sup>a</sup>	1227.06 $\pm$ 241.66 <sup>a</sup>	333.09 $\pm$ 96.55 <sup>a</sup>
ELHT	13.53 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	897.53 $\pm$ 77.67 <sup>a</sup>	1211.78 $\pm$ 162.63 <sup>a</sup>	362.73 $\pm$ 57.75 <sup>a</sup>

**Tableau 3 : Niveaux d'expression relatifs des gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie.** L'analyse a été effectuée sur des ARN provenant de muscle ou de viscères de larves de sole exposées (ELHT) ou non (C) à une hypoxie ( $n$  pour chaque groupe = 12 pools de 3 larves). Les p-value ont été calculées à partir d'une ANOVA à un facteur.

Gènes	Muscle				Viscères			
	C	ELHT	p-value	(ELHT-C)/C (%)	C	ELHT	p-value	(ELHT-C)/C (%)
<i>pk</i>	<b>1.67</b>	<b>1.29</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>- 22.8</b>	0.13	0.12	0.387	- 7.7
<i>ldh-a</i>	1.66	1.45	0.067	- 12.7	<b>0.21</b>	<b>0.33</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>+ 57.1</b>



**Figure 3 :** Masse moyenne des juvéniles de sole commune exposés (ELHT : - -) ou non (C : -) à un épisode hypoxique au cours de leur développement larvaire ( $\pm$  s.e.m., n à 424 d.p.h. = 150 par groupe, n à 753 d.p.h. = 117 par groupe). Les astérisques indiquent les différences significatives de croissance existantes entre le groupe C et le groupe ELHT (Code des significativités : \* :  $p < 0.05$ , NS = Non Significatif).

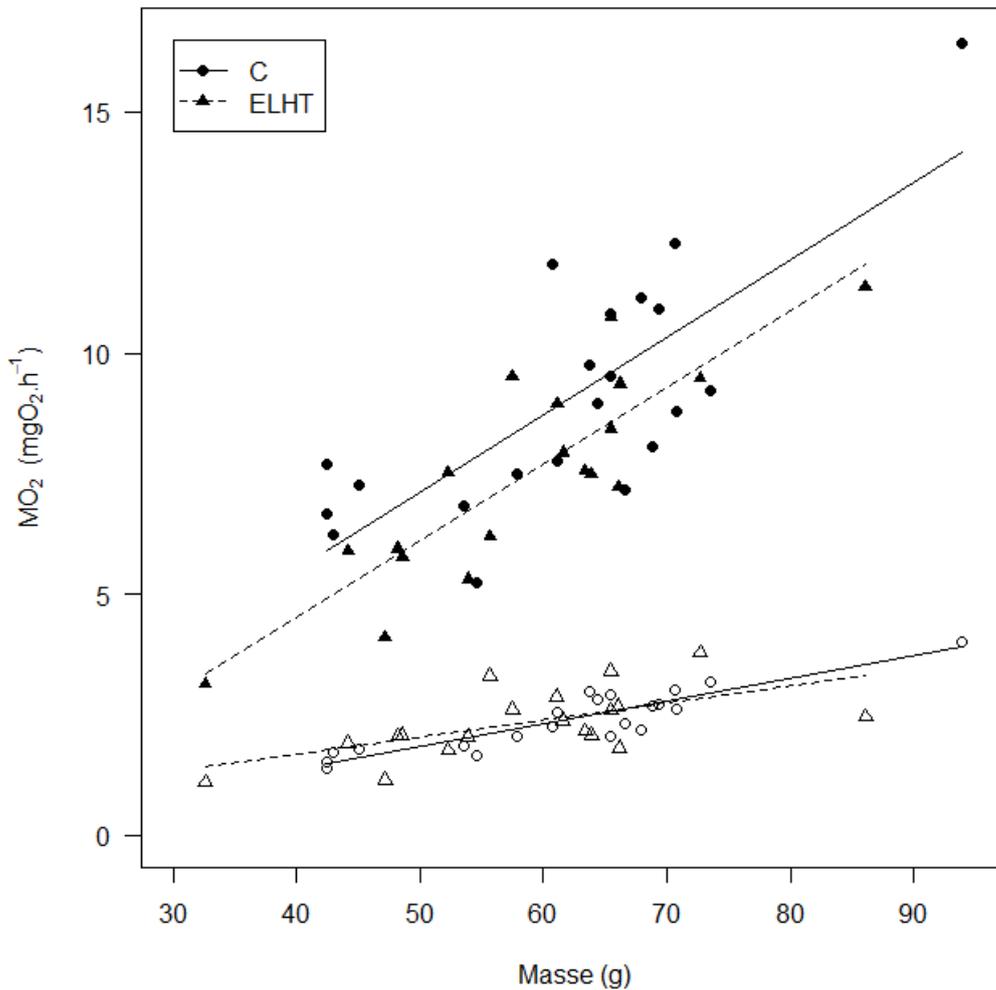


**Figure 4 :** Courbe de probabilité de Kaplan-Meier du temps de résistance aux challenges hypoxique (a) et thermique (b) des juvéniles de soles (649 et 656 d.p.h., respectivement) pour le groupe Contrôle (C : -) et le groupe conditionné à l'hypoxie au stade larvaire (ELHT : - -) (n = 145 et 133 par groupe, respectivement). La ligne horizontale représente le niveau où 50% de la population continue de résister au challenge. La projection verticale du croisement entre ce niveau et la courbe de résistance d'un groupe permet d'obtenir le temps de résistance moyen du groupe (T50). Les analyses statistiques ont révélé que les individus du groupe ELHT possèdent une tolérance à l'hypoxie (Modèle de Mantel-Cox :  $p < 0.03$ ) et une tolérance à la thermie plus élevées (Modèle de Mantel-Cox :  $p < 0.01$ ) que les individus du groupe C.

### *Effets à long-terme sur le registre métabolique des juvéniles*

Le registre métabolique aérobie des juvéniles de sole a pu être estimé en mesurant leurs taux métaboliques basaux (SMR) et actif (AMR) (**Fig. 5**). Ces deux taux métaboliques ont été obtenus sur des juvéniles âgés de 732 à 769 d.p.h. par des approches de respirométrie statique.

Globalement, on observe une relation positive entre la masse des individus et leurs taux métaboliques standard et actif dans les deux groupes (ANOVA à un facteur :  $p < 0.01$ ). L'exposition à l'hypoxie au stade larvaire n'a pas impacté de façon significative le SMR des juvéniles de soles ( $C = 2.39 \pm 0.65 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $\text{ELHT} = 2.32 \pm 0.70 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ; ANCOVA :  $p > 0.6$ ). En revanche, les juvéniles de sole issus du groupe ELHT présentent un AMR significativement plus faible de 17.6 % comparé aux juvéniles issus du groupe C ( $C = 9.05 \pm 2.56 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $\text{ELHT} = 7.46 \pm 2.18 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ; ANCOVA :  $p < 0.03$ ) malgré une relation entre la masse et le taux métabolique actif identique entre les deux groupes (Test-t de Student sur les pentes :  $p > 0.9$ ). Ces résultats conduisent à un AMS significativement plus faible de 22.8 % chez les juvéniles ayant vécu l'épisode hypoxique au stade larvaire ( $C = 6.66 \pm 2.13 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $\text{ELHT} = 5.14 \pm 1.81 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ; ANCOVA :  $p < 0.02$ ).



**Figure 5 :** Représentation des taux métaboliques basaux (SMR, Standard Metabolic Rate ;  $\circ$  et  $\Delta$ ) et actifs (AMR, Active Metabolic Rate ;  $\bullet$  et  $\blacktriangle$ ) exprimés en  $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$  en fonction de la masse des individus en g. Les données ont été acquises en respirométrie statique sur 21 soles issues du groupe contrôle (C,  $\circ$  et  $\bullet$ ) et sur 19 soles issues du conditionnement hypoxique (ELHT,  $\Delta$  et  $\blacktriangle$ ). Pour chaque groupe, les droites de régression pour le SMR et l'AMR ont été tracées (C : – et ELHT : – –). L'écart entre le SMR et l'AMR représente le registre métabolique aérobie des individus (AMS, Aerobic Metabolic Scope). Les analyses statistiques montrent que le taux métabolique basal (ANCOVA :  $p > 0.6$ ) est similaire dans les deux groupes. Le taux métabolique actif et le registre métabolique aérobie sont significativement plus faibles chez les individus issus de l'exposition à l'hypoxie (ANCOVA :  $p < 0.03$  et  $p < 0.02$ , respectivement).

### ***Discussion***

Les analyses moléculaires et biochimiques n'ayant pas, pour le moment, encore toutes été réalisées sur la sole commune, cette discussion a principalement été construite sur les différences de phénotype révélées entre le bar Européen et la sole.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sur la sole démontrent qu'une exposition précoce à un environnement modérément hypoxique est susceptible de modifier à long-terme ses performances physiologiques. Cet effet résulte d'une plasticité phénotypique puisque la contrainte hypoxique appliquée au stade larvaire n'a pas induit d'épisode de mortalité et donc de sélection de traits phénotypiques particuliers. Les effets observés au cours de cette étude chez la sole se distinguent cependant de ceux obtenus chez le bar Européen ([Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans Marine Biology](#)). En effet, alors que nous avons montré chez le bar Européen que l'exposition précoce à une hypoxie modérée induisait à long-terme une diminution des taux de croissance chez les juvéniles, l'effet observé est opposé chez la sole ; les juvéniles issus de la population de larves exposées à l'hypoxie présentant des taux de croissance plus élevés par rapport au groupe témoin. De même, les juvéniles de soles issus du groupe ayant subi l'exposition à un environnement hypoxique au cours du stade larvaire présentent une amélioration de leur tolérance vis-à-vis d'un challenge hypoxique aigu alors le conditionnement précoce à l'hypoxie chez le bar n'induisait pas de modification de cette tolérance ([Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans Marine Biology](#)).

Il est raisonnable de penser que cette différence de réponse entre les espèces est imputable à leurs caractéristiques physiologiques et plus particulièrement à leur différence de sensibilité vis-à-vis des contraintes hypoxiques. Le taux d'hypoxie appliqué dans notre étude (40% de saturation à l'air) ne constitue pas une contrainte métabolique suffisamment sévère pour induire, lorsqu'il est appliqué chez des juvéniles de sole, des modifications significatives de paramètres métaboliques tels que les taux d'ATP tissulaires ou les concentrations de lactate ou de glucose sanguins ([Dalla Via et al., 1994](#)). En revanche, chez les juvéniles de bar Européen, ces mêmes conditions induisent des modifications de taux métaboliques ([Claireaux and Lagardere, 1999](#)). Même si les pressions critiques en oxygène n'ont pas été déterminées au stade larvaire chez le bar Européen et la sole commune, il est très probable que le taux de saturation en oxygène utilisé dans notre étude ne représente pas la même contrainte hypoxique chez les deux espèces. L'absence d'impact sur la croissance des larves de sole pendant l'exposition à l'hypoxie ainsi que l'absence de régulation de l'activité de certaines

enzymes du métabolisme aérobie telles que la Citrate Synthase (résultat non montré), contrairement à ce qui a été révélé chez le bar ([Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans Marine Biology](#)) confortent l'idée d'une différence de sensibilité entre les deux espèces aux jeunes stades de vie. Néanmoins, la régulation tissu spécifique de l'expression des gènes *ldh-a* et *pk* que nous observons dans notre étude révèle tout de même que les soles ont ressenti la contrainte hypoxique. Des analyses complémentaires seraient nécessaires afin de mieux appréhender l'étendue de l'impact de cette contrainte sur le métabolisme des larves de sole. L'exposition précoce à une même hypoxie, qui a été perçue différemment en fonction des espèces et n'a donc probablement pas généré le même type d'empreinte physiologique.

Les effets opposés observés à long-terme sur la croissance entre sole et bar ne sont pas sans rappeler les différences de réponses observées à court-terme chez différentes espèces de poissons au stade juvénile. Ainsi, il a par exemple été montré chez le turbot qu'une exposition à une hypoxie modérée (42 jours à 63.5 ou 40.7 % de saturation à l'air) engendrait une diminution de la prise alimentaire, réduisant le taux de croissance ([Pichavant et al., 2001](#); [Pichavant et al., 2000](#)) alors que le même type d'hypoxie appliquée chez le qingbo (30 jours à 60.5 ou 36.3 % de saturation à l'air) induisait une meilleure croissance des animaux associée à une prise alimentaire supérieure ([Dan et al., 2014](#)). Au cours de notre étude, la quantité de nourriture ingérée par les soles était difficilement quantifiable en terme d'ingéré car la sole commune a un comportement alimentaire nocturne et variable d'une journée à l'autre ([Mas-Munoz et al., 2011](#)). Cette quantification est possible en utilisant un aliment incorporant du plomb, distribué sur une période relativement longue, et un procédé de radiographie ([Lund et al., 2013](#)) mais ce type de mesure n'était pas envisageable pour notre étude. Une telle analyse couplée avec des mesures de taux d'assimilation seront cependant nécessaires afin de déterminer si l'augmentation de croissance observée chez les juvéniles de soles exposés à l'hypoxie au stade larvaire est imputable à un ingéré et/ou à des taux d'assimilation supérieurs.

Notre étude révèle également que l'exposition à un environnement hypoxique modéré au stade larvaire a induit chez les juvéniles une meilleure tolérance à des challenges hypoxiques et thermiques. Une augmentation de la tolérance à l'hypoxie suite à un conditionnement hypoxique a déjà été observée chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) ([Fu et al., 2011](#)) et le silure (*Silurus meridionalis*) ([Yang et al., 2013](#)). Ces meilleures tolérances à l'hypoxie peuvent résulter d'une augmentation de la capacité respiratoire (adsorption et transport de l'oxygène vers les tissus) des organismes ([Randall, 1982](#); [Saint-Paul, 1984](#); [Woo](#)

and Wu, 1984; Wood and Johansen, 1972) et/ou d'une dépression métabolique (Almeida-Val et al., 2000; Hochachka, 1997; Hochachka and Lutz, 2001; Seidl et al., 2005) accompagnée d'une modification de la répartition énergétique visant à réduire la consommation de l'énergie via l'arrêt des fonctions non vitales consommatrices d'énergie (Hochachka and Lutz, 2001).

Nous avons ainsi évalué différentes composantes énergétiques chez les juvéniles de soles à travers la mesure du registre métabolique aérobie (AMS), déterminé grâce à la différence entre le taux métabolique basal (SMR) et le taux métabolique actif (AMR). La diminution de l'AMS chez les juvéniles de soles, qui n'avait pas été observée dans notre étude de conditionnement chez le bar (Vanderplancke et collaborateurs, en cours de publication dans *Marine Biology*), indique que l'exposition à l'hypoxie appliquée au stade larvaire a affecté sur le long-terme leur capacité métabolique. La diminution de l'AMS sous l'influence directe de l'hypoxie au stade adulte a déjà été observée chez des poissons marins, tels que le bar Européen (Claireaux and Lagardere, 1999), la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Claireaux et al., 2000; Dutil et al., 2007), le bar d'Amérique (*Morone saxatilis*) (Lapointe et al., 2014) et même la sole commune (Lefrancois and Claireaux, 2003). La diminution de l'AMS associée à l'augmentation des taux de croissance observées chez nos poissons issus du groupe ELHT sont en accord avec les réponses observées chez le qingbo adulte placé en condition d'hypoxie (Dan et al., 2014). La capacité métabolique conditionnant la capacité d'un individu à maintenir les différentes fonctions physiologiques (croissance, tolérance, reproduction, digestion,...) (Wang et al., 2009), nous pouvons donc supposer que certaines allocations énergétiques associées à des fonctions physiologiques ont été impactées suite au conditionnement hypoxique chez la sole. Même si nous n'avons pas pu évaluer la SDA au cours de notre étude en raison du faible volume stomacal de la sole qui engendre des processus digestifs rapides (Couturier, 2007), il est raisonnable de penser que l'énergie allouée à la digestion n'a pas dû être affectée par le conditionnement précoce puisque la croissance n'est pas négativement impactée. Ainsi, la diminution de la capacité énergétique n'a pas été répercutée uniformément sur l'ensemble des fonctions physiologiques puisque les performances de croissance et de tolérance des individus ont été améliorées. Nous pouvons supposer que certaines fonctions physiologiques, comme la reproduction, la locomotion ou autres composantes relatives au comportement, ont pu être impactées par le conditionnement précoce. Une caractérisation plus globale de l'ensemble des performances physiologiques des poissons permettront de mieux appréhender ces compromis.

### ***Conclusion***

La présente étude avait pour but les effets à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie chez la sole commune et de comparer ces effets à ceux observés précédemment chez le bar Européen. Les résultats obtenus démontrent que les processus physiologiques ne sont pas impactés de la même manière chez les deux espèces. Nous avons montré pour la sole commune que des individus ayant été exposés à une hypoxie au stade larvaire présentaient une croissance et des tolérances à l'hypoxie et à la thermie significativement plus élevées au stade juvénile. En parallèle, ces individus présentaient un AMS plus faible résultant d'une diminution de leur AMR avec un SMR inchangé. Ce résultat mériterait d'être approfondi pour déterminer chez la sole la nature du compromis physiologique qui donne cette priorité à la croissance. Cette connaissance nous permettrait d'identifier les fonctions physiologiques qui ont été nécessairement impactées, et permettrait aussi d'évaluer les conséquences possibles sur la dynamique des populations de soles dans le milieu naturel. En l'état actuel de nos données, nous pouvons raisonnablement admettre que les compromis physiologiques accompagnant les effets à long-terme sont différents entre les deux espèces, ce qui suggère des stratégies adaptatives différentes.



---

## *DISCUSSION GENERALE*

---



## 1. Choix expérimentaux

L'objectif de l'étude était d'évaluer, par une approche expérimentale, si une exposition à l'hypoxie au stade larvaire pouvait entraîner des effets physiologiques à long-terme chez le futur juvénile. Dans le but d'appréhender les différentes stratégies de réponses pouvant être observées dans le milieu naturel, nous avons décidé de comparer deux espèces présentant des tolérances à l'hypoxie différentes : le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*), une espèce considérée comme relativement sensible à l'hypoxie (Pichavant et al., 2003; Terova et al., 2009), et la sole commune (*Solea solea*), une espèce considérée comme tolérante (Cannas et al., 2007; Le Pape et al., 2003). Le protocole expérimental mis en œuvre est fidèle à un scénario réaliste pouvant être rencontré dans le milieu naturel.

Nous avons choisi une exposition à l'hypoxie en fin de phase larvaire, correspondant à la fenêtre temporelle susceptible d'être rencontrée dans les zones côtières et estuariennes (Cabral et al., 2003; Dufour et al., 2009; Jennings and Pawson, 1992; Palazzi et al., 2006). Le taux d'oxygénation retenu (40% de saturation à l'air) reproduit un épisode d'hypoxie modéré pouvant être observé dans les zones de nurserie (Haselmair et al., 2010).

Ce niveau d'oxygène a préalablement été testé dans nos structures expérimentales afin de s'assurer qu'il n'engendrait pas de mortalité remarquable. Nous voulions éviter d'introduire une sélection génétique afin d'examiner l'étendue de la plasticité phénotypique.

## 2. Evaluation des effets

Même si notre objectif principal était d'évaluer des effets à long-terme, la durée des expériences, d'environ 1 an, nous a incités à vérifier que l'hypoxie avait été ressentie durant l'exposition. L'évaluation des effets (survie, croissance, paramètres biochimiques et moléculaires) à ce stade de développement n'a pas pu être réalisée par une approche individuelle car à cette taille les poissons ne peuvent pas être munis d'une puce électronique pour être identifiés. Au stade juvénile, nous avons mis en œuvre une approche intégrative (performances physiologiques, analyses moléculaires et enzymatiques) au niveau individuel et/ou populationnel.

## 3. Bilan des principaux résultats

Au stade larvaire, les données de croissance et analyses moléculaires indiquent que l'épisode hypoxique a été ressenti plus fortement chez le bar que chez la sole.

Chez le bar, l'exposition à l'hypoxie au stade larvaire affecte la croissance des futurs juvéniles. Cet effet peut-être expliqué chez ces juvéniles, au moins en partie, par un

métabolisme digestif (SDA, Specific Dynamic Action) moindre résultant d'une capacité d'assimilation des protéines plus faible. De plus, ces mêmes juvéniles présentent en situation de normoxie des signatures moléculaires (expression de gènes) caractéristiques d'une réponse à l'hypoxie. Au vu de l'ensemble de ces données, la question d'une imprégnation du métabolisme des juvéniles par l'exposition précoce à l'hypoxie est posée. Cette imprégnation ne se répercuterait pas sur la performance de tolérance à un challenge aigu à l'hypoxie chez cette espèce.

Chez la sole commune, l'exposition à l'hypoxie au stade larvaire augmente la croissance des futurs juvéniles. Cet effet est associé à une diminution du registre métabolique aérobie (AMS, Aerobic Metabolic Scope). Nous observons aussi que l'exposition précoce à l'hypoxie a induit chez les juvéniles une meilleure performance de tolérance aux challenges aigus à l'hypoxie et à la thermie. Les réponses observées à une hypoxie précoce chez la sole sont différentes de celles du bar, mais ici encore la question d'une imprégnation peut être posée.

#### **4. L'exposition à un environnement hypoxique au stade larvaire imprègne les futurs juvéniles**

La caractérisation des traits phénotypiques des individus au stade juvénile a été réalisée à travers l'analyse des performances physiologiques et des caractéristiques métaboliques chez chacune des deux espèces.

##### ***4.1. Le cas du bar***

Nos résultats indiquent que les juvéniles issus du conditionnement hypoxique présentent, en situation de normoxie, une consommation en oxygène moindre en période post-prandiale (SDA). Ce résultat révèle que ces animaux allouent moins d'énergie au processus de digestion. Cet effet s'explique au moins en partie par la diminution des activités enzymatiques liées à la digestion des protéines (l'Amino-peptidase-N et la leucine-alanine peptidase) observée chez ces poissons. Cette restriction énergétique vis-à-vis de la fonction digestive suggère que le fonctionnement de cette fonction chez le juvénile de bar a été imprégné par le conditionnement hypoxique précoce. En effet, de précédentes études ont montré que des poissons, lorsqu'ils sont en situation d'hypoxie et qu'ils doivent donc limiter leur consommation d'oxygène, adaptent leur métabolisme postprandial et/ou leur prise alimentaire (Dan et al., 2014; Eliason and Farrell, 2014; Jordan and Steffensen, 2007). Il est à noter que les suivis de prise alimentaire réalisés au cours de notre étude révèlent que l'exposition à

l'hypoxie au stade larvaire n'induit en revanche pas de modification du taux d'ingéré chez les futurs juvéniles de bar.

L'effet à long-terme que nous observons sur la fonction digestive des juvéniles de bar peut représenter une contrainte pour l'animal car l'assimilation des nutriments conditionne la quantité d'énergie disponible pour un organisme (Kooijman, 2000). Cette énergie est mobilisée en priorité pour la maintenance (métabolisme de base dit « standard ») des processus clés à la survie (respiration, fonction cardiaque...). Une quantité d'énergie peut être également allouée pour différents processus physiologiques ou comportementaux à un moment donné et dans un environnement donné (métabolisme dit « de routine »). L'ensemble de cette énergie mobilisable pour le métabolisme de routine constitue le registre métabolique de l'animal. La stratégie d'allocation (hiérarchisation) entre les différentes fonctions physiologiques peut être dépendante de facteurs externes (stratégie adaptative) mais peut également être contrainte par les caractéristiques physiologiques de chaque individu (Kooijman, 2000).

Nos résultats indiquent que la moins bonne assimilation digestive conjuguée à l'imprégnation de l'évènement hypoxique précoce n'a pas d'incidence sur le taux métabolique standard des juvéniles. De même, le taux métabolique actif n'est pas non plus impacté, ce qui signifie que les poissons sont malgré tout capables de mobiliser autant d'énergie pour répondre ponctuellement à une activité d'intensité maximale (telle que la fuite suite à un stress). Même si nous ne l'avons pas vérifié, il est par contre très probable que les juvéniles issus du conditionnement précoce soient moins endurants et qu'ils ne soient donc pas capables de maintenir ce taux métabolique actif aussi longtemps que les poissons témoins. La contrainte énergétique associée à la moins bonne assimilation est également susceptible de se traduire par une modification des mobilisations énergétiques vis-à-vis des processus physiologiques qui ne sont pas prioritaires dans la stratégie d'allocation. Les plus faibles taux de croissance que nous observons chez les juvéniles de bar exposés à l'hypoxie au stade larvaire résultent très certainement de cette régulation. Il est en effet admis chez le poisson (Blier et al., 1997) que la croissance fait partie des processus non prioritaires et que les compromis énergétiques se font généralement au détriment de ce processus coûteux en énergie. De nombreuses études réalisées chez le poisson ont notamment montré que leur croissance était affectée en situation d'hypoxie (Pichavant et al., 2001; Pichavant et al., 2000; Stierhoff et al., 2006). De façon surprenante, aucun effet significatif sur des acteurs de la croissance au niveau du transcriptome musculaire n'a cependant pu être révélé chez les juvéniles issus de l'exposition précoce. Nous supposons que le nombre d'échantillons utilisés

dans notre analyse (n=12 par condition) n'était pas suffisant pour révéler des régulations d'expression génique au regard des variabilités interindividuelles.

L'existence d'autres compromis est vraisemblable pour d'autres fonctions physiologiques telles que la reproduction, les systèmes de défense ou encore la fonction d'osmorégulation. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de révéler l'existence de tels compromis. Les tests de nage que nous avons effectués sur les juvéniles de bar n'ont pas révélé de différence de performance chez les animaux conditionnés. Ce résultat suggère donc que la locomotion n'est pas significativement affectée et que cette fonction est suffisamment prioritaire pour ne pas faire l'objet d'un compromis énergétique.

Les principaux effets à long-terme observés au cours de cette étude chez le bar semblent résulter d'une imprégnation physiologique des conditions hypoxiques rencontrées au stade larvaire. Cette imprégnation est vraisemblablement liée à des mécanismes épigénétiques. La régulation du gène codant *kdm1b* (Lysine Histone Demethylase 1b), acteur impliqué dans les processus de méthylation des histones (Beyer et al., 2008; Krieg et al., 2010; Vavilala et al., 2012; Wellmann et al., 2008), au cours de l'exposition des larves à l'hypoxie soutient cette hypothèse. Chez les mammifères, il a été mis en évidence qu'il existait deux fenêtres principales au cours desquelles les expositions environnementales peuvent affecter l'épigénome d'un individu : (1) la fenêtre parentale, si les modifications se produisent pendant la production des gamètes, et (2) la fenêtre post-conception, à partir du développement embryonnaire (Aguilera et al., 2010; Jirtle and Skinner, 2007; Perera and Herbstman, 2011). L'application de l'hypoxie au stade larvaire chez le bar a donc possiblement affecté leur épigénome et, par voie de conséquence, les régulations physiologiques du futur juvénile. Cette imprégnation exercée en fin de développement larvaire revêt un caractère original car les études réalisées jusqu'à présent chez le poisson marin, notamment vis-à-vis du système olfactif, laissaient suggérer que seuls les stades de développement précoce étaient sensibles aux facteurs externes (Dixson et al., 2014). Nous ne pouvons cependant pas exclure que l'exposition à l'hypoxie aurait eu des conséquences physiologiques plus importantes à long-terme si elle avait été appliquée à un stade de développement plus précoce. Cette question n'a pas été abordée au cours de la thèse car elle ne répondait pas à une réalité écologique (voir paragraphe 1 « Choix expérimentaux »).

La nature des acteurs moléculaires/biochimiques et des processus biologiques concernés par les régulations épigénétiques ou plus généralement imprégnés par l'exposition précoce à l'hypoxie reste encore à caractériser. Les résultats obtenus chez les larves et juvéniles de bar

indiquent que des profils d'expression de gènes codant des enzymes du métabolisme aérobie et anaérobie ont été imprégnés par l'exposition à l'hypoxie au niveau hépatique. Une étude plus exhaustive des différents acteurs moléculaires et biochimiques intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique serait nécessaire dans différents tissus (intestin, cerveau, cœur...) afin de mieux caractériser les voies métaboliques imprégnées par le conditionnement précoce. Cela permettrait notamment de comprendre pourquoi les juvéniles conditionnés à l'hypoxie présentent des taux de glycémie inférieurs aux témoins. Certains des gènes que nous trouvons régulés sur le long-terme sont également connus pour être des cibles du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). C'est notamment le cas de la Lactate DeHydrogénase (ldh-a) et de egl-9 family hypoxia-inducible factor 3 (egln3) qui est considéré comme un senseur à l'oxygène (Firth et al., 1995; Pescador et al., 2005). La régulation de ces gènes suggère que la voie de signalisation dans la réponse à l'hypoxie a également été imprégnée par l'exposition précoce.

#### ***4.2. Le cas de la sole commune***

Concernant la sole commune, des réponses différentes à celles constatées chez le bar ont été observées. Cependant nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, de toutes les analyses des paramètres physiologiques nous permettant d'étudier les différences observées chez les juvéniles de sole, comme nous avons pu le faire chez le bar. Ainsi, les mesures d'ingéré, d'assimilation et les analyses biochimiques et moléculaires des voies métaboliques restent à entreprendre.

Nos résultats indiquent que les juvéniles issus du conditionnement hypoxique présentent, en situation de normoxie, un taux métabolique standard non modifié. En revanche, leur taux métabolique actif est plus faible. Cela suggère que les individus issus du conditionnement précoce ne sont pas capables de mobiliser autant d'énergie que les individus du groupe témoin pour répondre ponctuellement à une activité d'intensité maximale. Cette diminution du taux métabolique actif ne va probablement pas avoir d'incidence sur la locomotion des individus car la sole commune présente une activité de nage relativement faible, même en situation de stress (Cannas et al., 2007; Dalla Via et al., 1998). Il a d'ailleurs été montré que, confrontée à un épisode hypoxique, la sole ne va pas tenter de fuir (Cannas et al., 2007; Dalla Via et al., 1998). En revanche, elle va mettre en place un certain nombre de réponses métaboliques stratégiques (modifications d'allocations énergétiques) pour faire face à la contrainte hypoxique. Cette hypothèse est confortée par nos résultats qui indiquent que

les juvéniles de sole exposés à l'hypoxie au stade larvaire présentent une meilleure tolérance face à une hypoxie aigue.

L'effet à long-terme que nous observons sur le taux métabolique actif des juvéniles de sole peut représenter une contrainte pour l'animal en diminuant sa capacité à mobiliser de l'énergie (registre métabolique) pour assurer certaines fonctions physiologiques, telles que la croissance ou encore la reproduction.

Nos résultats indiquent que la diminution du registre métabolique des individus n'a pas eu d'impact négatif sur la croissance puisque les individus issus du conditionnement précoce présentaient des gains de poids journaliers supérieurs. Ces résultats suggèrent donc que la croissance pourrait constituer un processus physiologique prioritaire dans l'allocation énergétique pour faire face à un environnement hypoxique chez cette espèce. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'il est généralement admis que les animaux les plus tolérants à l'hypoxie sont aussi ceux qui présentent la plus grande taille (Nilsson and Ostlund-Nilsson, 2008; Roze et al., 2013). On peut également imaginer que la plus grande taille conférée aux animaux exposés à l'hypoxie serait un atout pour ces individus au regard des prédateurs éventuels. La meilleure croissance somatique observée chez nos animaux doit probablement résulter d'un compromis avec d'autres fonctions physiologiques, comme la reproduction, les systèmes de défense ou encore la fonction d'osmorégulation (Arendt et al., 2001; Arendt and Wilson, 2000; Arnott et al., 2006; Farrell et al., 1997; Metcalfe and Monaghan, 2003; Roze et al., 2013; Tsikliras et al., 2007). Des études complémentaires seraient nécessaires afin de révéler l'existence de tels compromis.

Les principaux effets à long-terme observés au cours de cette étude chez la sole semblent résulter d'une imprégnation physiologique des conditions hypoxiques rencontrées au stade larvaire. Cette imprégnation pourrait, comme chez le bar, être liée à des mécanismes épigénétiques. Des analyses permettant d'étayer cette hypothèse seraient à entreprendre.

### ***4.3. Stratégies adaptatives espèces-spécifiques***

L'ensemble des effets à long-terme observés, différents en fonction des deux espèces étudiées, amène à nous interroger sur l'avantage que pourrait tirer les juvéniles de bar et de sole de cette imprégnation physiologique précoce.

En nous basant sur différentes données de la littérature (Bateson et al., 2004; Bateson et al., 2014; Perera and Herbstman, 2011; Ravelli et al., 1998), nous pouvons supposer que cette plasticité développementale vis-à-vis de l'hypoxie mise en évidence chez le bar et la sole peut

permettre aux individus d'acquérir un avantage adaptatif face à cette contrainte au cours de leur vie future.

La meilleure tolérance des soles conditionnées vis-à-vis d'une contrainte hypoxique aigue, révélée lors de nos tests, supporte cette hypothèse. L'exposition précoce à l'épisode hypoxique semble avoir permis aux futurs juvéniles de soles de mieux gérer physiologiquement un environnement appauvri en oxygène. Plusieurs processus permettant au poisson de faire face à l'hypoxie ont pu être optimisés chez les soles conditionnées : meilleure extraction de l'oxygène du milieu, meilleur transport vers les tissus, meilleur rendement des voies anaérobiques, meilleure gestion du lactate produit, meilleure capacité à se mettre en dépression métabolique. Des analyses complémentaires réalisées sur ces paramètres devraient permettre de mieux comprendre ce qui sous-tend cette meilleure tolérance. Cette meilleure capacité à résister à un événement hypoxique chez la sole commune s'accompagne de meilleurs taux de croissance. Le fait que les compromis énergétiques associés à la baisse du registre métabolique chez la sole ne se soient pas établis au détriment de la fonction de croissance suggère que cette dernière pourrait revêtir un caractère important dans l'optique de résister à un événement hypoxique. Comme mentionné précédemment pour appuyer cette hypothèse, des études réalisées chez le poisson suggèrent que la taille des poissons est positivement corrélée à la tolérance à l'hypoxie (Nilsson and Ostlund-Nilsson, 2008). La stratégie adaptative mise en œuvre chez la sole commune se distingue de celle du bar.

Globalement, l'épisode précoce d'hypoxie a activé chez le bar un processus de développement aboutissant à un phénotype maximisant le registre métabolique tout en préservant des fonctions physiologiques potentiellement plus vitales que la croissance en cas d'une nouvelle exposition à l'hypoxie. Le maintien de la capacité de locomotion (révélé par les tests de nage) pourrait être une composante essentielle de la survie du bar face à des eaux appauvries en oxygène. Elle lui permettrait de fuir à la fois la contrainte hypoxique et les prédateurs sachant que leur plus petite taille les rendrait plus vulnérables. S'il existe, un tel « avantage » devrait être mesurable expérimentalement dans des tests de comportement en condition d'hypoxie chronique. Cette différence de stratégie adaptative entre les deux espèces est à rapprocher de leur mode de vie; du fait de son comportement plus sédentaire la sole serait plus susceptible de subir des épisodes hypoxiques que le bar qui est capable de se déplacer sur de grandes distances.



---

## *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

---



Les résultats que nous avons obtenus ont révélé qu'un même conditionnement hypoxique réalisé sur les deux espèces entraînait des réponses espèces-spécifiques, aussi bien sur le court-terme que sur le long-terme. Les perspectives qui en découlent, tant au niveau écologique qu'au niveau de l'aquaculture, sont nombreuses même s'il y a nécessité d'approfondir certains résultats.

Il est difficilement envisageable de poursuivre des études sur le métabolisme post-prandial sans une détermination précise de l'ingéré et de l'assimilation, particulièrement pour la sole. Ce type de détermination n'est pas aisé sur cette espèce (Couturier, 2007; Lund et al., 2013) mais nécessiterait des mesures de digestibilité avec utilisation d'un marqueur neutre tel que l'oxyde d'Yttrium.

Nos résultats comportent une dimension épigénétique qui n'a pas réellement été abordée au cours de cette thèse. L'étude d'indicateurs de modifications épigénétiques permettrait d'évaluer si des mécanismes épigénétiques ont été activés chez nos deux espèces au cours du conditionnement. De plus, l'étude de ces processus épigénétiques nécessiteraient également de tester d'autres fenêtres d'exposition afin de déterminer l'étendue de ce type de conditionnement. Jusqu'à présent, deux fenêtres principales au cours desquelles les expositions environnementales peuvent affecter l'épigénome d'un individu sur le long-terme ont été mises en évidence chez les mammifères : (1) la fenêtre parentale, si les modifications se produisent pendant la production des gamètes, et (2) la fenêtre post-conception, à partir du développement embryonnaire (Aguilera et al., 2010; Jirtle and Skinner, 2007; Perera and Herbstman, 2011). Ensuite, afin d'augmenter notre connaissance des effets de telles expositions précoces, il serait intéressant de tester différentes modalités d'exposition afin de définir si les effets à long-terme sont dépendants (1) d'une fenêtre de sensibilité spécifique pour l'exposition, (2) des niveaux d'hypoxie appliqués et (3) de la durée d'exposition. Ainsi, une exposition plus tardive ou plus anticipée ou encore une hypoxie plus sévère ou au contraire moins sévère ou même une exposition plus longue ou plus courte aurait-elle des effets similaires, atténués, augmentés ou pas d'effets du tout par rapport aux conditions appliquées au cours de cette thèse ?

Ce travail de thèse n'a pas permis de réellement tester les potentiels avantages écologiques du conditionnement hypoxique au stade larvaire. Cette évaluation nécessiterait la soumettre les juvéniles ou les adultes de bar et sole à une hypoxie chronique. Cette contrainte pourrait représenter le moyen le plus adapté pour permettre d'évaluer les compromis fonctionnels et physiologiques mis en place suite au conditionnement précoce. Cette hypoxie chronique pourrait être appliquée avec une intensité proche de celle subie au

stade larvaire, i.e. une hypoxie de 8 jours à 40% de saturation à l'air, étant donné que des études précédentes ont démontré que des expositions à des hypoxies de l'ordre de 50% pouvaient affecter les fonctions physiologiques d'individus dès 5 jours d'exposition (Terova et al., 2009; Terova et al., 2008). De plus, des hypoxies d'intensité et de durée différentes pourraient être appliquées afin de permettre la pleine expression des capacités métaboliques des individus.

Par la suite, la prolongation de la phase juvénile permettrait d'obtenir une meilleure caractérisation des phénotypes des deux espèces. Cette caractérisation a été commencée pour la sole commune à travers l'étude des profils génétiques sur des échantillons d'ARN extraits dans le foie et le cerveau. Pour le moment, ces analyses n'ont pas permis de mettre en évidence des différences notables entre nos deux groupes d'animaux. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précautions puisqu'ils ont été obtenus sur un faible échantillonnage ( $n = 10$  individus dans chaque groupe). Cette comparaison des transcriptomes chez les deux groupes pourrait potentiellement révéler des différences si nous travaillions sur un plus grand nombre d'échantillons. La caractérisation des phénotypes des deux espèces nous permettrait également de déterminer (1) si cette exposition pourrait affecter l'effort reproducteur des individus (maturation sexuelle, nombre de descendants viables,...) et (2) si, comme montré chez les mammifères (Goldman et al., 2007), cette programmation mise en place au stade larvaire serait transmise à la génération suivante. Des analyses de maturation sexuelle, via des dosages hormonaux, ont donc été entreprises en parallèle sur cette espèce.

Enfin, nous savons que le changement global actuel n'a pas pour seule conséquence de modifier les disponibilités en oxygène du milieu marin. D'autres paramètres physico-chimiques de l'eau, tels que la température ou le pH, sont modifiés et ont des conséquences connues sur les organismes marins. Toutefois, les études menées sur chacun des paramètres traitent majoritairement des conséquences de la variation d'un seul paramètre. Les conséquences de l'interaction des différents paramètres entre eux sur les performances physiologiques des individus mériteraient d'être étudiées au travers d'expérimentations couplant des variations multiples des différents paramètres. Ainsi, que ce soit sur le court-terme ou sur le long-terme, des analyses multi-stress seraient à envisager afin de comprendre l'étendue des conséquences du changement global actuel sur la physiologie des organismes marins.

Nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit, les expositions précoces à l'hypoxie engendrent des effets à long-terme sur les performances physiologiques et métaboliques des poissons marins. Ces modifications fondamentales des performances des individus peuvent être à l'origine de modifications plus larges, impactant de ce fait les dynamiques des populations de poissons. En effet, la modification des taux de croissance peut impacter les densités de poissons au sein d'une zone géographique (Lorenzen and Enberg, 2002). De même, la croissance des individus étant le résultat de compromis avec les autres fonctions physiologiques de l'organisme (Arendt et al., 2001; Arendt and Wilson, 2000; Arnott et al., 2006; Farrell et al., 1997; Metcalfe and Monaghan, 2003; Roze et al., 2013; Tsikliras et al., 2007), la modification des taux de croissance peut modifier les capacités de reproduction d'une population ou encore les capacités de migration vers les zones de reproduction, affectant ainsi le recrutement de nouveaux individus.



---

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---



**-A-**

**Aguilera, O., Fernandez, A. F., Munoz, A. and Fraga, M. F.** (2010). Epigenetics and environment: a complex relationship. *Journal of Applied Physiology* **109**, 243-251.

**Almeida-Val, V. M. F., Oliveira, A. R., da Silva, M. D. P., Ferreira-Nozawa, M. S., Araujo, R. M., Val, A. L. and Nozawa, S. R.** (2011). Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A\* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genetics and Molecular Biology* **34**, 315-322.

**Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Duncan, W. P., Souza, F. C. A., Paula-Silva, M. N. and Land, S.** (2000). Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes : Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **125**, 219-226.

**Anjos, M. B., De Oliveira, R. R. and Zuanon, J.** (2008). Hypoxic environments as refuge against predatory fish in the Amazonian floodplains. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 45-50.

**Arendt, J., Wilson, D. S. and Stark, E.** (2001). Scale strength as a cost of rapid growth in sunfish. *Oikos* **93**, 95-100.

**Arendt, J. D. and Wilson, D. S.** (2000). Population differences in the onset of cranial ossification in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*), a potential cost of rapid growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**, 351-356.

**Arnott, S. A., Chiba, S. and Conover, D. O.** (2006). Evolution of intrinsic growth rate: Metabolic costs drive trade-offs between growth and swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution* **60**, 1269-1278.

**-B-**

**Barnabé, G.** (1974). Mass Rearing of the Bass *Dicentrarchus labrax* L. In *The early life history of fish*, pp. 749-753: Springer.

**Barnabé, G., Boulineau-Coatanea, F. and Rene, F.** (1976). Chronologie de la morphogénèse chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.)(Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture* **8**, 351-363.

**Barrionuevo, W. R., Fernandes, M. N. and Rocha, O.** (2010). Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. *Brazilian Journal of Biology* **70**, 425-434.

**Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'Udine, B., Foley, R. A., Gluckman, P., Godfrey, K., Kirkwood, T., Lahr, M. M. et al.** (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419-421.

**Bateson, P., Gluckman, P. and Hanson, M.** (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *Journal of Physiology-London* **592**, 2357-2368.

**Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpern, B., Hays, C. G., Hoshino, K., Minello, T. J. et al.** (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* **51**, 633-641.

**Benson, B. B. and Krause, D.** (1984). The Concentration and Isotopic Fractionation of Oxygen Dissolved in Freshwater and Seawater in Equilibrium with the Atmosphere. *Limnology and Oceanography* **29**, 620-632.

**Bernier, N. J., Gorissen, M. and Flik, G.** (2012). Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *Journal of Experimental Biology* **215**, 2273-2282.

**Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brook, M. J.** (1946). A method for the rapid determination of Alkaline Phosphatase with five Cubic Millimeters of Serum. *Journal of Biological Chemistry* **164**, 321-329.

**Beyer, S., Kristensen, M. M., Jensen, K. S., Johansen, J. V. and Staller, P.** (2008). The Histone Demethylases JMJD1A and JMJD2B Are Transcriptional Targets of Hypoxia-inducible Factor HIF. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 36542-36552.

**Bickler, P. E. and Buck, L. T.** (2007). Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology* **69**, 145-170.

**Blaxter, J. H. S.** (1969). Chapter 4 : Development : Eggs and Larvae. In *Fish Physiology*, Vol. 3 : Reproduction and Growth ; Bioluminescence, Pigments, and Poisons, eds. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 177-252: Academic Press.

**Blier, P., Pelletier, D. and Dutil, J. D.** (1997). Does aerobic capacity set a limit on fish growth rate? *Reviews in Fisheries Science* **5**, 323-340.

- Bouget, J. F.** (2008). Teneurs en oxygène dissous en Baie de Quiberon, pp. 8: Ifremer.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Breitbart, D. L.** (1992). Episodic hypoxia in Chesapeake Bay : Interacting effects of recruitment, behavior, and physical disturbance. *Ecological Monographs* **62**, 525-546.
- Brierley, A. S. and Kingsford, M. J.** (2009). Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology* **19**, R602-R614.
- Bureau, D. P., Azevedo, P. A., Tapia-Salazar, M. and Cuzon, G.** (2000). Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22.
- Burton, T., Killen, S. S., Armstrong, J. D. and Metcalfe, N. B.** (2011). What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**, 3465-3473.

-C-

- Cabral, H. N., Castro, F., Linhares, D. and Alexandrino, P.** (2003). Genetic differentiation of *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* Kaup, 1858, (Pisces : Pleuronectiformes) from several estuarine systems of the Portuguese coast. *Scientia Marina* **67**, 43-52.
- Cahu, C. L., Infante, J. L. Z., Peres, A., Quazuguel, P. and Le Gall, M. M.** (1998). Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture* **161**, 479-489.
- Cahu, C. L. and Zambonino-Infante, J. L.** (1994). Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet : Effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* **109**, 213-222.
- Cahu, C. L. and Zambonino-Infante, J. L.** (1995). Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 431-437.
- Cameron, P. and VonWesternhagen, H.** (1997). Malformation rates in embryos of North Sea fishes in 1991 and 1992. *Marine Pollution Bulletin* **34**, 129-134.

**Cannas, M., Bayle, A., Wing, O. L. C., Domenici, P. and Lefrancois, C.** (2007). Behaviour and physiology of the startle response in common sole (*Solea solea*) exposed to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **146**, S85-S85.

**Cech, J. J., Massingill, M. J., Vondracek, B. and Linden, A. L.** (1985). Respiratory metabolism of mosquitofish, *Gambusia affinis*: Effects of temperature, dissolved oxygen, and sex difference. *Environmental Biology of Fishes* **13**, 297-307.

**Chapman, L. J. and McKenzie, D. J.** (2009). Chapter 2 : Behavioral Responses and Ecological Consequences. In *Fish Physiology*, Vol. 27 : Hypoxia, eds. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 25-77: Academic Press.

**Claireaux, G. and Lagardere, J. P.** (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* **42**, 157-168.

**Claireaux, G., Webber, D. M., Lagardere, J. P. and Kerr, S. R.** (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research* **44**, 257-265.

**Conceicao, L. E. C., Morais, S. and Ronnestad, I.** (2007). Tracers in fish larvae nutrition: A review of methods and applications. *Aquaculture* **267**, 62-75.

**Cook, D. G., Iftikar, F. I., Baker, D. W., Hickey, A. J. R. and Herbert, N. A.** (2013). Low-O<sub>2</sub> acclimation shifts the hypoxia avoidance behaviour of snapper (*Pagrus auratus*) with only subtle changes in aerobic and anaerobic function. *Journal of Experimental Biology* **216**, 369-378.

**Couturier, C.** (2007). Effets des caractéristiques physico-chimiques et biorhéologiques de l'eau sur la physiologie, les performances adaptatives et la sélection de l'habitat chez la sole commune *Solea solea* (Linnaeus, 1758): Université de La Rochelle.

**Craig, J. K., Rice, J. A., Crowder, L. B. and Nadeau, D. A.** (2007). Density-dependent growth and mortality in an estuary-dependent fish: an experimental approach with juvenile spot *Leiostomus xanthurus*. *Marine Ecology Progress Series* **343**, 251-262.

**Crane, R. K., Boge, G. and Rigal, A.** (1979). Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochimica Et Biophysica Acta* **554**, 264-267.

## -D-

**Dahlqvist, A.** (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical biochemistry* **22**, 99-107.

**Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O. and Cortesi, P.** (1997). Environmental versus functional hypoxia/anoxia in sole *Solea solea*: The lactate paradox revisited. *Marine Ecology Progress Series* **154**, 79-90.

**Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O. and Cortesi, P.** (1998). Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **76**, 2108-2113.

**Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O. and Dezwaan, A.** (1994). Influence of long-term hypoxia exposure on the energy-metabolism of *Solea solea* .2. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Marine Ecology-Progress Series* **111**, 17-27.

**Dan, X. M., Yan, G. J., Zhang, A. J., Cao, Z. D. and Fu, S. J.** (2014). Effects of stable and diel-cycling hypoxia on hypoxia tolerance, postprandial metabolic response, and growth performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*). *Aquaculture* **428**, 21-28.

**Dehne, N., Kerkweg, U., Otto, T. and Fandrey, J.** (2007). The HIF-1 response to simulated ischemia in mouse skeletal muscle cells neither enhances glycolysis nor prevents myotube cell death. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **293**, R1693-R1701.

**Desai, M. and Hales, C. N.** (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **72**, 329-348.

**Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Lecorre, N. and Letty, Y.** (1987). Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture* **66**, 125-147.

**Diaz, R. J.** (2001). Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality* **30**, 275-281.

**Diaz, R. J. and Breitburg, D. L.** (2009). Chapter 1 : The Hypoxic Environment. In *Fish Physiology*, Vol. 27 : Hypoxia, eds. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 1-23: Academic Press.

**Diaz, R. J. and Rosenberg, R.** (1995). Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review* **33**, 245-303.

**Diaz, R. J. and Rosenberg, R.** (2001). Overview of anthropogenically-induced hypoxic effects on marine benthic fauna. *Coastal and Estuarine Sciences*, Vol 58: Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems **58**, 129-145.

**Diaz, R. J. and Rosenberg, R.** (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* **321**, 926-929.

**Diez, J. M. and Davenport, J.** (1990). Energy exchange between the yolk and embryo of dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) eggs held under Normoxic, Hypoxic and Transient Anoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **96**, 825-830.

**Dixon, D. L., Jones, G. P., Munday, P. L., Planes, S., Pratchett, M. S. and Thorrold, S. R.** (2014). Experimental evaluation of imprinting and the role innate preference plays in habitat selection in a coral reef fish. *Oecologia* **174**, 99-107.

**Domenici, P., Lefrancois, C. and Shingles, A.** (2007). Hypoxia and the antipredator behaviours of fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **362**, 2105-2121.

**Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Duffy, J. E., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N. et al.** (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. In *Annual Review of Marine Science*, Vol 4, vol. 4 eds. C. A. Carlson and S. J. Giovannoni, pp. 11-37. Palo Alto: Annual Reviews.

**Drake, A. J., Walker, B. R. and Seckl, J. R.** (2005). Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **288**, R34-R38.

**Dufour, V., Cantou, M. and Lecomte, F.** (2009). Identification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery areas in the north-western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **89**, 1367-1374.

**Dutil, J. D., Sylvestre, E. L., Gamache, L., Larocque, R. and Guderley, H.** (2007). Burst and coast use, swimming performance and metabolism of Atlantic cod *Gadus morhua* in sub-lethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology* **71**, 363-375.

---

**-E-**

**Eby, L. A., Crowder, L. B., McClellan, C. M., Peterson, C. H. and Powers, M. J.** (2005). Habitat degradation from intermittent hypoxia: impacts on demersal fishes. *Marine Ecology-Progress Series* **291**, 249-261.

**Eliason, E. J. and Farrell, A. P.** (2014). Effect of hypoxia on specific dynamic action and postprandial cardiovascular physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **171**, 44-50.

**Engstrom-Ost, J. and Isaksson, I.** (2006). Effects of macroalgal exudates and oxygen deficiency on survival and behaviour of fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **335**, 227-234.

**Essington, T. E. and Paulsen, C. E.** (2010). Quantifying Hypoxia Impacts on an Estuarine Demersal Community Using a Hierarchical Ensemble Approach. *Ecosystems* **13**, 1035-1048.

**-F-**

**Farrell, A. P., Bennett, W. and Devlin, R. H.** (1997). Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **75**, 335-337.

**Ferguson-Smith, A. C. and Surani, M. A.** (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* **293**, 1086-1089.

**Ferraresso, S., Milan, M., Pellizzari, C., Vitulo, N., Reinhardt, R., Canario, A. V. M., Patarnello, T. and Bargelloni, L.** (2010). Development of an oligo DNA microarray for the European sea bass and its application to expression profiling of jaw deformity. *Bmc Genomics* **11**, 17.

**Firth, J. D., Ebert, B. L. and Ratcliffe, P. J.** (1995). Hypoxic regulation of Lactate-Dehydrogenase-A. Interaction between Hypoxia-Inducible Factor-1 and cAMP response elements. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 21021-21027.

**Fry, F. E. J.** (1971). Chapter 1 : The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In *Fish Physiology*, Vol. 6 : Environmental Relations and Behavior, eds. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 1-98: Academic Press.

**Fu, S. J., Brauner, C. J., Cao, Z. D., Richards, J. G., Peng, J. L., Dhillon, R. and Wang, Y. X.** (2011). The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology* **214**, 2080-2088.

**-G-**

**Geddes, K. and Philpott, D. J.** (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology* **135**, 8-12.

**Gee, J. H. and Gee, P. A.** (1995). Aquatic surface respiration, buoyancy control and the evolution of air-breathing in gobies (Gobiidae: Pisces). *Journal of Experimental Biology* **198**, 79-89.

**Geist, S. J., Ekau, W. and Kunzmann, A.** (2013). Energy demand of larval and juvenile Cape horse mackerels, *Trachurus capensis*, and indications of hypoxia tolerance as benefit in a changing environment. *Marine Biology* **160**, 3221-3232.

**Geurden, I., Aramendi, M., Zambonino-Infante, J. L. and Panserat, S.** (2007). Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **292**, R2275-R2283.

**Goldman, A. S., Hopkinson, J. M. and Rassin, D. K.** (2007). Benefits and risks of breastfeeding. *Advances in pediatrics* **54**, 275-304.

**Guderley, H.** (2007). Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. *Cold ocean physiology* **66**, 58.

**Guderley, H., Brokordt, K., Cortes, H. M. P., Marty, Y. and Kraffe, E.** (2011). Diet and performance in the scallop, *Argopecten purpuratus*: force production during escape responses and mitochondrial oxidative capacities. *Aquatic Living Resources* **24**, 261-271.

**-H-**

**Hall, J. R., Short, C. E. and Driedzic, W. R.** (2006). Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *Journal of Experimental Biology* **209**, 4490-4502.

**Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E. et al.** (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **319**, 948-952.

**Hamdoun, A. and Epel, D.** (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1745-1750.

**Hamor, T. and Garside, E. T.** (1976). Developmental rates of embryos of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in response to various levels of temperature, dissolved oxygen, and water exchange. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **54**, 1912-1917.

**Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L. and Williams, S. L.** (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters* **9**, 228-241.

**Haselmair, A., Stachowitsch, M., Zuschin, M. and Riedel, B.** (2010). Behaviour and mortality of benthic crustaceans in response to experimentally induced hypoxia and anoxia in situ. *Marine Ecology Progress Series* **414**, 195-208.

**Hassell, K. L., Coutin, P. C. and Nugegoda, D.** (2008). Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin* **57**, 302-306.

**Ho, D. H. and Burggren, W. W.** (2012). Parental hypoxic exposure confers offspring hypoxia resistance in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology* **215**, 4208-4216.

**Hoar, W. S., Randall, D. J. and Brett, J. R.** (1979). *Fish Physiology*, Vol. 8 Bioenergetics and growth: Academic Press.

**Hochachka, P. W.** (1997). Oxygen - A key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. *American Zoologist* **37**, 595-603.

**Hochachka, P. W. and Lutz, P. L.** (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **130**, 435-459.

**Hofmann, A. F., Peltzer, E. T., Walz, P. M. and Brewer, P. G.** (2011). Hypoxia by degrees: Establishing definitions for a changing ocean. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **58**, 1212-1226.

**Howell, B. R.** (1997). A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* **155**, 355-365.

**-I-**

**Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M. A. and Fernandez-Borras, J.** (2010). Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **155**, 319-326.

**Imsland, A. K., Foss, A., Conceicao, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. and White, P.** (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13**, 379-407.

**Inui, Y. and Miwa, S.** (2012). Chapter 4 : Metamorphosis of Flatfish (Pleuronectiformes). In *Metamorphosis in Fish*, eds. S. Dufour K. Rousseau and B. G. Kapoor), pp. 107-153: Science Publishers.

**Ishibashi, Y., Inoue, K., Nakatsukasa, H., Ishitani, Y., Miyashita, S. and Murata, O.** (2005). Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* **244**, 331-340.

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

**-J-**

**Jennings, S. and Pawson, M. G.** (1992). The origin and recruitment of bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **72**, 199-212.

**Jirtle, R. L. and Skinner, M. K.** (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics* **8**, 253-262.

**Jobling, M.** (1995a). *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall: Fish and Fisheries, Series 16.

**Jobling, M.** (1995b). Fish bioenergetics. *Oceanographic Literature Review* **42**.

**Johnston, E. F., Alderman, S. L. and Gillis, T. E.** (2013). Chronic Hypoxia Exposure of Trout Embryos Alters Swimming Performance and Cardiac Gene Expression in Larvae. *Physiological and Biochemical Zoology* **86**, 567-575.

**Johnston, I., Vieira, V. and Hill, J.** (1996). Temperature and ontogeny in ectotherms: muscle phenotype in fish. *Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptations*, 153-181.

**Johnston, I. A. and Temple, G. K.** (2002). Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *Journal of Experimental Biology* **205**, 2305-2322.

**Jordan, A. D. and Steffensen, J. F.** (2007). Effects of ration size and hypoxia on specific dynamic action in the cod. *Physiological and Biochemical Zoology* **80**, 178-185.

**Jouzel, J. and Debroise, A.** (2004). *Le climat : jeu dangereux - Dernières nouvelles de la planète*. Quai des Sciences: Dunod.

**-K-**

**Kohin, S., Stary, C. M., Howlett, R. A. and Hogan, M. C.** (2001). Preconditioning improves function and recovery of single muscle fibers during severe hypoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **281**, C142-C146.

**Kolkovski, S., Arieli, A. and Tandler, A.** (1997). Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquaculture International* **5**, 527-536.

**Kooijman, S. A. L. M.** (2000). *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*, Second Edition: Cambridge University Press.

**Kramer, D. L.** (1987). Dissolved-oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes* **18**, 81-92.

**Krieg, A. J., Rankin, E. B., Chan, D., Razorenova, O., Fernandez, S. and Giaccia, A. J.** (2010). Regulation of the Histone Demethylase JMJD1A by Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha Enhances Hypoxic Gene Expression and Tumor Growth. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 344-353.

**-L-**

**Lai, J. C. C., Kakuta, I., Mok, H. O. L., Rummer, J. L. and Randall, D.** (2006). Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2734-2738.

**Lakani, F. B., Sattari, M. and Falahatkar, B.** (2013). Effect of different oxygen levels on growth performance, stress response and oxygen consumption in two weight groups of great sturgeon *Huso huso*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **12**, 533-549.

**Lapointe, D., Guderley, H. and Dutil, J. D.** (2006). Changes in the condition factor have an impact on metabolic rate and swimming performance relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Physiological and Biochemical Zoology* **79**, 109-119.

**Lapointe, D., Vogelbein, W. K., Fabrizio, M. C., Gauthier, D. T. and Brill, R. W.** (2014). Temperature, hypoxia, and mycobacteriosis: effects on adult striped bass *Morone saxatilis* metabolic performance. *Diseases of Aquatic Organisms* **108**, 113-127.

**Le Foll, C., Corporeau, C., Le Guen, V., Gouygou, J. P., Berge, J. P. and Delarue, J.** (2007). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **292**, E1223-E1230.

**Le Moullac, G., Bacca, H., Huvet, A., Moal, J., Pouvreau, S. and Van Wormhoudt, A.** (2007). Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology* **307A**, 371-382.

**Le Pape, O., Chauvet, F., Mahevas, S., Lazure, P., Guerault, D. and Desaunay, Y.** (2003). Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *Journal of Sea Research* **50**, 139-149.

**Le Roy Ladurie, E.** (2009). *Le réchauffement de 1860 à nos jours*: Fayard.

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

**Lefrancois, C. and Domenici, P.** (2006). Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., exposed to hypoxia. *Marine Biology* **149**, 969-977.

**Levin, L. A., Ekau, W., Gooday, A. J., Jorissen, F., Middelburg, J. J., Naqvi, S. W. A., Neira, C., Rabalais, N. N. and Zhang, J.** (2009). Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos. *Biogeosciences* **6**, 2063-2098.

**Lindström, J.** (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 343-348.

**Lorenzen, K. and Enberg, K.** (2002). Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation of fish populations: evidence from among-population comparisons. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **269**, 49-54.

**Lu, G. W., Yu, S., Li, R. H., Cui, X. Y. and Gao, C. Y.** (2005). Hypoxic preconditioning - A novel intrinsic cytoprotective strategy. *Molecular Neurobiology* **31**, 255-271.

**Lucas, A.** (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposia* **156**, 38-55.

**Lucas, A.** (1998). Programming by early nutrition: An experimental approach. *Journal of Nutrition* **128**, 401S-406S.

**Lucassen, M., Schmidt, A., Eckerle, L. G. and Portner, H. O.** (2003). Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **285**, R1410-R1420.

**Lund, I., Steinfeldt, S. J., Herrmann, B. and Pedersen, P. B.** (2013). Feed intake as explanation for density related growth differences of common sole *Solea solea*. *Aquaculture Research* **44**, 367-377.

**-M-**

**Maroux, S. and Louvard, D.** (1975). The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Digestion* **13**, 180-180.

**Marti, H. H., Jung, H. H., Pfeilschifter, J. and Bauer, C.** (1994). Hypoxia and Cobalt stimulate Lactate-Dehydrogenase (LDH) Activity in vascular smooth-muscle cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **429**, 216-222.

**Mas-Munoz, J., Komen, H., Schneider, O., Visch, S. W. and Schrama, J. W.** (2011). Feeding Behaviour, Swimming Activity and Boldness Explain Variation in Feed Intake and Growth of Sole (*Solea solea*) Reared in Captivity. *Plos One* **6**, 9.

**Massa, F., Delorme, C., Bagliniere, J. L., Prunet, P. and Grimaldi, C.** (1999). Early life development of brown trout (*Salmo trutta*) eggs under temporary or continuous hypoxial stress : Effects on the gills, yolk sac resorption and morphometric parameters. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 421-440.

- Mathers, E. M., Houlihan, D. F. and Cunningham, M. J.** (1992). Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish. *Marine Biology* **112**, 363-369.
- Matozel, M. N.** (2009). Effects of Hypoxia on Development of the Digestive System and Metabolism in Zebrafish (*Danio rerio*), pp. 57.
- Mazurais, D., Darias, M., Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. L.** (2011). Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **89**, 599-611.
- McClain, D. A., Abuelgasim, K. A., Nourai, M., Salomon-Andonie, J., Niu, X. M., Miasnikova, G., Polyakova, L. A., Sergueeva, A., Okhotin, D. J., Cherqaoui, R. et al.** (2013). Decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin levels in patients with Chuvash polycythemia: a role for HIF in glucose metabolism. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **91**, 59-67.
- McKenzie, D. J., Lund, I. and Pedersen, P. B.** (2008). Essential fatty acids influence metabolic rate and tolerance of hypoxia in Dover sole (*Solea solea*) larvae and juveniles. *Marine Biology* **154**, 1041-1051.
- McNatt, R. A. and Rice, J. A.** (2004). Hypoxia-induced growth rate reduction in two juvenile estuary-dependent fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**, 147-156.
- Metcalf, N. B. and Monaghan, P.** (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 254-260.
- Metcalf, N. B. and Monaghan, P.** (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology* **38**, 935-940.
- Middelburg, J. J. and Levin, L. A.** (2009). Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences* **6**, 1273-1293.
- Monaghan, P.** (2008). Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**, 1635-1645.
- Mulvey, J. M. and Renshaw, G. M. C.** (2000). Neuronal oxidative hypometabolism in the brainstem of the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) in response to hypoxic pre-conditioning. *Neuroscience Letters* **290**, 1-4.

---

**-N-**

**Nelson, J. S.** (2006). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

**Nicholson, J. A. and Kim, Y. S.** (1975). A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Analytical Biochemistry* **63**, 110-117.

**Nilsson, G. E. and Ostlund-Nilsson, S.** (2008). Does size matter for hypoxia tolerance in fish? *Biological Reviews* **83**, 173-189.

**-O-**

**O'Brien, K. M.** (2011). Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. *Journal of Experimental Biology* **214**, 275.

**Olson, K. R., Ghosh, T. K., Roy, P. K. and Munshi, J. S. D.** (1995). Microcirculation of gills and accessory respiratory organs of the walking catfish *Clarias batrachus*. *Anatomical Record* **242**, 383-399.

**Olsvik, P. A., Vikesa, V., Lie, K. K. and Hevroy, E. M.** (2013). Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *Bmc Genomics* **14**, 21.

**Ozernyuk, N. D.** (2011). Adaptive specific features of energy metabolism in fish ontogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology* **42**, 201-205.

**-P-**

**Padilla, P. A. and Roth, M. B.** (2001). Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7331-7335.

**Palazzi, R., Richard, J., Bozzato, G. and Zanella, L.** (2006). Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture* **255**, 495-506.

**Pelster, B.** (2002). Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **133**, 547-553.

**Perera, F. and Herbstman, J.** (2011). Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reproductive Toxicology* **31**, 363-373.

**Perez-Dominguez, R. and Holt, G. J.** (2006). Interrenal and thyroid development in red drum (*Sciaenops ocellatus*): Effects of nursery environment on larval growth and cortisol concentration during settlement. *General and Comparative Endocrinology* **146**, 108-118.

**Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landazuri, M. and Del Peso, L.** (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (*egl3/phd3*) gene. *Biochemical Journal* **390**, 189-197.

**Pfeiler, E.** (2001). Changes in hypoxia tolerance during metamorphosis of bonefish leptocephali. *Journal of Fish Biology* **59**, 1677-1681.

**Piccinetti, C. C., Ricci, L. A., Tokle, N., Radaelli, G., Pascoli, F., Cossignani, L., Palermo, F., Mosconi, G., Nozzi, V., Raccanello, F. et al.** (2012). Malnutrition may affect common sole (*Solea solea* L.) growth, pigmentation and stress response: Molecular, biochemical and histological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **161**, 361-371.

**Pichavant, K., Maxime, V., Soulier, P., Boeuf, G. and Nonnotte, G.** (2003). A comparative study of blood oxygen transport in turbot and sea bass: effect of chronic hypoxia. *Journal of Fish Biology* **62**, 928-937.

**Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N., Severe, A., Le Roux, A. and 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.

**Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N., Severe, A., Le Roux, A., Quemener, L., Maxime, V., Nonnotte, G. and Boeuf, G.** (2000). Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture* **188**, 103-114.

**Pickett, G. D. and Pawson, M. G.** (1994). *Sea Bass: Biology, Exploitation and Conservation*. Chapman & Hall: Fish and Fisheries, Series 12.

**Pihl, L., Baden, S. P. and Diaz, R. J.** (1991). Effects of periodic hypoxia on distribution of demersal fish and crustaceans. *Marine Biology* **108**, 349-360.

**Pihl, L., Baden, S. P., Diaz, R. J. and Schaffner, L. C.** (1992). Hypoxia-induced structural changes in the diet of bottom-feeding fish and crustacea. *Marine Biology* **112**, 349-361.

**Péres, A., Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., LeGall, M. M. and Quazuguel, P.** (1996). Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein

depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 237-242.

-R-

**R Core Team.** (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: URL : <http://www.R-project.org/>.

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

**Ravelli, A. C. J., van der Meulen, J. H. P., Michels, R. P. J., Osmond, C., Barker, D. J. P., Hales, C. N. and Bleker, O. P.** (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**, 173-177.

**Rees, B. B., Targett, T. E., Ciotti, B. J., Tolman, C. A., Akkina, S. S. and Gallaty, A. M.** (2012). Temporal dynamics in growth and white skeletal muscle composition of the mummichog *Fundulus heteroclitus* during chronic hypoxia and hyperoxia. *Journal of Fish Biology* **81**, 148-164.

**Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Dinis, M. T.** (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* **179**, 465-473.

**Richards, J. G.** (2009). Chapter 10 : Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia. In *Fish Physiology*, Vol. 27 : Hypoxia, eds. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 443-485: Academic Press.

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

**Richards, J. G., Farrell, A. P. and Brauner, C. J.** (2009). *Fish Physiology*, Vol. 27: Hypoxia: Academic Press, Amsterdam : Elsevier.

**Rousseau, K. and Dufour, S.** (2012). Chapter 1 : Introduction to Fish First and Secondary Metamorphoses. In *Metamorphosis in Fish*, eds. S. Dufour K. Rousseau and B. G. Kapoor), pp. 1-11: Science Publishers.

**Roussel, J. M.** (2007). Carry-over effects in brown trout (*Salmo trutta*): hypoxia on embryos impairs predator avoidance by alevins in experimental channels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **64**, 786-792.

**Roze, T., Christen, F., Amerand, A. and Claireaux, G.** (2013). Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. *Journal of Thermal Biology* **38**, 98-106.

-5-

**Saint-Paul, U.** (1984). Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. *Environmental Biology of Fishes* **11**, 53-62.

**Sanchez, R. C., Obregon, E. B. and Rauco, M. R.** (2011). Vertebral Column Deformity and Hypoxia in *Salmo salar*. *International Journal of Morphology* **29**, 1291-1295.

**Saravanan, S., Geurden, I., Figueiredo-Silva, A. C., Nusantoro, S., Kaushik, S., Verreth, J. and Schrama, J. W.** (2013). Oxygen Consumption Constrains Food Intake in Fish Fed Diets Varying in Essential Amino Acid Composition. *Plos One* **8**, 7.

**Schurmann, H., Claireaux, G. and Chartois, H.** (1998). Changes in vertical distribution of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during a hypoxic episode. *Hydrobiologia* **372**, 207-213.

**Seidl, M. D., Paul, R. J. and Pirow, R.** (2005). Effects of hypoxia acclimation on morpho-physiological traits over three generations of *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology* **208**, 2165-2175.

**Semenza, G. L.** (2011). Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1813**, 1263-1268.

**Sfakianakis, D. G., Papadakis, I. E., Papadaki, M., Sigelaki, I. and Mylonas, C. C.** (2013). Influence of rearing temperature during early life on sex differentiation, haemal lordosis and subsequent growth during the whole production cycle in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **412**, 179-185.

**Shang, E. H. H. and Wu, R. S. S.** (2004). Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental Science & Technology* **38**, 4763-4767.

**Shang, E. H. H., Yu, R. M. K. and Wu, R. S. S.** (2006). Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* **40**, 3118-3122.

**Shimps, E. L., Rice, J. A. and Osborne, J. A.** (2005). Hypoxia tolerance in two juvenile estuary-dependent fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **325**, 146-162.

**Smith, V. H., Tilman, G. D. and Nekola, J. C.** (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* **100**, 179-196.

**Stierhoff, K. L., Targett, T. E. and Miller, K.** (2006). Ecophysiological responses of juvenile summer and winter flounder to hypoxia: experimental and modeling analyses of effects on estuarine nursery quality. *Marine Ecology Progress Series* **325**, 255-266.

**Stierhoff, K. L., Tyler, R. M. and Targett, T. E.** (2009). Hypoxia tolerance of juvenile weakfish (*Cynoscion regalis*): Laboratory assessment of growth and behavioral avoidance responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **381**, S173-S179.

-T-

**Tabeaud, M.** (2008). *La climatologie générale*. Armand Colin.

**Terova, G., Rimoldi, S., Brambilla, F., Gornati, R., Bernardini, G. and Saroglia, M.** (2009). In vivo regulation of GLUT2 mRNA in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to acute and chronic hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **152**, 306-316.

**Terova, G., Rimoldi, S., Cora, S., Bernardini, G., Gornati, R. and Saroglia, M.** (2008). Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 alpha mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **279**, 150-159.

**Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K. D., Inselmann, S. and Rosenthal, H.** (1999). Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture* **174**, 355-367.

**Thompson, D. B.** (1999). Genotype-environment interaction and the ontogeny of diet-induced phenotypic plasticity in size and shape of *Melanoplus femurrubrum* (Orthoptera : Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 38-48.

**Tsikliras, A. C., Antonopoulou, E. and Stergiou, K. I.** (2007). A phenotypic trade-off between previous growth and present fecundity in round sardinella *Sardinella aurita*. *Population Ecology* **49**, 221-227.

## -V-

**Vagner, M., Infante, U. Z., Robin, J. H. and Person-Le Ruyet, J.** (2007a). Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? *Aquaculture* **267**, 165-174.

**Vagner, M., Robin, J. H., Infante, J. L. Z. and Person-Le Ruyet, J.** (2007b). Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* **266**, 179-190.

**Vasconcelos, R. P., Reis-Santos, P., Tanner, S., Maia, A., Latkoczy, C., Gunther, D., Costa, M. J. and Cabral, H.** (2008). Evidence of estuarine nursery origin of five coastal fish species along the Portuguese coast through otolith elemental fingerprints. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **79**, 317-327.

**Vavilala, D. T., Ponnaluri, V. K. C., Vadlapatla, R. K., Pal, D., Mitra, A. K. and Mukherji, M.** (2012). Honokiol inhibits HIF pathway and hypoxia-induced expression of histone lysine demethylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **422**, 369-374.

**Viltart, O. and Vanbesien-Mailliot, C. C. A.** (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *Thescientificworldjournal* **7**, 1493-1537.

**Vinberg, G. G.** (1971). Methods for the estimation of production of aquatic animals. 175.

## -W-

**Wang, T., Lefevre, S., Thanh Huong, D. T., Cong, N. v. and Bayley, M.** (2009). Chapter 8 : The Effects of Hypoxia On Growth and Digestion. In *Fish Physiology*, Vol. 27 : Hypoxia, eds. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 361-396: Academic Press.

**Waterland, R. A. and Garza, C.** (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 179-197.

**Waterland, R. A. and Jirtle, R. L.** (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* **20**, 63-68.

**Wei, L. Z., Zhang, X. M., Li, J. and Huang, G. Q.** (2008). Compensatory growth of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* following hypoxic exposure. *Aquaculture International* **16**, 455-470.

**Weiss, R.** (1970). The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, vol. 17, pp. 721-735: Elsevier.

**Wellmann, S., Bettkober, M., Zelmer, A., Seeger, K., Faigle, M., Eltzhig, H. K. and Buhner, C.** (2008). Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJDIA via HIF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **372**, 892-897.

**Wexler, J. B., Margulies, D. and Scholey, V. P.** (2011). Temperature and dissolved oxygen requirements for survival of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **404**, 63-72.

**Winemiller, K. O.** (1989). Development of dermal lip protuberances for aquatic surface respiration in South American characid fishes. *Copeia*, 382-390.

**Woo, N. Y. S. and Wu, R. S. S.** (1984). Changes in biochemical composition in the red grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel), and the black sea bream, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky), during hypoxic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* **77**, 475-482.

**Wood, S. C. and Johansen, K.** (1972). Adaptation to hypoxia by increased HbO<sub>2</sub> affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature* **237**, 278-279.

**Wu, R., Shang, E. and Zhou, B. S.** (2006). Endocrine disrupting and teratogenic effects of hypoxia on fish, and their ecological implications. In *International Symposium Chongqing, China October 12-14, 2004*, pp. 75.

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

**Wu, R. S. S.** (2009). Chapter 3 : Effects of Hypoxia on Fish Reproduction and Development. In *Fish Physiology, Vol. 27 : Hypoxia*, eds. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 79-141: Academic Press.

-Y-

**Yamanaka, H., Takahara, T., Kohmatsu, Y. and Yuma, M.** (2013). Body size and temperature dependence of routine metabolic rate and critical oxygen concentration in larvae

and juveniles of the round crucian carp *Carassius auratus grandoculis* Temminck & Schlegel 1846. *Journal of Applied Ichthyology* **29**, 891-895.

**Yang, H., Cao, Z. D. and Fu, S. J.** (2013). The effects of diel-cycling hypoxia acclimation on the hypoxia tolerance, swimming capacity and growth performance of southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **165**, 131-138.

**Youson, J. H.** (1988). Chapter 2 : First Metamorphosis. In *Fish Physiology*, Vol. 11 : The Physiology of Developing Fish, Part B : Viviparity and Posthatching Juveniles, eds. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 135-196: Academic Press.

**-Z-**

**Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. L.** (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **130**, 477-487.

**Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. L. and Peres, A.** (1997). Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* **127**, 608-614.

**Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. L., Peres, A., Quazuguel, P. and Le Gall, M. M.** (1996). Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* **139**, 129-138.

**Zambonino-Infante, J. L., Claireaux, G., Ernande, B., Jolivet, A., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C. and Mazurais, D.** (2013). Hypoxia tolerance of common sole juveniles depends on dietary regime and temperature at the larval stage: evidence for environmental conditioning. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **280**, 9.

**Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A. J., Levin, L., Naqvi, S. W. A., Middelburg, J. J., Scranton, M., Ekau, W., Pena, A., Dewitte, B. et al.** (2010). Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences* **7**, 1443-1467.

---

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

---



**-A-**

<i>acaca</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha
ABO	Air-Breathing Organs = Organes de Respiration Aérienne
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc = cDNA	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AMR	Active Metabolic Rate = Taux métabolique actif
AMS	Aerobic Metabolic Scope = Registre métabolique aérobie
AP	Alcaline Phosphatase = Alkaline Phosphatase
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARO	Accessory Respiratory Organs = Organes Respiratoires Accessoires
ASR	Aquatic Surface Respiration = Respiration Aquatique de Surface
ATP	Adénosine TriPhosphate

**-C-**

C	Control group = groupe Témoin ou Contrôle
COX	Cytochrome c OXydase
CS	Citrate Synthase
Ct	Cycle threshold

**-D-**

DEB	Dynamic Energy Budget = Flux Energétiques
DTNB	5,5' DiThiobis 2 NitroBenzoic acid
d.p.h.	Days Post-Hatching

**-E-**

E	Efficacité de la PCR
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	Elongation Factor 1
<i>eglN</i>	Egg-Laying defective Nine <i>ou</i> Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELHT	Early Life Hypoxia Treatment group = groupe ayant subi l'hypoxie au stade larvaire
EPO	ErythroPOietin

**-F-**

FI	Feed Intake = Prise alimentaire
<b>-G-</b>	
GLUT	GLUcose Transporter
<b>-H-</b>	
H	Head = Tête
Hb	Hémoglobine
HCT	Hypoxic Challenge Test = Challenge hypoxique
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HT	Hypoxia Treatment group = groupe ayant subi l'hypoxie
<b>-I-</b>	
<i>igf-1</i>	Insulin-like growth factor-1
IS	Intestinal segment = Segment intestinal
<b>-K-</b>	
<i>kdm1b</i>	Lysine Histone Demethylase 1b
<b>-L-</b>	
<i>ldh</i>	Lactate DeHydrogenase
Leu-Ala	Leucine-Alanine Peptidase
<b>-M-</b>	
M	Muscle
MO <sub>2</sub>	Consommation en oxygène = Taux métabolique
<b>-N-</b>	
NFIR	Normalized Food Ingestion Rate
NI	Not Investigated = Non Étudié
N-LAP	Amino-peptidase-N
NS	No Significant differences = Pas de différences significatives
<b>-O-</b>	
O <sub>2</sub>	DiOxygène
<b>-P-</b>	
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	power of Hydrogen = potentiel Hydrogène
PIT	Passive Integrated Transponder = Transpondeur Passif Intégré
<i>pk</i>	Pyruvate Kinase

PS Pancreatic segment = Segment pancréatique

**-Q-**

qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction = PCR en temps réel

**-R-**

RBC Red Blood Cell = Globules Rouges (GR)

RMR Routine Metabolic Rate = Taux Métabolique de Routine

RT Reverse Transcription = Transcription inverse

**-S-**

s.d. Standard Deviation = Déviation Standard

s.e.m. Standard Error of Mean = Erreur Standard à la Moyenne

SMR Standard Metabolic Rate = Taux Métabolique Standard

**-T-**

T Tail = Queue

T50 Temps au bout duquel 50% de la population est éliminée d'un challenge

TCT Thermic Challenge Test = Challenge thermique

**-V-**

V Viscères

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor



---

## *GLOSSAIRE*

---



**-A-**

**Aérobic** = qui se produit en présence d'oxygène.

**Agnathes** = infra-embranchement regroupant tous les poissons dits « sans mâchoires ».

**Anabolisme** = ensemble des réactions de synthèse des métabolites essentiels à partir des éléments de base au travers de réductions endoénergétiques\*. Une des deux composantes du métabolisme\*.

**Anaérobic** = qui se produit en absence d'oxygène.

**Anoxie** = disparition totale de l'oxygène dans le milieu.

**-B-**

**Benthique** = se dit d'une espèce qui vit posée au sol ou qui se déplace en rasant le fond.

**-C-**

**Catabolisme** = ensemble des réactions de dégradations moléculaires effectuées au travers d'oxydations exoénergétiques\*. Une des deux composantes du métabolisme\*.

**Changement global** = réchauffement climatique naturel auquel s'ajoutent des perturbations d'origine anthropique, i.e. d'origine humaine.

**Chondrichthyens** = classe regroupant tous les poissons dits « cartilagineux ».

**Chromatine** = association de l'ADN et des protéines histones\*.

**-D-**

**Démersal** = se dit d'une espèce qui est très mobile mais qui reste au-dessus du fond pour y trouver sa nourriture.

**-E-**

**Endoénergétique = Endergonique** = se dit d'une réaction qui consomme de l'énergie.

**Epigénétique** = se dit de toutes les modifications héréditaires dans la fonction des gènes (méthylation\*, etc) sans altération de la séquence ADN. Ces modifications ne sont pas codées par la séquence d'ADN et modifient seulement l'accessibilité aux régulations géniques.

**Erythrocyte = Hématie\* = Globule Rouge** = cellule sanguine qui permet le transport de l'oxygène.

**Eutrophisation** = enrichissement des milieux naturels par apport d'éléments nutritifs nécessaires au développement de la communauté phytoplanctonique. Processus naturel nécessaire à la survie des écosystèmes.

**Exoénergétique = Exergonique** = se dit d'une réaction qui produit de l'énergie.

**-G-**

**Génotype** = ensemble des gènes d'un organisme, qu'ils soient exprimés ou non.

**Globine** = protéine entrant dans la composition de l'hémoglobine\*. Elle est constituée de quatre chaîne d'acides aminés qui se lient à l'hème\*.

**-H-**

**Hématocrite** = proportion totale du volume sanguin occupé par les érythrocytes\* = nombre d'érythrocytes.

**Hématie** = **Erythrocyte\*** = **Globule Rouge** = cellule sanguine qui permet le transport de l'oxygène.

**Hème** = **Porphyrine** = structure entrant dans la composition de l'hémoglobine\* et permettant le transport de l'oxygène lorsqu'elle possède un atome de fer. Cette structure est constituée de quatre noyaux pyrroles renfermant un atome de fer. Cet atome permet la fixation du dioxygène à l'hémoglobine\*.

**Hémoglobine** (Hb) = molécule servant au transport de l'oxygène et du gaz carbonique dans le sang et présente en grande concentration dans les érythrocytes\*. L'hémoglobine est constituée de quatre chaînes de globine\* et de quatre molécules d'hème\*.

**Histones** = protéines basiques s'associant à l'ADN. Les histones permettent le repliement de l'ADN pour former la chromatine\*.

**Hypoxémie** = réduction de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine.

**Hypoxie** = diminution de la concentration en oxygène dans le milieu par rapport à l'état de normoxie.

**-M-**

**Métabolisme** = bilan entre le catabolisme et l'anabolisme.

**Méthylation** = modification chimique réalisée par une enzyme qui ajoute un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>) sur un substrat. L'ADN peut être méthylé au niveau de ces cytosines mais aussi au niveau des histones\* qui l'entourent.

**-N-**

**Normoxie** = condition optimale en niveau d'oxygène dissout dans le milieu.

**-O-**

**Ontogenèse** = développement d'un organisme.

**Ostéichtyens** = super-classe regroupant tous les poissons dits « osseux ».

**Oxydation** = perte d'un ou plusieurs électrons par une molécule, parfois accompagnée d'une perte de protons ( $H^+$ ). S'oppose à la réduction\*.

**-P-**

**Pélagique** = se dit d'une espèce qui évolue librement dans la colonne d'eau, soit proche de la surface soit entre la surface et le fond.

**Phénotype** = ensemble des caractères observables d'un individu (morphologie, physiologie, expression de gènes,...). Le phénotype correspond à la réalisation du génotype\* associée aux effets de l'environnement.

**Porphyrine** = **Hème** = structure entrant dans la composition de l'hémoglobine\* et permettant le transport de l'oxygène lorsqu'elle possède un atome de fer. Cette structure est constituée de quatre noyaux pyrroles renfermant un atome de fer. Cet atome permet la fixation du dioxygène à l'hémoglobine\*.

**-R-**

**Réduction** = gain d'un ou plusieurs électrons par une molécule, parfois accompagné d'un gain de protons ( $H^+$ ). S'oppose à l'oxydation\*.

**Registre métabolique aérobie** = quantité d'énergie aérobie potentiellement disponible pour un organisme à un moment donné, dans un environnement précis et selon son état physiologique. Le registre métabolique aérobie correspond à la gamme de taux métabolique se répartissant entre le taux métabolique standard et le taux métabolique actif.

**-S-**

**Saturation** = mesure de l'oxygène dans le milieu en prenant pour référence la condition de normoxie\*. Elle est dépendante de la température et de la salinité du milieu considéré.

**-T-**

**Taux métabolique** = taux de consommation en énergie, sous la forme d'ATP, de l'organisme considéré.

**Taux métabolique actif** = taux métabolique caractérisant un animal en pleine activité.

**Taux métabolique de routine** = taux métabolique caractérisant un animal calme présentant des mouvements spontanés.

**Taux métabolique standard** = taux métabolique caractérisant un animal le moins actif possible.



## Title

---

Long-term consequences of early exposure to hypoxia on the physiology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and common sole (*Solea solea*).

## Abstract

---

The dissolved oxygen in seawater has steadily declined in many coastal marine ecosystems in the last 50 years because of global warming and increasing coastal human activities. This decrease in oxygen in seawater causes episodes of hypoxia increasingly frequent and severe in coastal and estuarine areas. Some organisms may escape these environmental constraints by migration or dispersion. Others, with limited swimming capabilities must implement physiological regulation (phenotypic plasticity) to enable them to adapt and survive. This is particularly the case of marine fish larvae that are likely to be present in coastal nursery at the end of their development. It is now well established that the regulations implemented by organisms to cope with their environment during the early stages of life can imprint their physiological function in the long-term and change their life trajectory. While much information on early conditioning is available in the field of medicine, knowledge of these effects in marine organisms in an ecological context are still very fragmentary.

Therefore, the main objective of this thesis was to evaluate the physiological consequences, not only in the short-term but especially in the long-term, of an exposition to a moderate hypoxia (8 days, 40% air saturation) of marine fish at the end of larval development. Another originality of this work was based on the comparison of adaptive responses implemented in two species, one pelagic — European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) — and one benthic — the common sole (*Solea solea*). Our results have allowed us to show a significant long-term effect of early hypoxic stress on the physiological performance of juvenile and especially their growth. Juveniles of European sea bass and juveniles of common sole have, respectively, lower and higher growth after being exposed to a hypoxic environment in the larval stage. The negative effect on growth observed in sea bass was due, in part, to lower energy assimilation as a consequence of an impact on the digestive function. Moreover, molecular analyzes in the liver of sea bass juveniles indicate an impregnation at the transcriptional level of the expression of genes involved in the response to hypoxia. The positive effect observed on the growth of sole juveniles is associated with better tolerance to thermal and hypoxic stress and a decrease in metabolic scope. The results obtained in European sea bass and common sole suggest that changes in energy allocations could explain the physiological performances observed in the long-term.

Globally, all the data obtained in this thesis underline the importance of the environmental parameters encountered by fish during their young life stages on their future physiological performances. Such physiological impregnation by the early environment is species-specific, revealing potential different adaptation strategies.

## Keywords

---

Hypoxia, Conditioning, Environmental programming, Marine fish, Climate change, Oxygen, *Dicentrarchus labrax*, *Solea solea*

## Titre

---

Conséquences à long-terme d'une exposition précoce à l'hypoxie sur la physiologie du bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*).

## Résumé

---

L'oxygène dissous dans l'eau de mer a régulièrement baissé dans de nombreux écosystèmes marins côtiers ces 50 dernières années du fait du réchauffement climatique et des activités humaines côtières croissantes. Cette diminution de l'oxygène présent dans l'eau de mer provoque des épisodes d'hypoxie de plus en plus fréquents et sévères dans les zones côtières et estuariennes. Certains organismes peuvent échapper à ces contraintes environnementales par migration ou dispersion. D'autres, présentant des capacités de nages plus réduites, doivent mettre en œuvre des régulations physiologiques (plasticité phénotypique) pour leur permettre de s'adapter et survivre. C'est notamment le cas des larves de poissons marins qui sont susceptibles d'être présentes dans les nurseries côtières à la fin de leur développement. Il est aujourd'hui bien établi que les régulations mises en œuvre par les organismes pour faire face à leur environnement durant les jeunes stades de vie peuvent imprégner leur fonctionnement physiologique sur le long-terme et modifier leur trajectoire de vie. Si de nombreuses informations relatives aux conditionnements précoces sont disponibles dans le domaine médical, les connaissances de ces effets chez les organismes marins dans un contexte écologique sont encore très fragmentaires.

L'objectif principal de ce travail de thèse a donc été d'évaluer les conséquences physiologiques, non seulement à court-terme mais surtout à long-terme, d'une exposition de poissons marins en fin de développement larvaire à une hypoxie modérée (8 jours, 40% de saturation à l'air). L'autre originalité de ce travail reposait sur la comparaison des réponses adaptatives mises en œuvre chez deux espèces, l'une pélagique — le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) — et l'autre benthique — la sole commune (*Solea solea*). Nos résultats nous ont permis de montrer un effet significatif à long-terme de la contrainte hypoxique précoce sur les performances physiologiques des juvéniles et notamment sur leur croissance. Les juvéniles de bars et de soles présentent respectivement de plus faibles et de plus fortes croissances après avoir été exposés à un environnement hypoxique au stade larvaire. L'effet négatif sur la croissance observé chez le bar s'explique, au moins en partie, par une moins bonne assimilation énergétique due à un impact sur la fonction digestive. Les analyses moléculaires réalisées au niveau hépatique chez le juvénile de bar révèlent, par ailleurs, une imprégnation au niveau transcriptionnel de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie. L'effet positif observé sur la croissance des juvéniles de sole est associé à une meilleure tolérance aux stress thermiques et hypoxiques et à une diminution du registre métabolique. Les résultats obtenus chez le bar et la sole suggèrent que des modifications d'allocations énergétiques sous-tendent les effets observés à long-terme sur les performances physiologiques.

Plus globalement, l'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse soutiennent l'importance que revêt la nature de l'environnement rencontré par le poisson au cours de ses jeunes stades de vie sur ses futures performances physiologiques. Nos résultats indiquent par ailleurs que l'imprégnation physiologique par l'environnement est espèce-spécifique révélant des probables stratégies d'adaptation différentes suivant les espèces.

## Mots clés

---

Hypoxie, Conditionnement, Programmation environnementale, Poissons marins, Changement climatique, Oxygène, *Dicentrarchus labrax*, *Solea solea*