



Vulnérabilité de populations de poissons (Platichthys flesus) face aux multi-stress en estuaires : une approche intégrative

Elodie Borcier

► To cite this version:

Elodie Borcier. Vulnérabilité de populations de poissons (Platichthys flesus) face aux multi-stress en estuaires : une approche intégrative. Autre [q-bio.OT]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0020 . tel-02928183

HAL Id: tel-02928183

<https://theses.hal.science/tel-02928183>

Submitted on 2 Sep 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialité : *Biologie Marine*

Par

Elodie BORCIER

Vulnérabilité de populations de poisson (*Platichthys flesus*), face aux multi-stress en estuaires : une approche intégrative.

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 6 mars 2019
Unité de recherche : UMR 6539

Rapporteurs avant soutenance :

Didier AURELLE
Maître de Conférences, HDR
Université Aix-Marseille

Patrice GONZALEZ
Chargé de recherche CNRS, HDR
Université de Bordeaux

Composition du Jury :

Clothilde HEUDE BERTHELIN
Maître de Conférences – HDR – Université de Caen-Normandie

Didier AURELLE
Maître de Conférences - HDR - Université Aix-Marseille

Patrice GONZALEZ
Chargé de recherche CNRS - HDR - Université de Bordeaux

Frédéric SILVESTRE
Professeur – Université de Namur – Président du Jury

Vianney PICHEREAU
Professeur – Université de Bretagne Occidentale

Jean LAROCHE
Professeur - Université de Bretagne Occidentale – Directeur de thèse

Grégory CHARRIER
Maître de Conférences – Université de Bretagne Occidentale

Université de Bretagne Occidentale
Institut Universitaire et Européen de la Mer
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

Vulnérabilité de populations de poisson (*Platichthys flesus*) face aux multistress en estuaires : une approche intégrative

Par Elodie BORCIER

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (PhD)
en biologie marine

Membres du Jury

Clothilde Heude Berthelin – MC - HDR - Université de Caen-Normandie	Examinatrice
Didier Aurelle MC - HDR - Université Aix-Marseille	Rapporteur
Patrice Gonzalez CR CNRS - HDR - Université de Bordeaux	Rapporteur
Frédéric Silvestre Pr - Université de Namur	Examineur
Vianney Pichereau Pr – Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Grégory Charrier - MC – Université de Bretagne Occidentale	Invité
Jean Laroche Pr – Université de Bretagne Occidentale	Directeur de thèse

Les contributions financières de la Région Bretagne, du Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval pour le projet HQFISH et l'Agence Française pour la Biodiversité pour le projet POPEST ont permis la réalisation de ce travail.



**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**

ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



« On ne va jamais aussi loin que lorsqu'on ne sait pas où l'on va. »

Christophe Colomb



© Elodie Borcier, Embouchure de l'estuaire de Seine

REMERCIEMENTS ILLUSTRÉS

Côté pro

Je souhaite remercier en premier lieu mes directeurs de thèse **Grégory Charrier** et **Jean Laroche**. Fraîchement diplômée de mon master 2, ils m'ont donné la chance de réaliser une année de césure dans l'équipe. Après cette expérience, ils m'ont fait confiance pour réaliser cette thèse. Semé d'embûches, le chemin fût plutôt sinueux mais restait praticable, grâce à votre capacité à rester positif et à croire en ce projet. Vous m'avez appris les qualités essentielles pour réaliser ce travail, l'esprit d'équipe, le positivisme et la pugnacité.

Tout baigne



© Margaux Motin

Je remercie tous les membres du jury (**Clothilde Heude**, **Didier Aurelle**, **Patrice Gonzalez**, **Frédéric Sylvestre**, **Vianney Pichereau**) pour l'intérêt que vous portez à mon sujet de recherche et pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie **Hélène Hégaret** et **Romain Morvezen** qui furent mes maîtres de stage de master 2. Super stage qui m'a ouvert les portes d'accès à cette thèse.

Je remercie **Adeline Bidault**, **Morgan Perennou**, **Nelly Le Goïc** et **Christophe Lambert** qui ont toujours été disponibles quels que soient la saison, le jour, ou l'heure à laquelle je vous dérangeais. Que ce soit pour une commande d'azote *in extremis*, pour une formation express en qPCR ou cyto en flux ou encore une autoclave à faire tourner vous étiez là. Merci pour ça, votre savoir et savoir-faire.

Je remercie grandement **Jessy Le Du** qui s'est tant bien que mal toujours débrouillé pour se rendre disponible et venir au labo me coacher, répondre à mes interminables mails et pour en fin de compte me former aux manips d'activité enzymatique (et j'en ai bavé). Dans le même topo, je remercie **Aline Amérand et son équipe**, pour m'avoir si gentiment accueillie et m'avoir donnée tous les conseils nécessaires pour le bon fonctionnement de mes protos. #CCOquandtunoustiens. Dans le même contexte (vive les activités enzymatiques !) je souhaite vivement remercier **Patrice Couture** et **Charles Gauthier** pour avoir répondu à mes mails durant votre dur hiver Canadien et m'avoir assistée avec succès ! Merci aussi à Patrice d'avoir été présent pour mon jury externe ainsi qu'à **Sophie Launay**.

Je souhaite aussi remercier grandement l'équipe lipido qui a su s'organiser pour passer mes échantillons ! Merci à **Fabienne Le Grand** et **Philippe Soudant** qui ont toujours été disponibles et m'ont avisée de leurs précieux conseils. Merci aussi à **Antoine Bideau** qui m'a remplacé pour faire les manips !

Je remercie **Vianney Pichereau** et **Sébastien Artigaud** pour vos conseils avisés en protéomique, votre pédagogie et votre aide inconditionnelle en cette dernière ligne droite. Aussi, je remercie **Jean Armengaud et son équipe** pour avoir obtenu toutes les données protéomiques avec une efficacité redoutable.

Merci à **Rachid Amara et toute son équipe** pour avoir réalisé le travail de terrain avec nous, pour avoir organisé les campagnes et pour avoir fait la popotte dans la joie et la bonne humeur pendant

nos semaines d'hébergement communes. Merci pour votre accueil et pour la réalisation du projet HQFISH.

Je remercie aussi l'équipe de **Jérôme Cachot (Florane Le Bihanic/ Bénédicte Morin /Christelle Clérandeau)** que nous avons rencontrée durant la manip prélèvements et dissections de flets, ce fut rapide, efficace et très sympa de partager les moments pêches à pied ou visite Normande (quand les pêches n'étaient pas au goût du jour) !

Un grand merci à **Jérôme Couteau et son équipe** pour nous avoir plus d'une fois dépanné les moyens humains et matériel. Merci pour votre réactivité, votre efficacité à toute épreuve, votre générosité et votre accueil.

Je remercie toute l'équipe du secrétariat qui assure toutes les étapes (nombreuses) et obligatoires de la paperasserie administrative ! Merci à **Elisabeth Bondu et Elodie Benon** qui m'ont toujours aidée dans les démarches particulières. Merci à **Geneviève Cohat et Anne-Sophie Podeur** pour votre bonne humeur légendaire et contagieuse et pour votre réactivité ! Et merci à toute l'équipe qui contribue au bon fonctionnement des équipes et de l'IUEM.

Merci à **Sébastien Hervé** qui m'a sacrément aidé grâce à sa formation en début de thèse et à son savoir-faire ! Merci aussi pour les bonnes odeurs de repas partagées en salle convivialité, qui font voyager le temps d'une pause déjeuner.

Je souhaite remercier aussi l'équipe de plongeurs du laboratoire, **Isabelle Bihannic, Thierry Le Bec, et Erwan Amice**, avec qui ça a été un réel plaisir de partager les sorties terrain, mais aussi le logis, couverts et discussions !

Je remercie la vingtaine de thésards qui m'ont précédée et ont étudié les populations de flet. A force de vous lire et d'enquêter dans vos anciens cahiers de labo, je peux dire que je vous connais, d'une certaine façon, à travers vos écrits. En « débroussaillant » le sujet, vous m'avez ouvert les champs des possibles (**Justine Marchand, Isabelle Calves, Célie Dupuy, Estérine Evrard, Edouard Lavergne, Nicolas Pédrón** et bien d'autres...)

Merci à **Manon Coheleach, Jennifer Laurent et Noé Barthélémy**, pour avoir réalisé vos stages dans notre équipe. Merci pour le travail fourni, votre implication, votre bonne humeur et votre sérieux. Merci de m'avoir aidé dans mon travail. Je remercie **Mickaël Péron**, que je n'ai pas pu encadrer, mais qui a avancé mes manips !

Merci aux membres de mon comité de thèse interne pour avoir partagé leur expérience, avis et conseils (**Fabienne Le Grand et Marc Suquet**)

Merci aux « vieux » thésards déjà partis avec qui on a refait le monde mille fois sans que ça ne change jamais rien, si ce n'est notre vision d'esprit. Merci pour les fous rires, votre soutien et les pauses café/clopes, qui malgré les effets néfastes sur les poumons, donnent toujours une grande bouffée d'air (**Floriane Boullot, Adèle Aschenboich, Margot Provost, Gaëlle Richard, Laura Coquereau, Bruno Dubief, Yanouk Epelboint, Fabien Riera, Nolwenn Quillien**).

Merci à la « nouvelle » flopée de thésards dont je fais partie (#crus2015/2016représentent) pour leur solidarité absolue, leur bienveillance et leurs mots doux. Merci à vous, pour les bêtises que vous faites, les conneries que vous dites, et les valeurs que vous possédez. Merci pour votre implication au boulot et votre passion pour la mer, incommensurable. Surtout, gardez votre fraîcheur pour l'après. Merci à **William Handal** pour tes questionnements bien placés, qui font mal (« euhhh là je ne m'étais même

pas posée la question... ») mais parfois tellement décalés (« mais il est perché ou c'est moi ? »). Merci à **Margot Mathieu-Eguser** pour ses coups de gueule mythiques et qui font du bien. Merci à **Justine Castrec** pour son esprit complètement déluré et sa bonne humeur à toute épreuve. Merci à **Aurélien Boyer**, pour son extrême gentillesse et sa sagesse toujours mesurée. Merci à tout ceux qui ont ponctuellement squattés le bureau des intermittents de la recherche (ils se reconnaîtront) pour avoir partagé de bons moments au sein de notre bureaucratie.

Merci à tous ceux qui ont mangé en salle de convivialité pour les débats, plaidoirie et multiples délires qui font qu'on est content de travailler dans ce labo. Ce qui revient à dire merci au bureau des thésards de l'étage du dessous qui ont embaumé notre bureau de joie de vivre (**Valentin Foulon, Kévin Tallec, Marc Long, Gaël Croizier** et j'en passe).

Merci à tous ceux que j'ai croisé dans le couloir, aux regards bienveillants remplis de soutien. Merci à vous pour m'avoir soutenue au-delà des mots, pour m'avoir encouragée et pour m'avoir acceptée sans jugement lorsque j'attendais un heureux événement.



© Margaux Motin

Côté perso

Je tiens à remercier les membres de ma famille qui m'ont soutenue inconditionnellement, et/ou portée, même sans le savoir, dans ce projet. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans les longues discussions tenues avec **mes grands-mères**, dans lesquelles j'ai compris qu'elles regrettaient de ne pas être « éduquées ». Merci à elles pour m'avoir conseillée de poursuivre mes études.

Merci à **Chris** avec qui j'ai goûté à la saveur de la liberté et celle des lois élémentaires (gravité et flottabilité). Avec toi j'ai appris à apprendre et à prendre des risques.

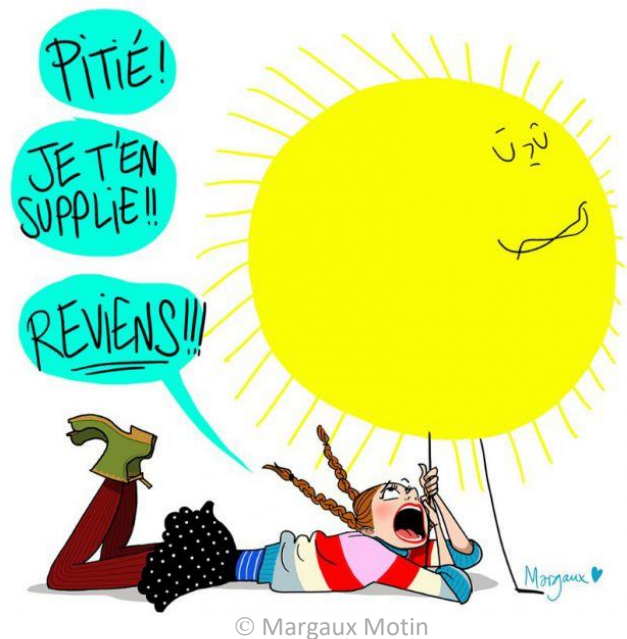
Merci à **Maman**, qui m'a appris le goût de l'écriture, l'amour de la nature et la persévérance pour les choses que j'aime et qui me tiennent à cœur.

Merci à **Papa** pour son secours et sa bienfaisance. Merci à lui pour ses questionnements perspicaces, sa transparence à toutes épreuves, son 6^{ème} sens d'enquêteur, pour le nombre de kilomètres parcourus ensemble. Merci à vous deux, pour m'avoir appris à foncer, à ne jamais baisser les bras et à croire que tout est possible ! Merci !

Un grand merci à **Cindy**, ma soeur pour son sens protecteur et son rôle de guide. Sans elle rien n'aurait été faisable. Ce jour-là, adossées aux chaises longues de la terrasse sous une chaleur étincelante, sa phrase a changé toute ma vie « Fais ce que tu aimes, poses toi pas de questions ! ». Ainsi, j'ai repris mes études à zéro pour commencer une longue épopée me menant à la réalisation de ce présent manuscrit. Merci à elle !

Merci à vous **François** et **Marylène**, sans vous, ce manuscrit n'aurait pas non plus vu le jour. Nous pouvons compter sur vous, votre disponibilité paraît infaillible. Votre accueil est toujours très chaleureux, et que dire de cette délicieuse Tajine remonteuse de moral !!! Merci !

Je remercie **Céd**, pour qui j'ai installé mes valises en terre inconnue. Depuis notre rencontre, je rêve de me crever le cœur avec cette pointe Finistérienne, pour en finir avec cette grisaille et cette humidité ambiante. Aujourd'hui, je me résous à faire une croix sur ma dose minimale de vitamine D. Mais je compte bien la récupérer d'ici peu, quand nous partirons en vacances sous les tropiques ! Isn't it ? De tout mon cœur, je le remercie pour les projets les plus fous que nous avons réalisés ensemble, tout en maintenant le cap dans nos vies pro. Je le remercie pour sa présence tout au long de cette période de thèse que l'on peut qualifier de montagnes russes, alternant entre doute-amusements-peurs-révélation.



Merci à toi, petit être lumineux, pleine d'énergie et d'amour, tu as rencontré mon chemin durant cette thèse, et tu m'apporte beaucoup, à chaque instant. En 12 mois, j'ai appris plus qu'en 30 ans, sur mes valeurs, mes envies, ma relation au monde, en clair sur ma vie. Merci à toi **Jade**, pour toute la richesse intérieure que tu m'as faite gagner et pour tout ce que tu continueras à faire germer... Notre vie, sera pleine de découvertes !

Merci à **tous mes amis** ! Merci à ceux qui m'ont accompagnée sans bien comprendre de quoi il en retournait : cette quoi ? cette thèse ? ce contrat de trois ans ? ce CDD avant de te faire foutre dehors ??? Mais tu y fais quoi et pourquoi ? (Merci à **Elo et ses filles, Elisa & Adèle**, les gardeuses de Poupette quand c'est l'ultra-rush, et **Noéline**, la cous' adorée, merci à **Mr Cook & Pr Aline**). T'es une écolo quoi ! (Merci à **Mat & Nanard**). Merci à l'**ex & new team du O'Porsmeur** ainsi qu'**aux îliens** pour toutes les soirées mémorables passées à vos côtés (la liste serait trop longue, ils se reconnaîtront!). Spécial cace'dédi à **FanFan & NoNo**, merci pour votre amabilité extraordinaire ! Merci à tous ceux qui m'ont rendue visite (**Gaëlle, Joris, David**) et à ceux que j'ai loupé (**Jess, Jérém**).

Merci à tous les autres qui ont très vite saisi de quoi il s'agissait !!! « Toi tu fais ce que tu veux, moi j'arrête tout, je pars en Amérique Latine, en mode Hippie » (divine **Justine**). « Toi, tu fais ce que tu veux, nous on se casse au soleil en mode CDD de thèse ultra-stylé » (**Richard, Rémi**).

Et merci à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, que ce soit côté pro ou côté perso !



*A mes grands-mères,
Pour qui les études dépeignaient un rêve inaccessible.*

*A ma fille,
Que la voie des possibles te soit ouverte pour toujours.*



PUBLICATIONS

Acceptée

Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. JoX. 6(2)

En préparation

Borcier, E., Handal, W., Martihno, F., Bidault, A., Laroche, J., Charrier, G. (**en préparation**). Genetic signature of the recent decline of a boreal species at its southern edge: the case of European flounder (*Platichthys flesus*).

Borcier, E., Couteau, J., Charrier, G., Le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., Le Floch, S., Minier, C., Laroche, J. (**en préparation**). Impacts of differentially contaminated coastal ecosystems on European flounder populations : biomarkers, bioenergetics and phospholipids.

Borcier, E., Gaillard, J.C., Armengaud, J., Artigaud, S., Charrier, G., Couteau, J., Le Floch, S., Ouddane, B., Amara, R., Laroche, J., Pichereau, V. (**en préparation**). Proteomic investigation of the flounder *Platichthys flesus* : response to pollutants in estuarine systems.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Borcier, E., Pédrón, N., Charrier, G., Zambonino, J., Claireaux, G., Amérand, A., Théron, M., Le Bayon, N., Loizeau, V., Vasconcelos, R., Fomesca, V., Cabral, H., Laroche, J. (2016). Bioénergétique et métabolisme cardiaque chez le flet (*Platichthys flesus*) soumis au multistress: réponses contrastées entre deux populations, en limite Sud et au centre de l'aire de distribution. ECOBIM, Le Havre

Borcier, E., Charrier, G., Pichereau, V., Laroche, J. (2017). Ecologie du stress et Ecotoxicologie chez un poisson estuarien : une approche populationnelle. GDR d'Ecotoxicologie Aquatique, IRSTEA, Lyon

Borcier, E., Charrier, G., Pichereau, V., Amérand, A., Théron, M., Laroche, J. (2017). Integrative approach to detect the vulnerability of European flounder populations in stressed environments: stress ecology, ecotoxicology and genetic tools. International flatfish symposium, St Malo

Borcier, E., Artigaud, S., Pichereau, V., Gaillard, J.-C., Armengaud, J., Charrier, G., Couteau, J., Amara, R., Laroche, J. (2018). Evaluation de la qualité des habitats estuariens par les réponses d'un poisson plat engagé : indicateurs physiologiques, génotoxicité et protéomique shotgun. ECOBIM, Paris

SOMMAIRE

Introduction.....	- 2 -
-------------------	-------

1. Pressions environnementales dans les écosystèmes côtiers et estuariens : impacts sur les communautés et sur les populations	- 3 -
Les stressseurs dans les écosystèmes côtiers	- 3 -
Multi-stress en estuaires : impacts au niveau des individus et des populations	- 3 -
Vulnérabilité des populations aquatiques	- 4 -
2. Fonctionnement des populations d'un poisson estuarien (le modèle flet <i>Platichthys flesus</i>) et typologie des systèmes estuariens sélectionnés	- 6 -
Cycle de vie et aire de distribution du flet	- 6 -
Les systèmes estuariens retenus pour cette thèse	- 8 -
3. Réponses des populations de flet aux stress estuariens	- 15 -
Vison globale sur les recherches menées au LEMAR sur les réponses phénotypiques et génétiques de populations de flet face aux stress environnementaux	- 15 -
Questions majeures sur la réponse du flet aux stressseurs investiguées au cours de cette thèse	- 16 -
4. Organisation générale de ce manuscrit	- 19 -

CHAPITRE I : Outils mis en œuvre	- 22 -
--	--------

1.1 Diversité génétique des populations naturelles	- 23 -
Les forces évolutives	- 23 -
Microsatellites	- 24 -
Diversité génétique & taille efficace	- 25 -
Estimation de la taille efficace	- 26 -
Taille efficace & vulnérabilité des populations	- 30 -
Approche démo-génétique chez le flet européen	- 33 -
1.2 Approche en bioénergétique	- 33 -
Bioénergétique & réponses au stress	- 37 -
Modulation de la balance énergétique face aux stress	- 37 -
Marqueurs du métabolisme énergétique ciblés chez le flet	- 40 -
Activités enzymatiques	- 40 -
Expression de gènes	- 41 -
1.3 Les lipides : marqueurs de l'état des réserves d'un organisme, mais aussi de la fonctionnalité des membranes cellulaires face aux stress	- 43 -
1.4 Approche sans a priori par la protéomique haut débit	- 45 -
1.5 Expérience de « caging »	- 48 -

CHAPITRE II : Approche Démo-génétique sur une population périphérique vs une population centrale.....	50
---	----

Introduction.....	51
Résultats et discussion	52
Conclusion	53

CHAPITRE III : Réponses bioénergétiques de populations en environnements contrastés - 88 -

Introduction..... - 89 -

Méthodologie..... - 90 -

Synthèse des résultats et discussion..... - 90 -

CHAPITRE IV : Réponses des populations au stress chimique - 98 -

Introduction & Méthodologie - 99 -

Synthèse des résultats et discussion..... - 100 -

Conclusion - 103 -

CHAPITRE V :Réponses de poissons encagés, analysées par la protéomique : caractérisation de l'état écologique à micro-échelle..... - 136 -

Introduction & Méthodologie - 137 -

Synthèse des résultats et discussion sur les sites encagés - 138 -

Conclusion sur les sites encagés - 139 -

Résultats complémentaires sur l'impact de la technique d'encagement sur la physiologie des poissons..... - 140 -

Conclusion : le caging comme outil de diagnostic de la qualité de l'environnement - 142 -

Discussion générale & Conclusions..... - 168 -

1. Cadre général des travaux sur les systèmes estuariens et grandes questions abordées dans cette thèse..... - 169 -

Vulnérabilité d'une population de poisson sous stress chimique chronique - 171 -

Vulnérabilité d'une population de poisson sous stress thermique..... - 172 -

2.Perspectives - 175 -

Définir l'état écologique de petits estuaires à une échelle régionale..... - 175 -

Développer des approches intégrées couplant génotypes-phénotypes dans de grands systèmes estuariens à l'échelle de l'Europe - 176 -

3. Conclusion - 178 -

Bibliographie - 180 -

FIGURES

Fig. 1: Représentation du cycle biologique du flet	6
Fig. 2 : Distribution actuelle de <i>Platichthys flesus</i>	7
Fig. 3: Situation géographique des estuaires sélectionnés	9
Fig. 4 : Estuaire de la Canche	10
Fig. 5 : Estuaire de la Seine et son bassin versant	11
Fig. 6 : Carte bathymétrique de la Baie de Douarnenez (source SHOM)	12
Fig. 7 : Estuaire de la Vilaine (Evrard et al.,2013)	13
Fig. 8 : Estuaire du Mondego (Costa <i>et al.</i> ,2013)	14
Fig. 9 : Schéma explicatif du déséquilibre de liaison (DL)	28
Fig. 10 : Conséquences de la réduction de la taille efficace dans une population	30
Fig. 11 : Vortex de l'extinction	31
Fig. 12 : Schémas représentant les effets d'un goulot d'étranglement	32
Fig. 13 : Bilan des trois principales voies de la production d'énergie (ATP)	35
Fig. 14 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative grâce à 4 complexes et à l'ATPase	36
Fig. 15 : Récapitulatif des principales voies de production et de consommation d'ATP.	38
Fig. 16 : Répartition de la demande énergétique et de l'approvisionnement du métabolisme en ATP en fonction de la tolérance du métabolisme face au stress	39
Fig. 17 : Structures moléculaires d'un sphingolipide et d'un cholestérol	44
Fig. 18 : Bicouche lipidique d'une membrane plasmique	45
Fig. 19 : Contribution de la protéomique à l'écotoxicologie durant les deux dernières décennies	47
Fig. 20 : Principales étapes menées dans une démarche de protéomique haut-débit	48
Fig. 21 : Sites de « caging » pour l'étude protéomique shot-gun	50
Fig. 22 : Détermination de la vulnérabilité des populations pour diagnostiquer l'état écologique des systèmes estuariens	181

Introduction

1. Pressions environnementales dans les écosystèmes côtiers et estuariens : impacts sur les communautés et sur les populations

Les stressseurs dans les écosystèmes côtiers

Les milieux côtiers sont particulièrement soumis aux effets des changements climatiques globaux par leur faible profondeur; ils sont aussi exposés à échelle locale à de fortes pressions liées aux activités anthropiques croissantes qui peuvent se traduire par des situations de multi-stress, particulièrement dans les systèmes estuariens (Robins *et al.*, 2016; Hallett *et al.*, 2017; Sinha *et al.*, 2017; Plenty *et al.*, 2018).

Le changement climatique global se traduit ainsi par une augmentation significative de la température des eaux côtières, de leur teneur en gaz carbonique et d'une baisse de leur pH. Notons que ces variations hydroclimatiques s'accompagnent également de modifications très sensibles de la pluviométrie en zones littorales se traduisant par des altérations du fonctionnement de l'écosystème côtier (modifications des apports en nutriments, altérations de la productivité et de la structure et du fonctionnement des communautés) (Gunderson *et al.*, 2016 ; 2017).

Les écosystèmes estuariens sont particulièrement impactés par différentes pressions anthropiques (Birch *et al.*, 2015 ; Ellis *et al.*, 2015 ; Wolanski & Elliott, 2015) : (1) les rejets de contaminants chimiques d'origine multiple (domestique, industrielle et/ou agricole), (2) les rejets d'eaux chaudes liés aux activités des centrales nucléaires, (3) une augmentation du risque hypoxique lié à l'eutrophisation (Sun *et al.*, 2011, 2012 ; Hughes *et al.*, 2015), (4) une artificialisation des systèmes se traduisant par une perte de certains habitats comme les zones intertidales (Jickells *et al.*, 2016).

Multi-stress en estuaires : impacts au niveau des individus et des populations

L'interaction de multiples stressseurs en estuaires, leur fluctuation dans l'espace, leur chronicité, et leur intensité, engendre des réponses différentielles selon les espèces considérées, qu'elles soient temporaires ou résidentes, et selon les populations.

Le stress thermique peut conduire à des altérations de la physiologie (Somero, 2010 ; Reusch, 2013), de la performance et de la survie de nombreuses espèces côtières (Harley *et al.*, 2006). Les pollutions d'origine anthropique peuvent elles aussi avoir des effets similaires sur les

espèces estuariennes à plus ou moins long terme : perturbations physiologiques, réduction de la fitness, modification de l'abondance et de la biomasse des populations (Whitfield & Elliott, 2002 ; Elliott & Whitfield, 2011 ; Teichert *et al.*, 2017 ; Moore & Olden, 2017).

Les effets de ces différents stressseurs, qu'ils soient liés au réchauffement climatique global ou aux pressions anthropiques directes, sont souvent interdépendants et peuvent avoir des effets additifs, antagonistes ou synergiques sur la ressource marine (Harley *et al.*, 2006, Todgham & Stillman, 2013 ; Gunderson *et al.*, 2016). Les effets additifs correspondent à l'effet combiné des multiples stress présents dans le milieu, plus précisément c'est la somme des effets de chacun des stress pris indépendamment. Les effets antagonistes se traduisent par un impact du multistress plus limité relativement à celui des effets additifs ; tandis que les effets synergiques conduisent à un impact du multistress supérieur aux effets additifs (Gunderson *et al.*, 2016). Le multistress peut ainsi impacter les organismes de façon directe (altérations sur la physiologie, le comportement, la capacité reproductive, la mortalité, la distribution, la dynamique de population) (Whitfield & Elliott, 2002 ; Jackson *et al.*, 2016), ou de manière indirecte (modification de la disponibilité en habitats, de la ressource alimentaire, ...).

Globalement, les effets du multi-stress sur les organismes estuariens ont été classiquement explorés à différents niveaux d'organisation biologiques (moléculaire, physiologique, traits d'histoire de vie) ; il nous paraît d'un intérêt majeur d'intégrer ces travaux jusqu'au niveau populationnel (par une approche démographique et/ou génétique) pour mieux appréhender le degré de vulnérabilité des populations naturelles face aux stress environnementaux.

Vulnérabilité des populations aquatiques

Une nouvelle thématique de recherche apparaît dans les milieux naturels : la biologie de la vulnérabilité qui vise à explorer le potentiel d'une espèce ou de populations à se maintenir dans leur environnement, voire à estimer leur potentiel de résilience vis-à-vis d'un environnement de plus en plus changeant (Dulvy *et al.*, 2003 ; Halpern *et al.*, 2007 ; Williams *et al.*, 2008 ; Huey *et al.*, 2012 ; Buckley & Huey, 2016). Rappelons ici qu'une population est définie comme un ensemble d'individus de la même espèce ayant la possibilité d'interagir entre eux au moment de la reproduction, et qui ont la capacité d'échanger des gènes sur plusieurs générations, dans une zone géographique donnée. La population est donc caractérisée par un ensemble de génotypes individuels qui la compose (i.e. le « pool

génétique »), elle constitue donc une véritable unité évolutive ; i.e. sa variabilité génétique peut donc être modifiée sous la pression de différentes forces évolutives majeures : migration, dérive génétique, mutation, sélection.

Notons que l'estimation du degré de vulnérabilité d'une population peut conduire à la mise en œuvre de programmes de conservation pour les populations d'intérêt d'une espèce donnée, et qu'elle peut aussi rechercher le lien entre l'état de santé d'une population et l'état de santé de son écosystème (Morrison *et al.*, 2015 ; McKenzie *et al.*, 2016).

La vulnérabilité des populations, dépend de leur niveau d'exposition et de leur sensibilité face aux stressseurs de l'environnement. La capacité de réponse d'une population aux stress peut être analysée à court terme par sa plasticité phénotypique (acclimatation) ou à long terme, ie sur plusieurs générations, par sa capacité adaptative (impliquant donc une réponse génétique de la population face à la pression de sélection) (Chin *et al.*, 2010 ; Johnson & Welch, 2010 ; Glick *et al.*, 2011 ; Morrison *et al.*, 2015).

La capacité adaptative d'une population doit lui permettre de réduire sa sensibilité et/ou son exposition aux facteurs de stress. Elle dépend de facteurs intrinsèques à l'organisme comme la capacité de dispersion, la diversité génétique, le taux d'évolution (Dawson *et al.*, 2011 ; Beever *et al.*, 2015 ; Morrison *et al.*, 2015). Notons que la plasticité phénotypique d'un génotype donné, correspond à sa capacité à exprimer différents phénotypes pour un trait biologique donné dans différents environnements ; elle peut affecter la morphologie, la physiologie et/ou le comportement d'un organisme.

Les variations de la capacité adaptative (variations génotypiques) et de la plasticité phénotypique (variations phénotypiques) d'une population déterminent son potentiel évolutif. Ces deux variations interagissent de façon complexe en situation de stress, et peuvent donc conduire à un degré de vulnérabilité propre à chaque population dans son environnement spécifique.

2. Fonctionnement des populations d'un poisson estuarien (le modèle flet *Platichthys flesus*) et typologie des systèmes estuariens sélectionnés

Des travaux ont été entrepris au LEMAR depuis 2000 sur un poisson estuarien, le flet (*Platichthys flesus*), pour explorer les réponses de populations face aux multiples stress environnementaux sur la Façade Atlantique, de l'Angleterre au Portugal.

Cycle de vie et aire de distribution du flet

Le flet est une espèce benthique côtière faisant partie de la famille des poissons plats euryhalin Pleuronectidés, de l'ordre des Pleuronectiformes. Cette espèce affectionne les fonds meubles des estuaires et des zones côtières (Dénier, 1981). Le flet est un poisson catadrome (Fig.1) qui réalise une ponte en mer à des profondeurs modérées (15 à 30 m) souvent localisées à l'embouchure des estuaires, de février à mars. Sa vie juvénile est essentiellement estuarienne et dure 2,5 ans (Dando, 2011). Notons que les petits juvéniles sont essentiellement localisés dans la partie oligohaline (amont) des estuaires, avec leur croissance ils vont progressivement exploiter la partie mésohaline, puis enfin la partie polyhaline (aval) vers l'âge de 7-8 mois (septembre-octobre) (Dupuy *et al.*, 2015).

Durant une grande partie de son cycle biologique, le flet est donc exposé aux nombreuses pressions environnementales qui caractérisent les milieux estuariens. Ce poisson invertivore bioaccumule et biomagnifie potentiellement de nombreux contaminants des écosystèmes côtiers.

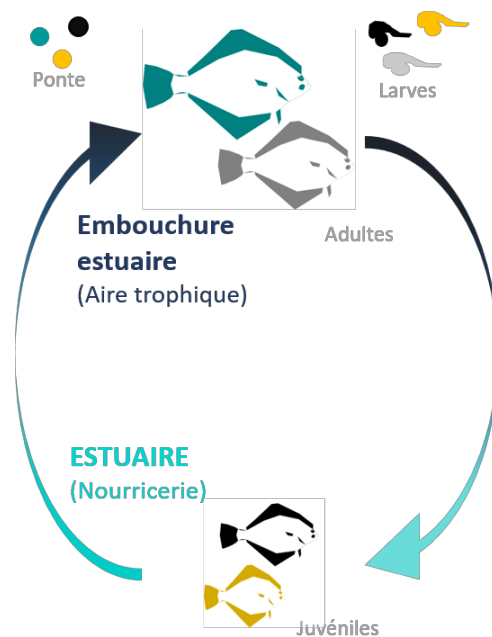


Fig. 1: Représentation du cycle biologique du flet

Cette espèce, à affinité boréale, affectionne les eaux tempérées à froides. Elle est signalée du Nord de l'Europe en Mer Blanche, jusqu'à l'estuaire du Mondego au Portugal qui marque la limite Sud de la distribution de cette espèce (Fig.2) (Cabral *et al.*, 2007) . Un gradient de température moyenne de la surface de la mer est clairement observé du Nord au Sud de sa répartition allant d'une température moyenne de la surface de la mer de 8°C au niveau de Bergen (Norvège) à 14°C au niveau de Lisbonne (Portugal) (Bigg *et al.*, 2007) Comme d'autres

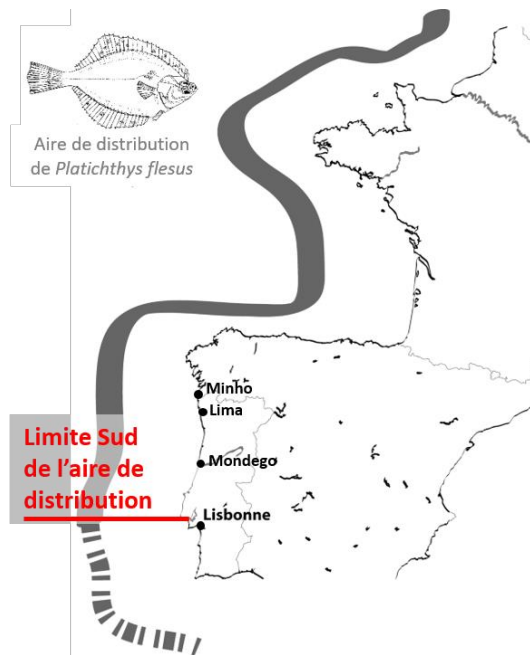


Fig.2 : Distribution actuelle de *Platichthys flesus*

l'existence d'un upwelling actif durant la saison estivale au Nord-Ouest de la péninsule ibérique (Lima *et al.*, 2007). En revanche, au Sud du Portugal, le flet est devenu extrêmement rare à la latitude de Lisbonne, cette espèce étant abondante dans cette zone il y a quelques décennies (Cabral *et al.*, 2001, Martinho *et al.*, 2013). La limite Sud de l'aire de répartition du flet est donc clairement remontée vers le Nord ces dernières décennies à la latitude du Mondego ; les augmentations récentes de la température de surface de la mer dans cette région en seraient la cause principale (Cabral *et al.*, 2007). L'estuaire du Mondego présente donc a priori la population fonctionnelle de flet la plus au Sud de sa distribution dans l'Atlantique Nord-Est ; le recrutement de flets juvéniles dans cette population présentant cependant une variabilité inter-annuelle forte (Martinho *et al.*, 2009, 2010 ; Cabral *et al.*, 2007).

En Atlantique Nord-Est, des observations convergentes sont faites sur d'autres espèces boréales (e.g. la morue, la plie, la limande) qui voient leur abondance décliner aux limites Sud

de leur aire de répartition, mais augmenter dans leur limite Nord (Rijnsdorp *et al.*, 2009). Notons que les populations périphériques (notamment celles situées en limite Sud d'aire de répartition) terrestres ou marines, sont considérées comme des populations d'intérêt majeur pour appréhender la capacité des espèces à faire face aux changements climatiques (Thomas *et al.*, 2001 ; Iverson *et al.*, 2004 ; Travis & Dytham, 2004 ; Hampe & Petit, 2005) ; on soupçonne en effet que ces populations « Sud » peuvent avoir développé des adaptations locales à des régimes thermiques très spécifiques, étant souvent considérées comme issues de refugium en périodes glaciaires, parfois très anciens.

Outre le fait d'être exposé au réchauffement climatique en zones peu profondes, le flet est aussi soumis à d'autres stressseurs de manière temporaire ou chronique au sein des estuaires, comme la contamination chimique de l'eau, ou le risque hypoxique lié à l'eutrophisation générale des écosystèmes côtiers. Les effets de ces stress multiples peuvent conduire à diverses altérations moléculaires et physiologiques et à une baisse de fitness du flet en milieux estuariens ; ils peuvent aussi avoir des effets au niveau populationnel et notamment un impact sur la variabilité génétique (Hemmer-Hansen *et al.*, 2007 ; Calvès *et al.*, 2013, Marchand *et al.*, 2013, Pédrón *et al.*, 2015) ; le flet constitue donc un excellent modèle pour explorer la vulnérabilité des populations face aux différents facteurs de stress, au sein des écosystèmes estuariens.

Les systèmes estuariens retenus pour cette thèse

Afin d'étudier la vulnérabilité des populations de flet face au multi-stress, nous avons sélectionné différents estuaires présentant des environnements contrastés ; des systèmes stressés (impactés par le stress chimique ou le réchauffement climatique) vs des systèmes a priori peu stressés (Fig. 3).

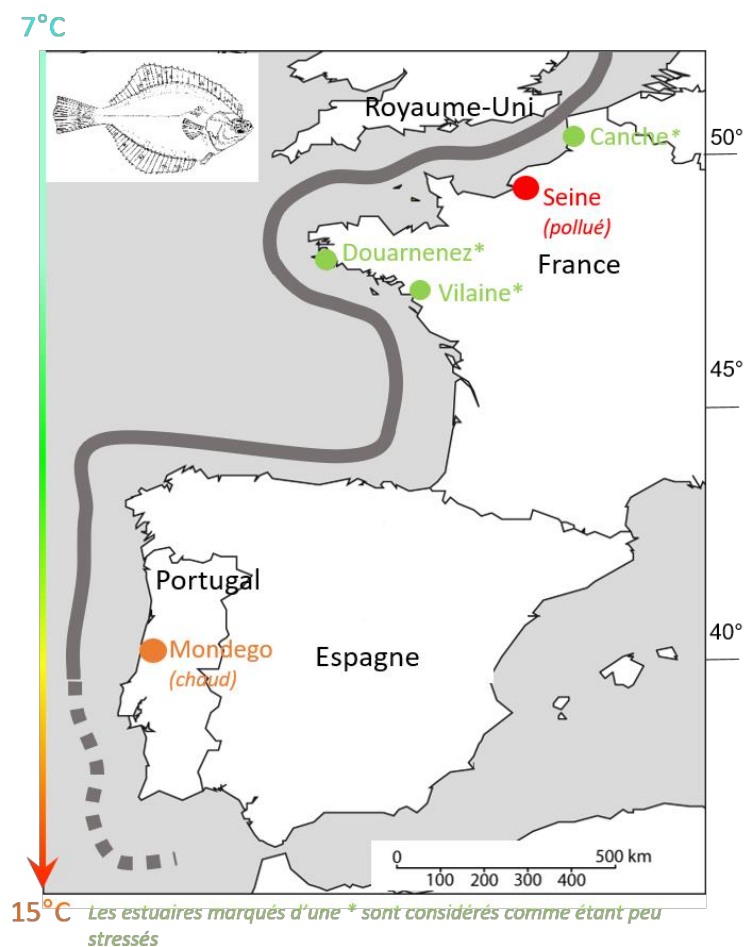


Fig. 3: Situation géographique des estuaires sélectionnés

L'**estuaire de la Canche** (Fig.4) possède un petit bassin versant de l'ordre de 1 274 km² et s'étend sur le haut et moyen Artois. Les rejets dans ce bassin versant sont essentiellement domestiques en raison de l'absence de systèmes épuratoires (traitement des effluents domestiques à la parcelle). Des contaminations diffuses liées aux rejets de produits phytosanitaires comme l'atrazine, et ponctuelles, liées à la présence de nitrate sont aussi relevées (SAGE, 2011). L'activité agricole, de type polyculture, occupe 75% du territoire de ce bassin. Le faible développement urbain et l'absence d'industrialisation (Amara *et al.*, 2007) le caractérisent. De plus, l'estuaire de la Canche est considéré comme une zone de nurserie importante pour différentes espèces de poisson dont le flet (Selleslagh & Amara, 2008 ; Selleslagh & Amara, 2015). Les faibles perturbations anthropiques identifiées au niveau de la Canche associées à son rôle écologique majeur en tant que zone de nurserie pour les poissons font donc de la Canche un site de référence au niveau du secteur Manche.



Fig. 4: Estuaire de la Canche

L'estuaire de Seine correspond aux 170 derniers kilomètres aval de la Seine ; il est délimité par le barrage de Poses en amont, et la baie de Seine en aval (Fig. 5). Le « système Seine » présente un bassin versant de 75 000 km², pour une densité de population de 16 millions d'habitants, avec donc une moyenne de 200 habitants / km², soit le double de la moyenne nationale (Agence de l'eau Seine-Normandie, 2009). Cette population est à l'origine de nombreuses activités conduisant à différents rejets de contaminants chimiques d'origines agricole, domestique et industrielle. Au final, la Seine est identifiée comme faisant partie des estuaires les plus pollués d'Europe (Le Pape *et al.*, 2007). La contamination diffuse par des composés métalliques (mercure, plomb, cadmium...) mais aussi par des polluants organiques (HAPs, PCBs, PBDEs, résidus de médicaments, ...) y est importante. Notons par ailleurs que l'estuaire de la Seine joue un rôle écologique important pour l'ichtyofaune ; c'est en effet une zone de nourricerie importante en Manche pour les juvéniles de plusieurs espèces marines d'intérêt halieutique comme la sole, la limande et le bar, et une voie de migration pour les poissons amphihalins (Morin *et al.*, 2005 ; Duhamel, 2012 ;).



Fig. 5 : Estuaire de la Seine et son bassin versant

La **Baie de Douarnenez** (Fig. 6) est délimitée par la presqu'île de Crozon au Nord, et le cap Sizun au Sud. Le bassin versant de la Baie de Douarnenez correspond aux bassins hydrographiques des exutoires des cours d'eau compris entre Douarnenez (Pointe du Leïdé) et Telgruc-sur-Mer ; il conduit à des apports en eau douce très limités sur la Baie de Douarnenez. D'une superficie de 230 km², il compte 29 036 habitants et reçoit les effluents provenant de 5 cours d'eau de très petites tailles (dont les principaux sont le Ris et Kerharo). Caractérisés par de fortes pentes, la diffusion des polluants s'en retrouve accélérée. Les principaux polluants mesurés sont les nitrates et les produits phytosanitaires (pesticides). Les algues vertes et leur putréfaction ne sont pas rares sur les plages de la baie et engendrent des nuisances aux riverains et touristes. Cependant, la qualité de l'eau du bassin est définie comme étant globalement en bon état sur 4 des 5 cours d'eau (source : CG 29). Les flets se reproduisent dans la Baie de Douarnenez tous les hivers en février/mars (Dénier, 1981).

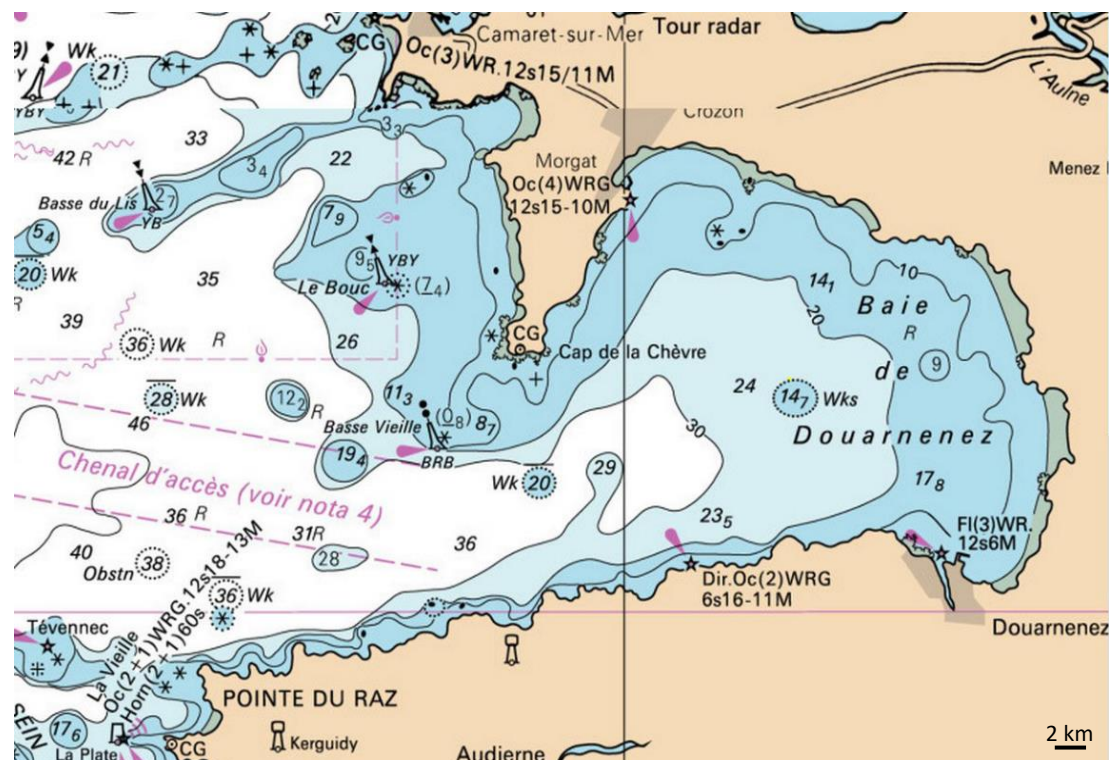


Fig. 6 : Carte bathymétrique de la Baie de Douarnenez (source SHOM)

L'estuaire de la Vilaine (Fig. 7), dont le bassin versant représente 10 500 km², subit essentiellement l'influence d'activités agricoles (élevages de bovins, de porcs, de volailles) et agro-alimentaires (cultures associées, abattoirs). Les principales sources de contamination du milieu sont liées aux apports de pesticides, de nitrates, et de matières organiques dissoutes (SAGE , 2015). Le blocage de la remontée des eaux marines lié à la présence du barrage d'Arzal, localisé à 12 km en amont de l'embouchure, entraîne aussi une perturbation du milieu et peut conduire à une eutrophisation du système conduisant à des hypoxies estivales plus ou moins marquées selon les années (Ménésguen *et al.*, 2001). Si les effets du barrage sur la Vilaine peuvent impacter certains poissons amphihalins comme le saumon ou l'anguille dans leur possibilité de migration (SAGE , 2015), le flet y réalise par contre son cycle biologique avec succès, dans la partie localisée en aval du barrage (Laroche et al. 2013).

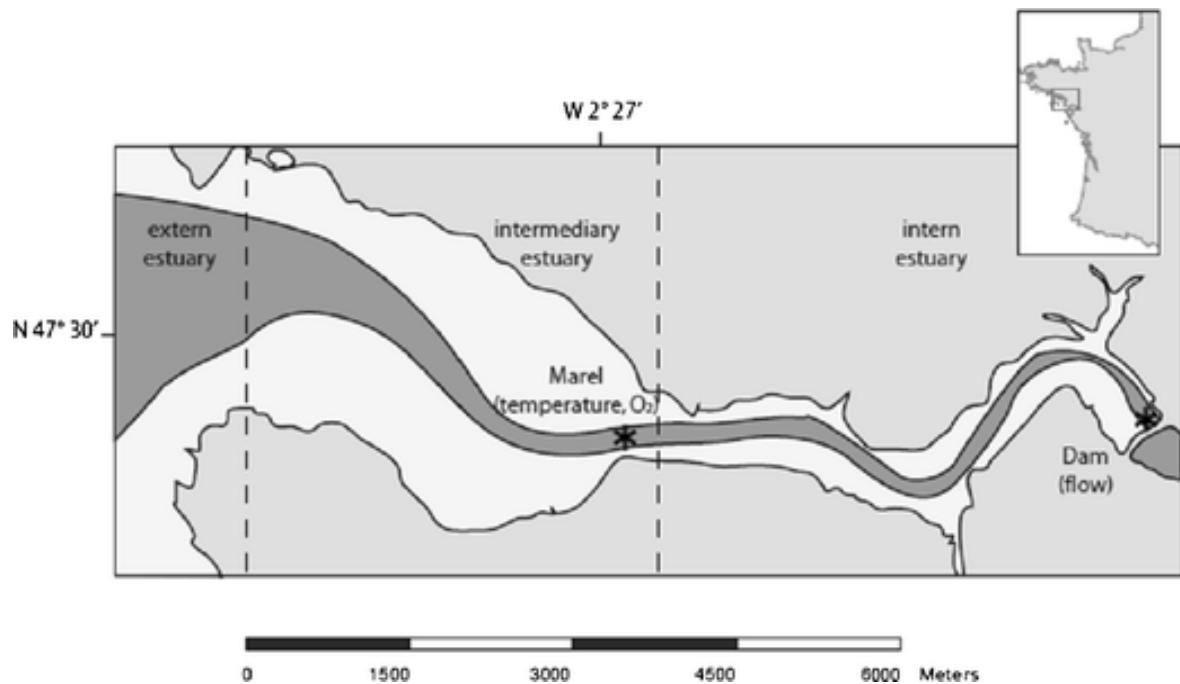


Fig. 7: Estuaire de la Vilaine (Evrard *et al.*, 2013)

L'**estuaire du Mondego** est situé sur la côte Atlantique du Portugal (environ 200 km au Nord de l'estuaire du Tage) et s'étend sur 6.5 km à partir de l'embouchure située à Figueira da Foz. Le bassin versant du Mondego est estimé à 6 670 km². L'estuaire se sépare en deux bras Nord et Sud, délimitant l'île de Murraceira (Fig. 8) ; ils correspondent à deux sous-systèmes distincts ayant des caractéristiques bien différentes.

Le bras Nord est plus profond et présente un hydrodynamisme soutenu ; il correspond à la zone de navigation principale du fleuve puisqu'il supporte le port. Le bras Sud est moins profond, peu alimenté par la marée, et supporte de vastes vasières intertidales. Globalement ce système estuarien a traversé dans le passé des crises hypoxiques liées à l'eutrophisation et une certaine dégradation de la qualité de ces eaux impactées par les activités portuaires et l'aquaculture. On observe une restauration de la qualité globale des eaux du Mondego depuis environ 15 ans, principalement liée à la mise en place de stations d'épurations relativement efficaces (Marques *et al.*, 1997 ; Pardal *et al.* ; 2000, 2004 ; Dolbeth *et al.*, 2003). Actuellement

l'estuaire du Mondego présente une contamination chimique modérée et une eutrophisation limitée (França *et al.*, 2009).

L'estuaire du Mondego a surtout été affecté ces dernières années par l'occurrence d'évènements climatiques extrêmes, de type pics de chaleur estivaux (Marques *et al.*, 2007 ;

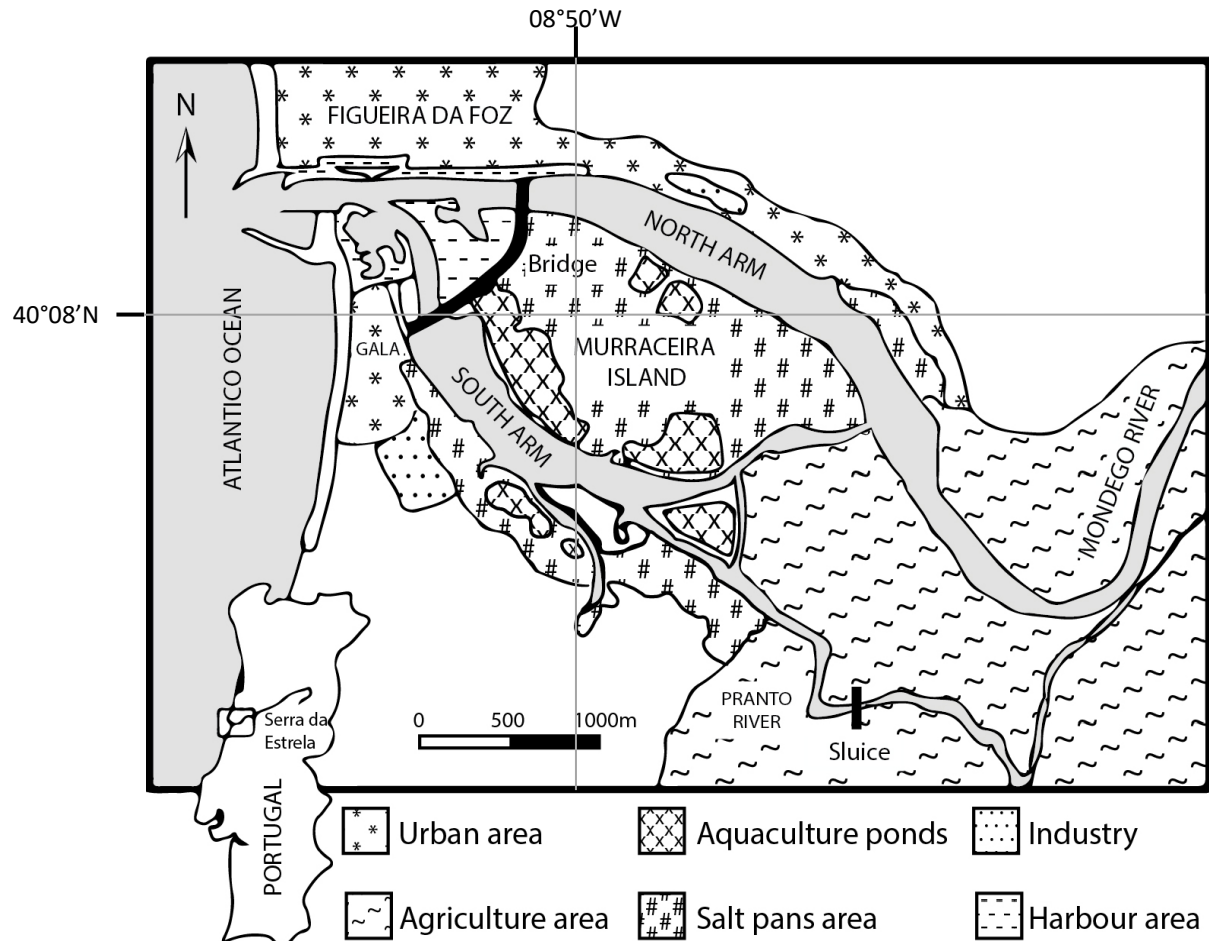


Fig. 8 : Estuaire du Mondego (Costa *et al.*, 2013)

Martinho *et al.*, 2007 ; Cardoso *et al.*, 2004 ; Dolbeth *et al.*, 2011; Grilo *et al.*, 2011). En conséquence, des changements ont été enregistrés dans la répartition des espèces estuariennes et dans leur démographie, ainsi que dans la structure et le fonctionnement des peuplements de vertébrés et d'invertébrés (Marques *et al.*, 2007 ; Baptista *et al.*, 2010 ; Grilo *et al.*, 2011 ; Nyitrai *et al.*, 2012, Costa *et al.*, 2013). De surcroît, cet estuaire présente un intérêt particulier pour notre étude puisqu'il est considéré comme la limite Sud de l'aire de distribution du flet. Le Mondego présente donc un environnement relativement « chaud » et une population de flet plus ou moins fonctionnelle (Marthino *et al.*, 2013). Notons cependant que le succès du recrutement du flet dans le Mondego présente une forte variabilité interannuelle (Marthino *et al.*, 2009, 2010).

Dans notre étude, les deux estuaires de Seine et du Mondego sont considérés comme présentant des niveaux de stress potentiellement importants pour les populations de flet ; le premier étant donc caractérisé par une contamination chimique chronique lourde, et le second par un régime thermique élevé pour une espèce à affinité boréale comme le flet. Ces deux estuaires « stressés » seront donc comparés à des systèmes considérés comme peu impactés par le stress chimique et thermique, et qualifiés « de systèmes de référence » (Estuaire de Vilaine, Baie de Douarnenez, Estuaire de la Canche).

3. Réponses des populations de flet aux stress estuariens

Vison globale sur les recherches menées au LEMAR sur les réponses phénotypiques et génétiques de populations de flet face aux stress environnementaux

Le LEMAR a conduit depuis 2000 des travaux sur les réponses du flet aux stress environnementaux, dans une grande diversité d'estuaires, de l'Angleterre jusqu'au Portugal. Les réponses de différentes populations de flet ont été analysées sur des grands systèmes estuariens présentant souvent de fortes charges en micropolluants (Tamar-UK, Seine, Loire, Gironde), sur des petits estuaires considérés comme sites de « référence » (Canche, Ster de Lesconil), comme sur des estuaires de taille intermédiaire caractérisés par une eutrophisation et un risque hypoxique estival (Vilaine), voire par un stress thermique (Lima & Mondego - Portugal). Cette approche résolument multi-estuaires a donc permis de comparer les réponses moléculaires et populationnelles du flet dans des environnements estuariens caractérisés par des niveaux contrastés de stress chimique et/ou thermique, et des risques hypoxiques plus ou moins marqués.

La démarche au départ très orientée en écotoxicologie s'est progressivement élargie vers l'écologie du stress, en explorant la réponse du poisson aux multi-stress dans les milieux estuariens.

Des pertes de fitness au niveau individuel ont été identifiées *in natura* (réduction du taux de croissance, de l'indice de condition, de la fécondité) couplées à des dommages cellulaires (génétoxicité) et des signatures moléculaires d'altération de certains métabolismes ou fonctions (bioénergétique, immunité, reproduction) dans les estuaires les plus pollués, relativement aux systèmes peu contaminés (Marchand *et al.* 2003, 2004; Evrard *et al.* 2010, 2013; Laroche *et al.* 2013; Dupuy *et al.* 2015).

Des expériences ont par ailleurs été menées au LEMAR pour comparer les performances de flets juvéniles issus de différents systèmes estuariens vis-à-vis de stress expérimentaux. Ces expériences de type « Common Garden » se sont révélées d'un intérêt majeur pour mettre en évidence une vulnérabilité différentielle des populations exposées à un stress thermique ou à un multi-stress thermique & hypoxique (Lavergne *et al.* 2015 ; Pédrón *et al.* 2017a).

Des approches en génétique de populations sur le flet ont identifié des pressions de sélection s'exerçant sur certains gènes liés à la détoxification, l'apoptose et la bioénergétique, et se traduisant par une modification de la variabilité génétique au sein des populations estuariennes soumises aux stress environnementaux (Marchand *et al.* 2010, 2013; Calvès *et al.* 2013).

Enfin de nouvelles approches en « Common Garden » et *in natura* ont été aussi menées par notre équipe avec les outils de la protéomique, sur des flets issus de différentes populations plus ou moins contaminées et/ou exposées aux effets du réchauffement climatique. Une contamination expérimentale par un mélange de PAHs et PCBs a ainsi révélé une dérégulation de plusieurs protéines associées à la déméthylation de la bétaine et au cycle de la méthionine (Galland *et al.* 2015). Des signatures protéomiques précoces de perturbation endocrinienne ont été identifiées chez les flets juvéniles exposés *in natura* aux micropolluants (Galland *et al.* 2013).

Questions majeures sur la réponse du flet aux stress investigatees au cours de cette thèse

Pédrón (2016) a confirmé la différenciation génétique significative entre les populations de flets de la Péninsule Ibérique, et celles du Golfe de Gascogne et de la Manche détectée dans une étude précédente (Calvès *et al.*, 2013). Ces populations ibériques situées en limite Sud de l'aire de distribution du flet vivent dans des environnements biotiques et abiotiques contrastés, relativement aux populations plus « centrales » localisées sur le continuum Golfe de Gascogne - Manche. Willi *et al.* (2006) ont montré que les populations périphériques sont souvent fragmentées, isolées et de faible effectif comparativement aux populations centrales. Par ailleurs, l'originalité génétique des populations de flets de la Péninsule Ibérique reflète très probablement aussi une histoire phylogéographique ancienne. En effet cette Péninsule fut très probablement une zone de refugium pour le flet au cours des

dernières glaciations du quaternaire, comme d'ailleurs pour beaucoup d'autres espèces marines de l'Atlantique Nord-Est (Larmuseau *et al.*, 2009 ; 2010)

Pédrón (2016) a mis en évidence, avec des marqueurs microsatellites, une perte de diversité allélique significative dans la population de flet située au sein de l'estuaire de Mondego (Portugal), clairement la plus au Sud de la distribution du flet, relativement aux populations portugaises situées plus au Nord ; il a émis en conséquence l'hypothèse que cette perte de diversité génétique pourrait être liée à de possibles goulots d'étranglement démographiques liés à une très forte variabilité inter-annuelle du recrutement dans cet estuaire (Marthino *et al.*, 2009, 2010 ; Ramos *et al.*, 2010 ; Vaz *et al.*, comm. orale, IFS, 2017).

Le Mondego présente donc des caractéristiques, en matière de démographie et de variabilité génétique, qui sont indicatrices d'un possible déclin. Il nous paraît en conséquence particulièrement pertinent d'explorer dans ce système, la vulnérabilité de la population de flet de cet estuaire par une approche démo-génétique. **Cette perte de diversité allélique serait-elle liée à un déclin démographique récent, et donc la conséquence d'une forte dérive génétique dans une population de taille réduite ? Pourrait-elle conduire à un faible potentiel évolutif de la population du Mondego pour répondre à un environnement changeant, et donc à sa forte vulnérabilité ? Le degré de vulnérabilité de cette population du Mondego est-il mesurable, par une approche démo-génétique ?** Cet ensemble de questions sera abordé dans le chapitre 2 de cette thèse.

D'autre part, est-il possible de mettre en évidence de potentielles adaptations locales au sein des populations périphériques et des populations centrales de flet en Europe ? L'étude de la structure génétique est-elle suffisante pour répondre à cette question ? Selon Eckert *et al.* (2008), la structure génétique des populations en limite d'aire de répartition est importante à prendre en compte pour définir leur valeur de conservation. Le but étant de hiérarchiser les efforts de conservation sur les populations, en suivant des critères de qualité (rareté, diversité) ou de quantité (taille, densité) (Capmourteres & Anand, 2016).

Dans ce but, Pédrón (2016) a analysé la structure génétique de populations de flet, de la Péninsule Ibérique jusqu'à la Mer du Nord, en considérant le polymorphisme de gènes candidats (ie pouvant subir potentiellement des pressions de sélection). Deux locus, GAPDH et PGDS (le premier étant lié à la bioénergétique à travers la glycolyse, le deuxième étant impliqué dans la réponse inflammatoire induite par des stressseurs) permettent de différencier génétiquement, respectivement les populations du Sud vs centrales, et les populations

polluées vs peu polluées. Ces résultats de Pédrón (2016) confirment ceux de Calves *et al.* (2013) et suggèrent que des stressseurs de l'environnement exercent des pressions sélectives différentielles sur les populations. Ces possibles réponses à la sélection pourraient être expliquées par des conditions hydro-climatiques contrastées (histoire évolutive à plus ou moins long terme face à des régimes thermiques contrastés) et des niveaux de contamination différentiels (évolution à court terme) entre les systèmes estuariens. D'autres études portant sur des marqueurs de type allozymes, ou des gènes candidats, ont mis en évidence l'existence de génotypes de « résistance » dans les populations de flet prélevées dans les estuaires les plus contaminés par les polluants (Laroche *et al.*, 2002 ; Marchand *et al.*, 2003 ; Calvès *et al.*, 2013).

Toutes ces observations liées à la différenciation génétique entre populations conduisent à des interrogations concernant leur possible différenciation au niveau des traits phénotypiques. Des différentiels physiologiques s'expriment ainsi entre les populations périphériques et centrales vivant dans des milieux très contrastés et soumises à un multi-stress (Pédrón *et al.*, 2017a). Des flets juvéniles provenant de deux populations « centrales » de Canche et Vilaine et d'une population périphérique du Portugal (Lima) ont été placées en « common garden » et, soumis aux stress chaud (24°C) et hypoxique (40% de saturation en oxygène). Il apparaît qu'en condition chaude et hypoxique, les populations du Nord ont un métabolisme énergétique essentiellement basé sur l'anaérobiose et présentent donc un déséquilibre énergétique indicateur d'une situation de stress. Tandis que celle du Sud maintient un équilibre entre aérobiose et anaérobiose, et présente donc vraisemblablement une meilleure capacité d'acclimatation et/ou d'adaptation face aux stress chaud et hypoxique, relativement aux populations plus au Nord. Ces résultats sont appuyés par une étude en protéomique qui confirme les divergences interpopulationnelles en termes de bioénergétique et de réponse au stress oxydant sur un gradient de la Manche au Portugal; la régulation d'enzymes majeures comme l'ATP synthase et la G6PDH pouvant être liée à une adaptation locale au régime thermique du système estuarien (Pédrón *et al.* 2017a).

Notons que le travail de Lavergne *et al.* (2015) confirme aussi un différentiel d'activité métabolique entre la population de flets de Seine vs celle de Vilaine ; la première présentant une aptitude nettement plus réduite à résister à un stress thermique chronique.

Les travaux précédents mettent en évidence des différenciations phénotypiques parfois très marquées entre les populations de flets *in natura*, et en conditions expérimentales. Il nous

paraît donc d'un intérêt majeur d'approfondir nos connaissances sur ce différentiel phénotypique entre populations de flet vivant en environnements contrastés (pollution, stress thermique, multi-stress), en ciblant particulièrement le métabolisme énergétique qui est à la base de toute possibilité de réponse des individus aux stress (Sokolova, 2013). **Notre objectif sera ici de comprendre si on peut détecter une adaptation locale des populations à leur environnement qui puisse se traduire par une vulnérabilité de certaines populations face aux futurs changements environnementaux ; cette question fera l'objet du chapitre 3 de cette thèse.**

Enfin dans les chapitres 4 & 5 de ce document, nous développerons comment cette thèse s'est intégrée dans un projet de recherche HQFish « Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine sur le fonctionnement d'une population de poisson » (projet financé dans le cadre du programme Seine-Aval 6 (2017-2020), co-dirigé par les UMR LEMAR et LOG). **Dans le cadre de HQFish, nous visons à explorer la fonctionnalité des habitats estuariens pour le flet, en évaluant le statut physiologique de poissons adultes, et en explorant les réponses moléculaires de poissons juvéniles, dans un milieu présentant une contamination lourde (l'estuaire de Seine) vs dans des milieux peu contaminés (estuaire de Canche et Baie de Douarnenez).** Nous allons donc caractériser l'état de santé de différentes populations de flet, et estimer l'impact de la contamination chimique sur la vulnérabilité des populations.

A partir des connaissances acquises sur le modèle flet depuis ces deux dernières décennies au LEMAR, l'objectif majeur de cette thèse sera au final de mettre en œuvre différents marqueurs moléculaires, bioénergétiques et génétiques sur le flet, pour développer un outil intégrateur de la physiologie et de l'écologie fonctionnelle, pour évaluer la vulnérabilité des populations naturelles, et donc estimer la qualité des habitats estuariens.

4. Organisation générale de ce manuscrit

A la suite de cette introduction, les outils mis en œuvre au cours de cette thèse et leur pertinence seront présentés dans le **chapitre 1**. Dans un premier temps, les marqueurs génétiques seront décrits dans le cadre de notre approche en démo-génétique. Dans un second temps, les marqueurs liés au métabolisme énergétique et donc fortement impliqués dans la réponse des organismes aux stress seront détaillés. Nous aborderons ensuite dans ce chapitre l'approche qui a été menée sur les lipides, en tant que marqueurs de l'état des

réserve, mais aussi de la fonctionnalité des membranes cellulaires. Cette partie « outils » s'achèvera avec la présentation de la protéomique haut débit comme méthodologie innovante pour détecter de nouveaux biomarqueurs dans les populations soumises aux stress environnementaux.

Le premier travail mené dans cette thèse a conduit à l'estimation de la taille efficace de populations de flet localisées au niveau périphérique Sud (Mondego) vs au niveau central (Vilaine) ; il sera présenté sous la forme d'un premier draft d'article (**chapitre 2**).

La deuxième approche conduite dans cette thèse, sera présentée en ciblant la bioénergétique au niveau transcriptomique sur différentes populations naturelles de flet (Seine vs Vilaine vs Mondego) ; elle a fait l'objet d'une publication dans la revue Journal of Xenobiotics (**chapitre 3**).

Deux études exploratoires menées dans le cadre du projet HQFish seront ensuite présentées. L'une concerne l'intégration de différents biomarqueurs, mesurés sur des flets adultes collectés dans deux populations présentant des contaminations chimiques contrastées (Estuaire de Seine vs Baie de Douarnenez) (**chapitre 4**). L'autre vise à explorer les outils de la protéomique haut débit, pour identifier les réponses moléculaires de flets juvéniles lors d'une expérience de « caging » en estuaires ; le but sera ici d'explorer la qualité des zones de nurseries estuariennes à micro-échelle (**chapitre 5**).

Pour conclure ce manuscrit, une discussion générale sera menée sur l'ensemble de nos travaux ; elle débouchera sur des perspectives de recherche (**chapitre 6**).

CHAPITRE I : Outils mis en œuvre

1.1 Diversité génétique des populations naturelles

Les forces évolutives

La génétique des populations s'intéresse à la question suivante : comment le polymorphisme génétique (i.e. la variation de l'ADN) est-il distribué dans et entre les populations, dans l'espace et le temps ? Notons que sur l'aire de répartition d'une espèce, nous pouvons généralement observer plusieurs populations (ou dèmes), soit plusieurs unités de reproduction présentant une certaine stabilité spatio-temporelle.

Rappelons quelques notions de base en génétique des populations. Dans le règne animal, l'ADN nucléaire est localisé dans le noyau des cellules eucaryotes sous forme de chromosomes. Il possède à la fois l'héritage paternel mais aussi maternel et de ce fait, est dit diploïde. La grande majorité du génome est non codante. Un gène est une entité fonctionnelle de l'ADN transmise du parent à sa descendance, et codant pour une protéine. Un gène est composé par une succession de régions codantes (exons) et non codantes (introns). Un locus correspond à une position physique occupée sur un chromosome ; cette position peut désigner un gène ou une région particulière de l'ADN constituée d'un ou de plusieurs nucléotide(s). Un allèle est une des formes que peut prendre un locus donné. La diversité et la structure génétique des populations naturelles sont gouvernées par quatre forces évolutives : dérive génétique, migration, sélection et mutation.

La dérive génétique désigne l'évolution aléatoire des fréquences alléliques d'une génération à l'autre. L'intensité de la dérive génétique est inversement proportionnelle à la taille de la population. Ainsi, cette force évolutive est particulièrement prégnante dans les populations à effectifs réduits. La dérive génétique conduit à une réduction de la diversité génétique, et peut notamment conduire à la perte de allèles les plus rare. Par ailleurs, la dérive génétique se déroule de façon indépendante au sein de chaque population, et conduit à un accroissement de la différenciation génétique entre les populations.

La migration (ou flux de gènes) en génétique des populations implique la migration d'individus d'une population dans une autre et leur reproduction dans la population d'accueil. La migration favorise l'augmentation de la diversité génétique intra-populationnelle à travers l'apport de nouveaux allèles, et contre-balance ainsi les effets de la dérive génétique. D'autre

part, la migration conduit à une baisse de la différenciation génétique entre les populations, en homogénéisant les fréquences alléliques entre celles-ci.

La sélection agit sur les phénotypes et n'affecte que les régions du génome participant à la réalisation des traits phénotypiques sous sélection. Différents types de sélection existent : sélection directionnelle, stabilisante, disruptive ou balancée. Selon les cas, la sélection peut tendre vers une diminution de la diversité génétique intra-populationnelle (e.g. sélection directionnelle, stabilisante), ou vers un maintien voire une augmentation de la diversité (e.g. sélection disruptive, balancée). Dans le milieu naturel, les processus sélectifs peuvent tendre vers l'adaptation locale des populations face à l'hétérogénéité environnementale. Dans le cas de populations vivant en environnements contrastés (salinité, température, pollution, prédation, densité de population, ...), les forces sélectives associées aux environnements locaux peuvent conduire à une augmentation de la différenciation génétique entre ces populations, à travers leur divergence adaptative.

La mutation conduit à l'apparition de nouveaux allèles, et permet ainsi l'augmentation de la diversité génétique intra-populationnelle. L'apparition de nouvelles mutations dans une population aboutit également à l'augmentation de sa différenciation génétique par rapport aux populations. Cette force évolutive est un processus très lent qui se produit au cours de temps évolutifs longs. La mutation a donc généralement un effet négligeable à l'échelle écologique (i.e. quelques générations).

Pour conclure, la dérive génétique, la migration et la mutation sont des forces évolutives neutres, qui affectent de façon indistincte l'ensemble du génome (y compris les régions sous sélection), alors que la sélection ne touche que certaines régions génomiques impliquées dans la réponse aux pressions sélectives. Par exemple, dans le cas de la migration, ce sont les organismes entiers qui migrent, et non des loci individuels ; c'est également le génome entier des gamètes qui est échantillonné en faible nombre pour induire de la dérive génétique. Migration et dérive constituent deux forces évolutives antagonistes, conduisant respectivement à une diminution et à une augmentation de la variabilité génétique inter-populationnelle ; ces deux forces sont amenées à atteindre un état d'équilibre.

Microsatellites

Les microsatellites sont des marqueurs génétiques très populaires en génétique des populations. Ce sont de courtes répétitions en tandem de nucléotides formant généralement

des motifs di-, tri- ou tétra- nucléotidiques. Pour une espèce donnée, la localisation de ces séquences est bien conservée au sein du génome, mais leur longueur, i.e. le nombre de répétitions, varie d'un individu à l'autre. Ces marqueurs sont localisés dans les parties non codantes du génome et sont a priori considérés comme neutres, c'est-à-dire non soumis à la sélection naturelle, et sont donc généralement employés pour étudier les effets de la migration et de la dérive génétique (Estoup *et al.*, 1998). Le taux de mutation des microsatellites est souvent très important, aboutissant ainsi à un grand nombre d'allèles, variant généralement entre cinq et 20. Ainsi, ces marqueurs sont suffisamment variables pour pouvoir comparer des individus ou des populations relativement proches génétiquement. Ce sont des marqueurs particulièrement pertinents pour réaliser des études de parenté et analyser la diversité et la structure génétique de populations ayant faiblement divergé. Les microsatellites permettent ainsi d'étudier les mécanismes de différenciation génétique à échelle spatiale fine, mais aussi les processus évolutifs récents voire contemporains (Carvahlo & Hauser, 1994 ; Grant & Waples, 2000).

Diversité génétique & taille efficace

La diversité génétique d'une population peut être caractérisée principalement par sa diversité allélique (nombre moyen d'allèles par locus) et par son hétérozygotie moyenne sur l'ensemble des loci (hétérozygotie observée, et hétérozygotie attendue selon l'équilibre de Hardy-Weinberg).

La diversité génétique garantit le potentiel évolutif futur des populations, et donc leur survie à long-terme. Sachant que cette diversité peut être fortement réduite dans les petites populations en raison d'une dérive génétique forte (Belfiore & Andersen, 2001 ; Hubert-Vincent, 2007), l'estimation de la dérive est donc un paramètre important à prendre en compte pour évaluer les risques pesant sur le futur des populations. En génétique de la conservation, l'intensité de cette dérive génétique est déterminée à travers l'estimation de la taille efficace (Hare *et al.*, 2011), afin d'évaluer le potentiel évolutif des populations.

L'effectif efficace, ou taille efficace (N_e), défini par Wright (1931 ; 1938) représente l'effectif d'une population idéale pour laquelle la dérive génétique serait équivalente à celle observée dans la population réelle. Basiquement, la taille efficace peut être calculée en fonction du nombre de mâles (N_m) et de femelles (N_f) se reproduisant effectivement, et de la

taille réelle de la population (N_c ; « census size »). D'après Hartl & Clark, (1989) N_e est défini par l'équation suivante :

$$N_e = \frac{4 N_m N_f}{N_c}$$

La taille efficace est dépendante du nombre d'adultes reproducteurs mais aussi de la variance du succès reproducteur. Dans le cas d'une population théorique où tous les individus participeraient de la même façon au processus reproductif, sa taille efficace serait égale à l'effectif réel (N) des reproducteurs recensés ($N_e = N$) ; cette situation n'est jamais observée dans la nature. Dans une population naturelle, tous les individus ne participent pas de la même manière à l'effort reproducteur, certains individus de la population pouvant avoir plus de descendants et d'autres nettement moins. La variance du succès reproducteur tend à diminuer N_e ; elle peut être engendrée par un sex-ratio déséquilibré au sein de la population, un régime de reproduction et de dispersion asynchrone entre mâle et femelle, une instabilité environnementale. L'effectif de la population qui détermine l'intensité de la dérive génétique (N_e), est souvent très inférieur à l'effectif total du nombre de reproducteurs (N). En effet, dans une population naturelle, l'effectif produisant une descendance viable et fertile peut être extrêmement variable suivant les années ; il est généralement considérablement plus faible que le nombre de géniteurs dans les populations marines ($N_e \ll N$ adultes), en particulier chez les téléostéens (Hauser & Carvalho, 2008 ; Chevolot *et al.*, 2008 ; Dudgeon *et al.*, 2012 ; Waples, 2016).

En résumé, de façon simplifiée et plus intuitive, **la taille efficace peut être considérée comme un estimateur du nombre de géniteurs qui ont une descendance viable et fertile dans une population donnée, et peut être considérée comme un estimateur de la vulnérabilité à long terme des populations.**

Estimation de la taille efficace

En biologie de la conservation, une des problématiques majeures pour conserver une population de petite taille est de déterminer l'intensité de la dérive génétique. L'estimation de la taille efficace permet justement d'intégrer les effets de la dérive génétique sur les populations et d'évaluer le potentiel évolutif futur de celles-ci. Afin de pouvoir évaluer l'intensité de la dérive génétique et ainsi déterminer le potentiel évolutif des populations, de

nombreuses méthodes ont été développées pour estimer N_e . Les principales approches sont présentées ici.

La **taille efficace basée sur la consanguinité** (« Inbreeding effective size », N_{ef}) porte sur la **perte de variation des fréquences alléliques**, due à la dérive, entraînant une **augmentation de l'identité entre gènes**. (Vitalis, 2001 ; De Meeûs, 2012). Rappelons que la consanguinité est la probabilité que deux allèles choisis au hasard dans une population (pas nécessairement chez le même individu) soient identiques par ascendance. La consanguinité conduit à une perte d'hétérozygotie dans la population, et son intensité augmente lorsque la taille de la population diminue. En mettant en évidence la perte probable d'hétérozygotie due à la consanguinité, N_e peut ainsi être estimé. Cependant, cette méthode nécessite de connaître le pedigree des reproducteurs et/ou d'avoir des données historiques sur la population étudiée. Nous ne disposons généralement pas de ce type d'informations sur les populations de poissons *in natura*, empêchant donc la mise en œuvre de cette méthode.

Quant à elle, la **taille efficace basée sur la variance** (« Variance effective size », N_{ev}), est une méthode qui porte sur les fluctuations temporelles des fréquences alléliques (De Meeûs, 2012). Cette approche est basée sur l'**augmentation de la variance des fréquences alléliques** entre sous-populations, en raison de la dérive génétique. Elle mesure la rapidité avec laquelle les fréquences alléliques sont susceptibles de changer et avec laquelle les sous-populations isolées divergent les unes des autres, sous le seul effet de la dérive génétique (Harmon & Braude, 2010). Cette approche nécessite l'emploi d'échantillons temporels espacés de plusieurs générations. Toutefois, l'obtention de tels échantillons temporels n'est pas aisée pour de nombreuses populations naturelles.

Plus récemment plusieurs méthodes ont été développées pour estimer la taille efficace **à partir d'un échantillon unique multilocus à un instant t**. Trois de ces méthodes sont présentées ci-dessous.

Tout d'abord, la méthode basée sur le **déséquilibre de liaison DL** (LD pour « Linkage disequilibrium » en anglais) entre loci dans une population s'appuie sur l'association non aléatoire entre les allèles de différents loci, au sein d'une population (Bartley *et al.*, 1992). La consanguinité, une petite taille de population (dérive génétique), une absence de panmixie, un mélange de populations ou une pression de sélection peuvent induire une augmentation

du DL (Fig.9). Les recombinaisons par reproduction aléatoire au fil des générations, les mutations ou l'apport de nouveaux génotypes par migration peuvent conduire à réduire le DL.

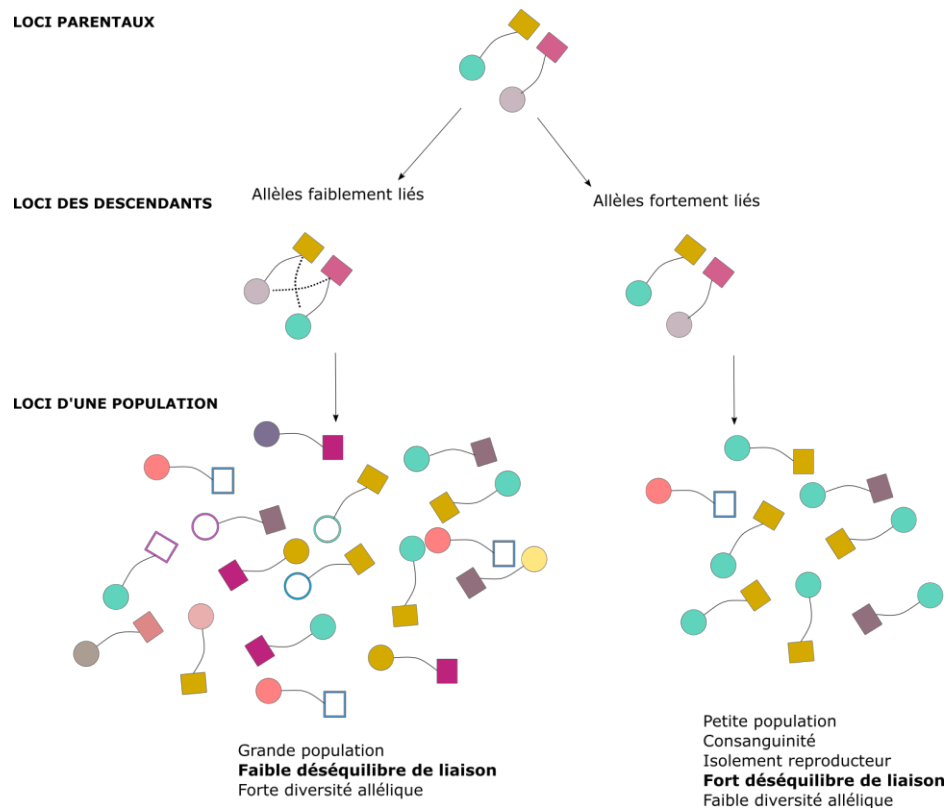


Fig. 9 : Schéma explicatif du déséquilibre de liaison (DL). Si on prend deux loci parmi les descendants, il se peut qu'ils héritent d'allèles fortement ou faiblement liés, selon le degré de déséquilibre de liaison (liaison physique entre loci, système de reproduction, mutation etc). Ce concept s'applique à la population entière. Dans une population, qui suit l'équilibre d'Hardy-Weinberg, on s'attend à ce qu'il y ait une association aléatoire entre les allèles de deux loci, ie pour des allèles faiblement liés. Dans ce cas, on a une diversité allélique plus forte, représentée par la diversité de couleurs (à gauche). A l'inverse, si la population n'est pas à l'équilibre, comme c'est le cas d'une petite population isolée génétiquement, où la reproduction n'est pas aléatoire, il y a plus de probabilité pour que les allèles soient fortement liés, le DL sera grand et la diversité allélique faible représentée par les couleurs homogènes (à droite).

La formule d'estimation de N_e à partir du DL (Bartley *et al.*, 1992) a été à l'origine décrite par Hill (1981) puis simplifiée par Waples (1991) :

$$N_e(D) = \frac{1}{3 \times (r^2 - \frac{1}{S})}$$

D : mesure du DL (indice de Burrow)
S : taille de l'échantillon
r : corrélation entre allèles

$$r = \frac{D}{(p \times (1-p) \times q + (1-q))^{\frac{1}{2}}}$$

p : fréquence de l'allèle A au locus 1
q : fréquence de l'allèle B au locus 2

Cette estimation repose sur une population idéale, de taille constante, à générations discrètes, avec reproduction aléatoire, au sex-ratio constant, et présentant une contribution

égale de chaque individu à la génération suivante, sans mutation, sans migration et sans sélection. Ce modèle considère que la taille de la population N est le paramètre majeur qui conditionne son évolution. Plus N est grand, plus le nombre de générations attendues avant la fixation d'un allèle à un locus l'est. En revanche, plus N est petit, plus la variance des changements de fréquences alléliques, le taux de réduction de l'hétérozygotie et de DL sont grands.

D'autre part, la **méthode d'excès en hétérozygotie EH** (ou HE pour « heterozygosity excess » en anglais ; Pudovkin *et al.*, 1996) est basée sur le taux d'hétérozygotie observée. Cette approche repose sur l'observation d'une plus grande variation des fréquences alléliques entre mâles et femelles lorsque le nombre de reproducteurs est petit, suite à un goulot d'étranglement par exemple (Luikart & Cornuet, 1998), engendrant alors un EH observé par rapport à l'hétérozygotie attendue dans la progéniture (Robertson, 1965 ; Falconer, 1989 ; Zhdanova & Pudovskin, 2008).

La méthode basée sur le DL donne la plupart du temps des sous-estimations pour des populations de petites tailles (England *et al.*, 2006, Waples *et al.*, 2006, Waples & Do, 2008), tandis que celle basée sur l'EH donne des sur-estimations (Pudovkin *et al.*, 1996 ; Luikart & Cornuet, 1999) et semble mieux adaptée à des petites populations de 30 individus (Dudgeon *et al.*, 2012).

Enfin, la dernière méthode présentée ici est celle basée sur **fréquence de fratries** (ou « Sibship frequency », en anglais). Elle consiste à identifier la fréquence de relations de parenté entre frères et sœurs parmi un échantillon de progéniture, sans avoir accès aux génotypes parentaux (Wang, 2004 ; Ackerman *et al.*, 2017). Cette méthode repose sur la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard, aient un lien de parenté (plein frères, sœurs, ou demi-frères, demi-sœurs) (Wang, 2009). Si N_e est petit, il y a de forte chance de trouver des liens de parenté dans la descendance, alors que si N_e est grand, la probabilité sera faible (Ackerman *et al.*, 2017).

La description de toutes les méthodes d'estimation de N_e est loin d'être exhaustive. Devant le large éventail de choix dont dispose la communauté scientifique, il est important de cibler les objectifs et de bien poser la question initiale. Du choix de la méthode dépendra l'interprétation des résultats. En reprenant l'exemple des deux premières méthodes présentées dans ce chapitre, une population qui subit un goulot d'étranglement, a une plus faible N_{ef} (consanguinité), mais une plus forte N_{ev} (variance). Parce que N_{ef} s'appuie avant tout sur

la perte d'hétérozygotie due à la consanguinité, et prend surtout en compte les individus fondateurs de la population à un instant $t-1$, et que N_{ev} s'intéresse à la variance des fréquences alléliques dues à la dérive et dépend surtout des descendants à un instant t , les résultats de l'estimation de N_e ne pourront signifier les mêmes choses (Harmon & Braude, 2010). Toutefois, certains auteurs précisent que ces définitions auraient une moindre influence sur les valeurs estimées (De Meeûs, 2012).

Taille efficace & vulnérabilité des populations

De manière générale un N_e faible conduit à une dérive génétique forte et à une réduction de la diversité génétique, par perte d'allèles ou fixation d'allèles délétères (Fig. 10).

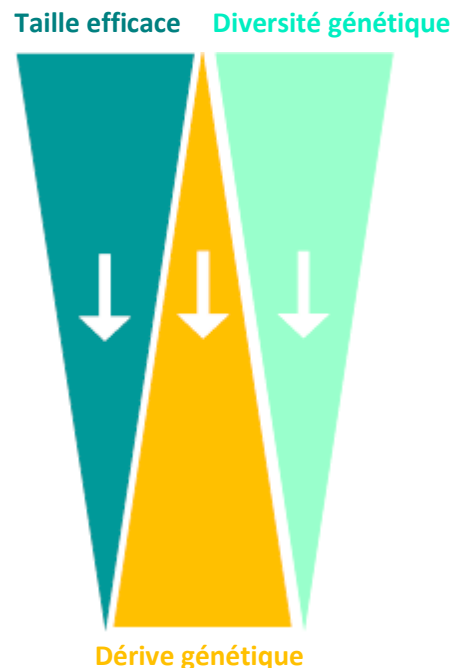
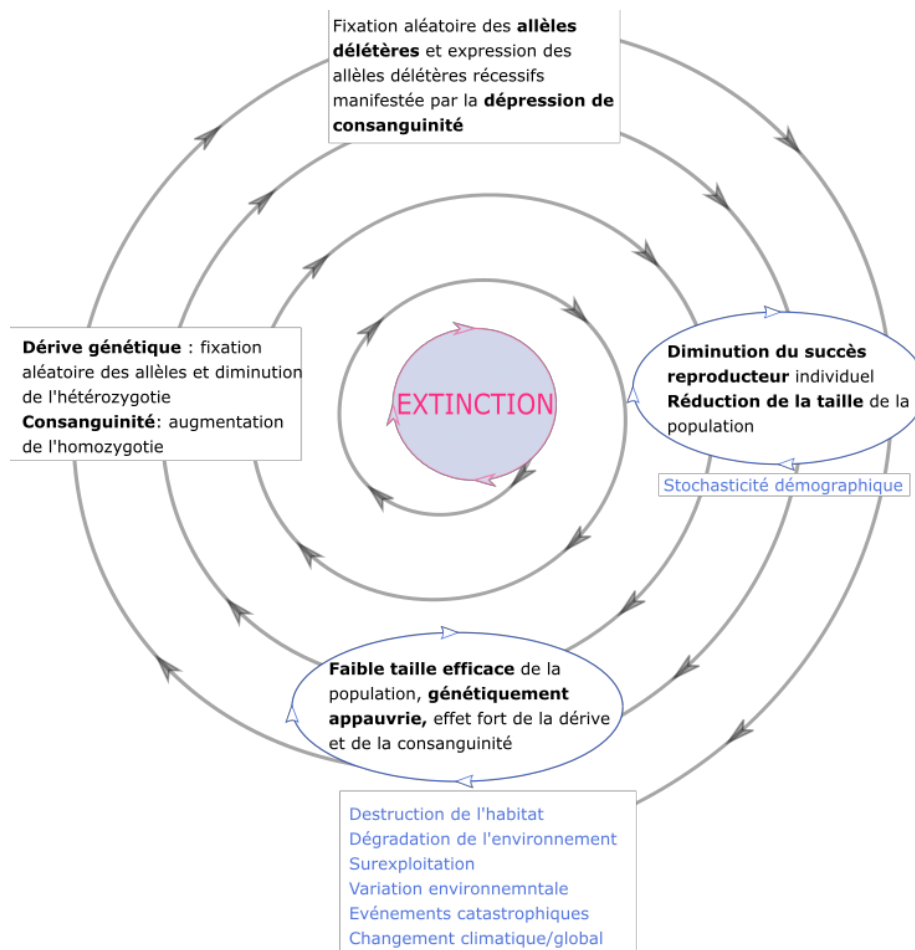


Fig. 10 : Représentation schématique des conséquences de la réduction de la taille efficace dans une population – La force de la dérive génétique est accentuée dans les populations de petite taille et peut conduire à une diminution plus ou moins rapide de la diversité génétique.

Une dérive génétique accrue peut amener une perte ou fixation aléatoires d'allèles, parfois délétères (Hoffman *et al.*, 2017). Par conséquent, une population dotée d'un N_e faible va subir alors une altération génétique (perte de variabilité génétique), qui va s'installer dans le temps (Assis *et al.*, 2013; Steeves *et al.*, 2017) et réduire la capacité des individus à se reproduire et à s'adapter. En l'absence d'un apport de nouveaux variants génétiques par migration, une telle

population est amenée à disparaître à plus ou moins long terme. Ce processus est appelé le **vortex de l'extinction** (Fig. 11 ; Harmon & Braude, 2010 ; Steeves *et al.*, 2017).



Le vortex de l'extinction fait souvent suite à des événements, successifs ou non, ayant conduit à une réduction forte de la taille de la population, comme un **goulot d'étranglement démographique** (« bottleneck » ; Fig. 12). Certains facteurs extérieurs comme des conditions environnementales défavorables, ou des pressions anthropiques, peuvent conduire à une diminution de la diversité génétique (hétérozygotie et diversité allélique) (Allendorf *et al.*, 2008 ; Pujolar *et al.*, 2011). Durant un goulot d'étranglement, la réduction du nombre d'allèles est plus forte que celle de l'hétérozygotie. Les allèles les moins fréquents sont généralement perdus le plus vite (Nei *et al.*, 1975). Un goulot d'étranglement récent peut donc être détecté par une valeur d'hétérozygotie de la population supérieure à celle attendue dans une population ayant un nombre final d'allèles sous l'équilibre mutation/dérive (De Meeûs, 2012 ; Cornuet & Luikart, 1996). C'est la raison pour laquelle on s'intéresse à l'excès en hétérozygotes

lorsque l'on veut détecter un goulot d'étranglement (De Meeûs, 2012). Après un goulot d'étranglement, la population présente une variabilité génétique différente de sa variabilité initiale. Elle pourra devenir génétiquement distincte de la population d'origine (Carson, 1990 ; Slatkin, 1996) et poursuivre son évolution, en augmentant sa diversité par mutation ou migration, (Cornuet & Luikart, 1996). Cette population peut aussi être conduite au vortex de l'extinction suite au maintien de son isolement génétique.

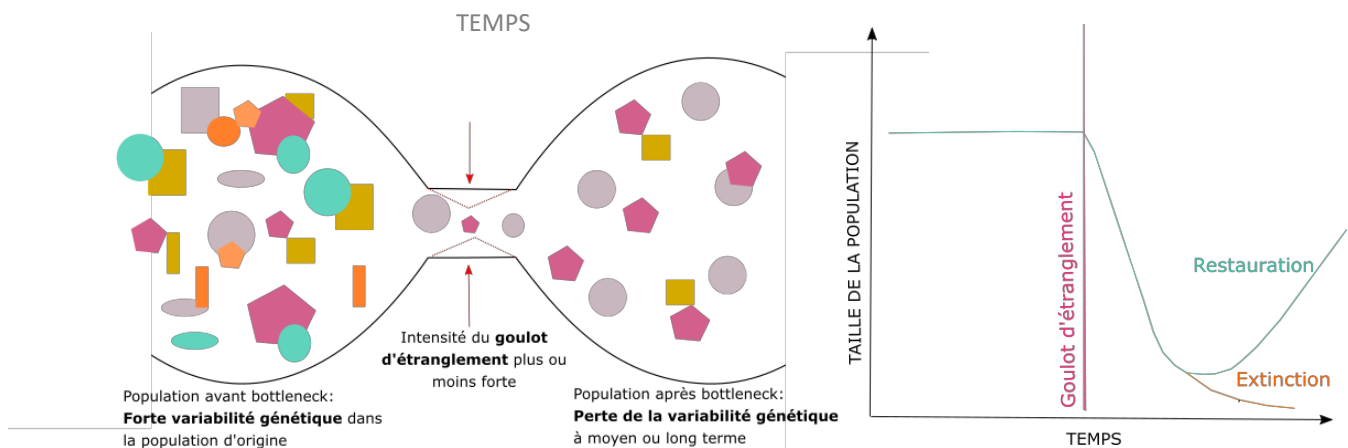


Fig. 12 : Schémas représentant les effets d'un goulot d'étranglement, **à gauche**, la perte de variabilité génétique au cours du temps (par perte d'allèles ou fixation d'allèles délétères) dans une population ayant subi un goulot d'étranglement, de plus ou moins forte intensité (inspiré de Abel *et al.*, 2015). Plus l'intensité du goulot augmente, plus la diversité génétique est faible. La diversité allélique est représentée par les formes et les couleurs, plus il y en a, plus la variabilité génétique est forte. La taille représente la dominance ou la récession des allèles, plus la taille est petite plus les allèles sont délétères ou la perte de variabilité est grande. **À droite**, le schéma représente les conséquences de la perte de variabilité génétique dans le temps au sein d'une population ayant subi un goulot d'étranglement. Soit elle retrouve une variabilité génétique lui permettant de poursuivre son évolution (restauration) ou soit la perte de variabilité se poursuit au risque que la population s'éteigne (extinction). (schéma repris de Laura Guerin (CK-12 foundation))

L'estimation de la taille efficace à partir de la consanguinité et celle basée sur la variance permettent de comprendre la règle des 50/500 introduite par Franklin (1980), qui définit un seuil de taille efficace en-dessous duquel la population risque de s'éteindre. D'une part, le seuil pour un maintien à court terme d'une population est fixé à $N_{ef} = 50$, et concerne le nombre minimal d'individu efficace pour minimiser la dépression consanguine. D'autre part, le seuil pour un maintien à long-terme est fixé à $N_{ev} = 500$, et correspond à la taille efficace minimale pour limiter la perte de diversité génétique par dérive, et ainsi maintenir le potentiel évolutif de la population. La règle du 50/500 est cependant très controversée, et des seuils. Lande (1995) a par exemple déterminé un seuil de N_{ev} à 5000. Plus généralement, il a été considéré que des effectifs plus importants que ceux préconisés par la règle des 50/500 étaient nécessaire pour maintenir la diversité génétique d'une population, et permettre sa

survie à long terme (Reed & Bryant 2000). Ainsi, selon Frankham *et al.* (2014), un $N_e=50$ risque de conduire à une dépression de consanguinité au bout de 5 générations, et un N_e supérieur à 1000 est nécessaire pour maintenir une diversité génétique sur plusieurs générations (Frankham *et al.*, 2014). Ces seuils pourraient devenir des outils de gestion de populations en danger, pour les biologistes de la conservation.

Approche démo-génétique chez le flet européen

Les trois dernières méthodes (DL, excès en EH, reconstruction de fratries) ont été employées dans notre étude pour estimer la taille efficace. Le choix dépendait de notre échantillonnage, de la disponibilité des données, et surtout de la question posée. Le but affiché ici était de déterminer **si la population de flets localisée en limite Sud de son aire de répartition, et caractérisée par une démographie déclinante (Cabral *et al.*, 2001 ; Martinho *et al.*, 2013), présente une réduction significative de sa taille efficace relativement à une population démographiquement active située plus au Nord**. Pour répondre à cette question, deux populations ont été comparées, l'une au Sud de l'aire de distribution du flet, collectée dans l'estuaire du Mondego sur la côte Atlantique du Portugal, l'autre provenant de l'estuaire de Vilaine, dans le Golfe de Gascogne. Dans cette thèse, environ 250 flets 0+ échantillonnés par population en septembre-octobre 2010 ont été génotypés sur 20 marqueurs microsatellites.

1.2 Approche en bioénergétique

La **respiration cellulaire** est une de voies essentielles de la production d'énergie. Elle est dite aérobie en présence d'oxygène et permettra la dégradation complète du glucose, s'en suivant une production d'eau et de dioxyde de carbone, tandis qu'en absence d'oxygène, elle est dite anaérobie. Trois processus clés participent à cette production d'énergie cellulaire, dont la finalité est la production du principal fournisseur d'énergie, l'ATP (Adénosine Triphosphate) : la **glycolyse**, le **cycle de Krebs** et la **chaîne respiratoire (Fig.13)** (Willmer *et al.*, 2009 ; Maes, 2014).

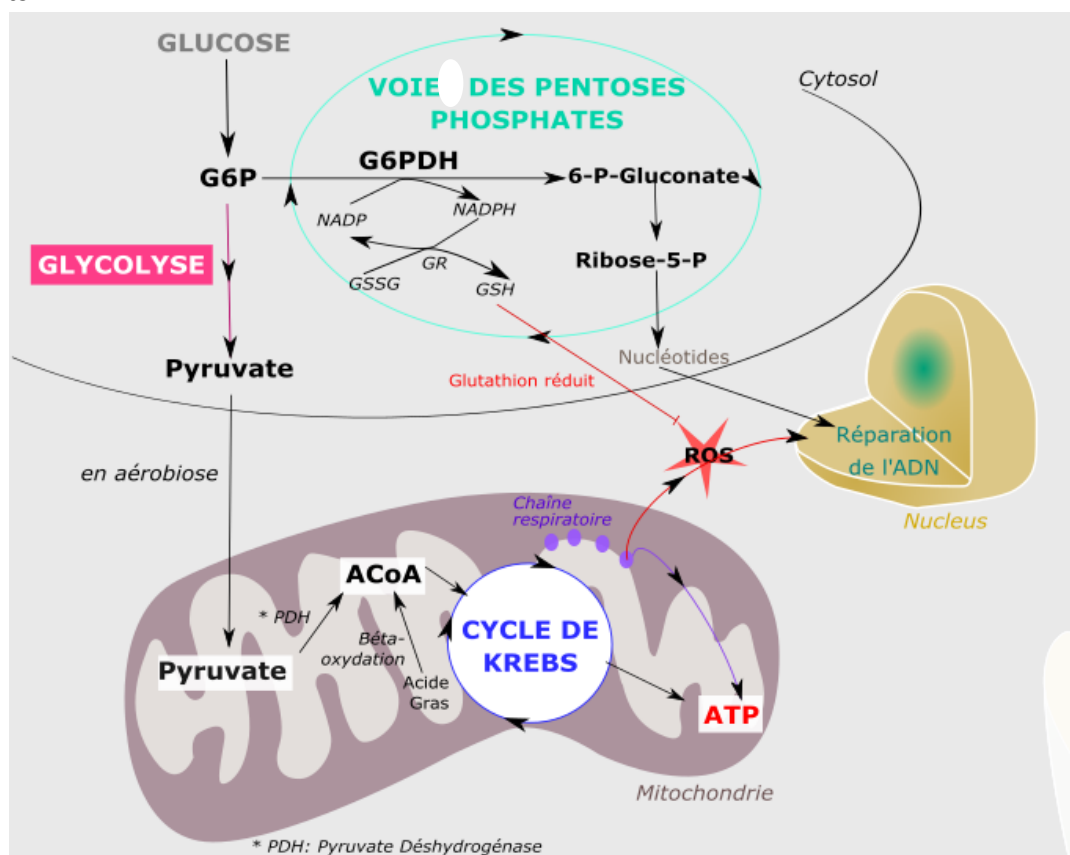
La **glycolyse** qui se déroule dans le cytosol est une de premières étapes permettant la dégradation du glucose, la formation de métabolites intermédiaires utilisés par d'autres voies métaboliques et, *in fine*, la production d'ATP. Elle divise une mole de glucose en deux moles

de pyruvate, son produit final. Lors de cette phase le NAD^+ (Nicotinamide adénine dinucléotide) est réduit en $\text{NADH} + \text{H}^+$. Le bilan énergétique net de cette réaction est la production de deux molécules d'ATP, deux NADH et deux pyruvates. Une autre voie métabolique du glucose qui nous intéresse particulièrement dans cette étude est la **voie des pentoses phosphates**. Elle se déroule aussi dans le cytosol mais à l'inverse de la glycolyse, elle est indépendante de l'oxygène, ne produit pas d'ATP, ni de NADH. Cette voie permet à partir du glucose 6-phosphate (G6P) de générer du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), et fournit du ribose 5-phosphate (Horecker *et al.*, 1951 ; Kruger & Schaewen, 2003). Le NADPH est indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse (synthèse des acides gras et stéroïdes) et dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène (en anglais, ROS pour « Reactive Oxygen Species ») produites par la respiration mitochondriale. En effet, la glutathion réductase (GR), l'une des enzymes anti-oxydantes, se situe en première ligne de la défense contre les ROS : elle utilise le NADPH comme donneur d'électrons pour régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir du glutathion-disulfure (GSSG) (Mates *et al.*, 1999 ; Powers & Lennon, 1999 ; Garait, 2006). Ce processus permet de maintenir la fonction de la glutathion peroxydase (GPx), enzyme antioxydante présente dans le cytosol et la mitochondrie. Le ribose 5-phosphate est un précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques, de l'ATP et des coenzymes (pyridiniques, flaviniques, coenzymes A). Cette voie se divise en deux grands segments, le segment oxydatif irréversible et le non-oxydatif réversible. Cette thèse s'intéressera au segment oxydatif dont la première étape est une réaction d'oxydo-réduction catalysée par la **glucose 6-phosphate déshydrogénase** (G6PDH) (Zhang *et al.*, 2000) : G6P transformé en 6-P-Gluconateribose, puis en ribose 5-phosphate, ceci conduisant à la formation de deux molécules de NADPH et une de CO_2 .

La mitochondrie est le principal organe qui produit de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate), directement utilisable par la cellule (Amérand, 2006). Elle est indispensable au bon fonctionnement cellulaire. Elle est constituée d'une double membrane délimitant un compartiment soluble, la matrice qui abrite des réactions telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation. C'est dans les mitochondries que se déroule le deuxième grand processus de la production d'ATP qui nécessite la présence d'oxygène, c'est le **cycle de Krebs**. A la fin de la glycolyse, les 2 pyruvates formés sont destinés à plusieurs voies selon la consommation en O_2 (Conley *et al.*, 1998). En anaérobiose lors d'un effort important, le pyruvate

formera de l'acide lactique (lactate) par la lactate déshydrogénase (Alberti, 1977). En aérobie, ce sont les besoins de l'organisme qui vont déterminer le devenir du pyruvate. Soit le pyruvate sera impliqué dans la synthèse d'acides aminés. Soit, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour être transformé en Acétylcoenzyme A (ACoA) par β -oxydation des acides gras, et permet la synthèse d'un NADH, H^+ . L'ACoA constitue, d'une part, l'un des précurseurs des réactions de synthèse (métabolisme des lipides, glucides et acides gras) et, d'autre part, est la première molécule permettant les différentes réactions du cycle de Krebs conduisant à la production d'ATP. Une molécule d'ACoA permet la formation de 3 NADH, H^+ , 1 $FADH_2$ et 1 ATP. Les trois molécules de NADH, H^+ permettront la formation de 3 molécules d'ATP chacun au niveau de la chaîne respiratoire, là où le $FADH_2$ engendrera 2 ATP. Au total, 1 molécule d'ACoA permettra la formation de 12 ATP.

Le NADH + H^+ et le $FADH_2$, deux transporteurs d'électrons, vont être ré-oxydés au niveau de la chaîne respiratoire au sein de la mitochondrie, et transportés vers différents complexes selon une succession de réactions d'oxydoréductions jusqu'à leur accepteur final, l'oxygène. Le catabolisme des glucides, acides aminés et acides gras mène à la formation d'équivalents réduits.



La chaîne respiratoire se compose de 4 complexes enzymatiques (I, II, III, IV) et de deux éléments mobiles (ubiquinone ou coenzyme Q_{10} et cytochrome c) (Amérand, 2006 ; Garait, 2006 ; Maes, 2014). La phosphorylation oxydative est le couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la formation d'ATP à partir d'ADP (Adénosine Diphosphate) et de phosphate inorganique (phosphorylation). C'est la force proton-motrice utilisée par l'ATP synthase qui permettra de transférer l'énergie au cours de ce couplage (Mitchell, 1961). L'ensemble des complexes assurant la phosphorylation oxydative se trouve dans la membrane interne mitochondriale (Fig. 14).

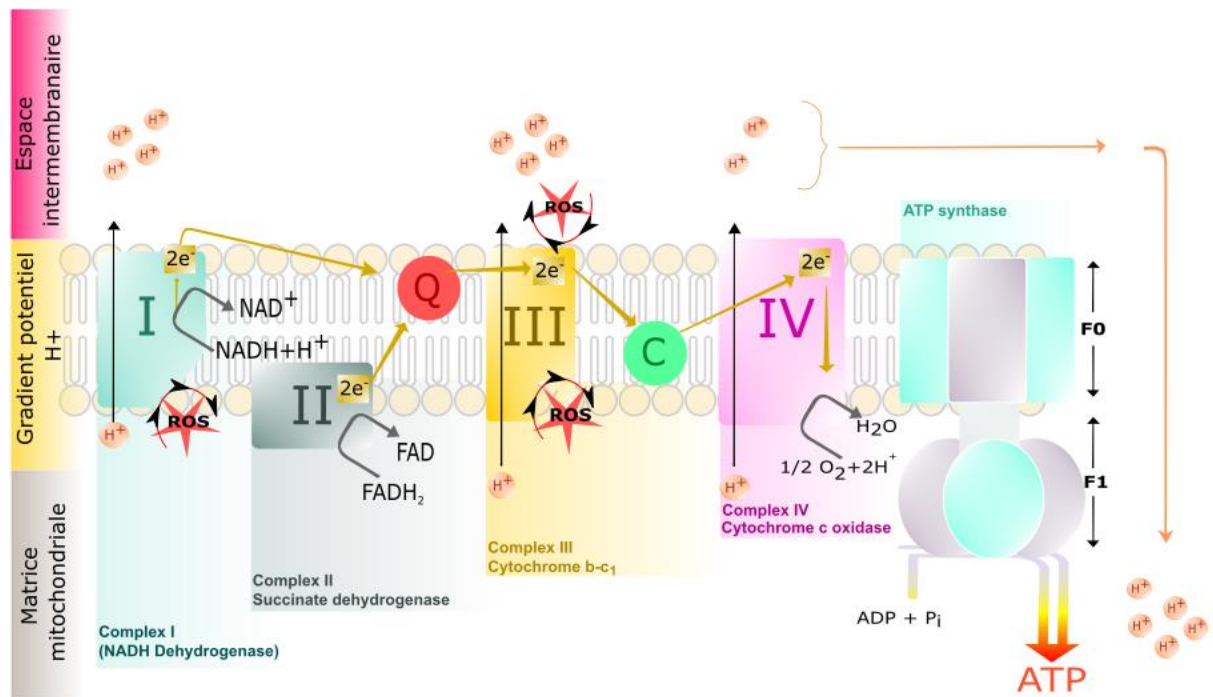


Fig. 14 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative grâce à 4 complexes et à l'ATP synthase (ATPase), Q : ubiquinone, C : cytochrome C, « ROS » : site de production d'espèces réactives en oxygène, H^+ : protons, F_0 : sous-unité F_0 de l'ATPase, F_1 : sous-unité de l'ATPase (inspiré de Balaban *et al.*, 2005 et Maes, 2014).

Les étapes principales de la phosphorylation oxydative sont représentées dans la figure 14 et sont décrites ci-dessous :

Complexe I (ou NADH ubiquinone oxydoréductase) permet le transfert initial de deux électrons transportés par le $NADH + H^+$ vers l'ubiquinone. Ce transfert est couplé à un transfert de proton (H^+) contre gradient, de la matrice vers l'espace intermembranaire où la concentration en H^+ devient plus importante que dans la matrice.

Complexe II (ou succinate ubiquinone oxydoréductase) assure le transfert de deux électrons vers l'ubiquinone, par l'oxydation des flavines $FADH_2 \rightarrow FAD$. Il n'y a pas ici de transfert de H^+ vers l'espace intermembranaire.

Complexe III (ou complexe b-c1) permet le transfert d'électrons vers un deuxième transporteur mobile, le cytochrome c. Il se produit un transfert de H^+ vers l'espace intermembranaire. Le cytochrome c achemine les électrons vers le complexe suivant.

Les ubiquinones sont des transporteurs d'électrons mobiles qui font le lien entre les deux premiers complexes et le complexe III. A ce niveau, il existe une fuite d'électrons responsable de la production de ROS. 90% des ROS cellulaires seraient produits par la chaîne respiratoire mitochondriale (Balaban *et al.*, 2005)

Complexe IV (ou cytochrome oxydase, COX), la dernière enzyme de la chaîne de transport d'électrons reçoit un électron de chacune des quatre molécules du cytochrome C et les transfère en une molécule d'oxygène, qui sera réduite en 2 molécules d'eau. A ce niveau, 4 protons de la phase aqueuse interne permettent de produire de l'eau et de transférer ces 4 protons à travers la membrane vers l'espace inter-membranaire.

La force proton motrice pourra alors avoir lieu, les complexes I, III et IV établissant un gradient de protons croissant de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Le potentiel électrochimique induit, correspondant à une forte concentration de protons dans l'espace inter-membranaire, sera utilisé pour synthétiser de l'ATP par l'**ATP synthase**.

Bioénergétique & réponses au stress

Modulation de la balance énergétique face aux stress

Le métabolisme énergétique et, notamment la production d'ATP, est directement dépendant des apports énergétiques fournis par les nutriments et les réactions cataboliques associées (Kooijman, 2010). (Fig.15). L'énergie emmagasinée sous forme d'ATP est directement utilisée par les différentes voies métaboliques.

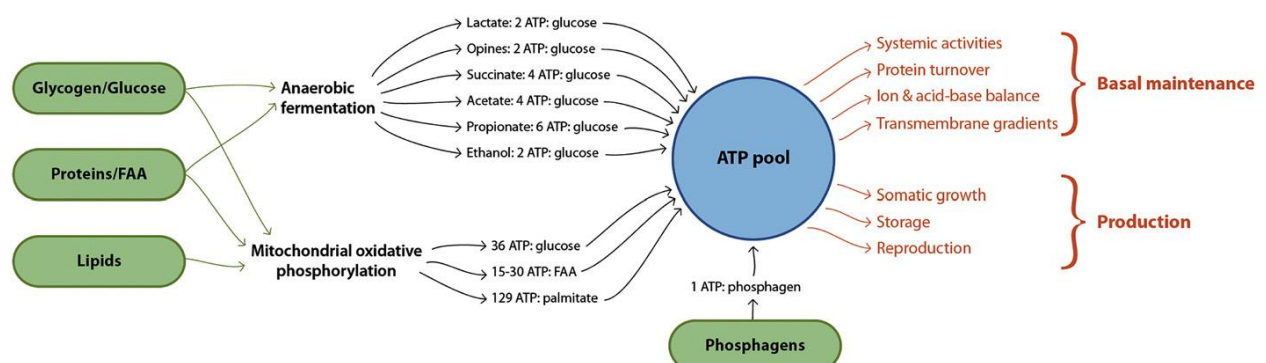


Fig. 15 : Récapitulatif des principales voies de production et de consommation d'ATP. Les carbohydrates (glycogène et glucose), les acides aminés libres (ou FAA) à partir des protéines et/ou les pools de FAA intracellulaires peuvent être oxydés par les voies aérobie ou anaérobie. Cependant, les lipides sont principalement catabolisés dans la voie aérobie. Lipides et carbohydrates constituent les principales réserves énergétiques des organismes. (Sokolova *et al.*, 2012).

L'allocation de l'énergie n'est pas distribuée de la même manière selon l'individu, l'organisme et les conditions environnementales (apports nutritionnels et facteurs abiotiques). Il existe une modulation de la quantité d'énergie en fonction des besoins spécifiques des cellules, tissus ou organes. Lorsque les organismes sont soumis à un stress, l'énergie est redirigée vers les processus de tolérance et de résistance au stress, en priorité, plutôt que vers la croissance et la reproduction (Rajotte & Couture, 2002). La gestion de l'énergie passe alors par des voies énergétiques annexes et se fait au prix de compromis énergétiques (« trade-offs ») entre la maintenance, l'activité, la croissance, la reproduction et le stockage de l'énergie (Marchand *et al.*, 2004, Smolders *et al.*, 2005 ; Sokolova *et al.*, 2012). Les réserves énergétiques, la croissance et la reproduction, peuvent se réduire considérablement si le stress se poursuit sur le long terme. La mise en place des compromis énergétiques, la modulation des voies métaboliques ainsi que l'augmentation de la capacité et/ou de la densité des mitochondries sont définis sous le terme de la balance énergétique. Face au stress, son maintien est primordial afin d'assurer une production d'énergie, même minime, et ainsi, la survie de l'organisme. **En condition optimale** (Fig.16), la balance énergétique est équilibrée. La production d'énergie est identique à sa consommation. L'énergie sera prioritairement allouée à la survie, à la reproduction et à la croissance, la mise en réserve étant moins prioritaire (Kooijman, 2010) **Les réserves énergétiques** seront stockées principalement sous forme de **lipides** et de **carbohydrates** (Sokolova, 2013) ; elles permettront de fournir de l'énergie en période de demande énergétique élevée, comme en période de reproduction, ou d'une indisponibilité alimentaire temporaire. L'énergie sous forme d'ATP est ici fournie par le métabolisme aérobie uniquement (*ie* cycle de Krebs et phosphorylation oxydative). De cette façon, les organismes sont capables de faire face aux fluctuations de leur environnement, *ie* à la variabilité de la disponibilité en nourriture comme à divers stressseurs qui induisent un accroissement de la demande énergétique (Sokolova, 2013) ; les individus présentent alors une condition physique optimale (Sokolova *et al.*, 2012). **En cas de stress modéré** (Fig.16), la demande énergétique augmente. Le coût de maintenance est alors augmenté (il inclura l'énergie consommée pour répondre au stress). On observe en conséquence une diminution

de l'allocation d'énergie vers les fonctions non vitales, comme la croissance et la reproduction. On pourra aussi observer une première diminution possible de la capacité métabolique aérobie. Notons qu'à ce stade, les organismes commencent à puiser dans leur réserve énergétique.

En cas de stress extrême (Fig. 16), la demande énergétique pour la maintenance dépasse la quantité d'énergie disponible. L'apport d'énergie par la voie aérobie n'étant pas suffisante, elle se retrouve compensée par une anaérobiose partielle. Ce mécanisme de compensation métabolique permet de produire une quantité d'ATP juste suffisante pour couvrir les coûts de maintenance et la survie des organismes, à court terme. Ce processus est nommé « dépression métabolique » et peut assurer la survie d'un organisme, de quelques jours à plusieurs mois. Si le stress perdure, et/ou que cette compensation est insuffisante, l'organisme entre en « arrêt métabolique », la demande énergétique et l'approvisionnement

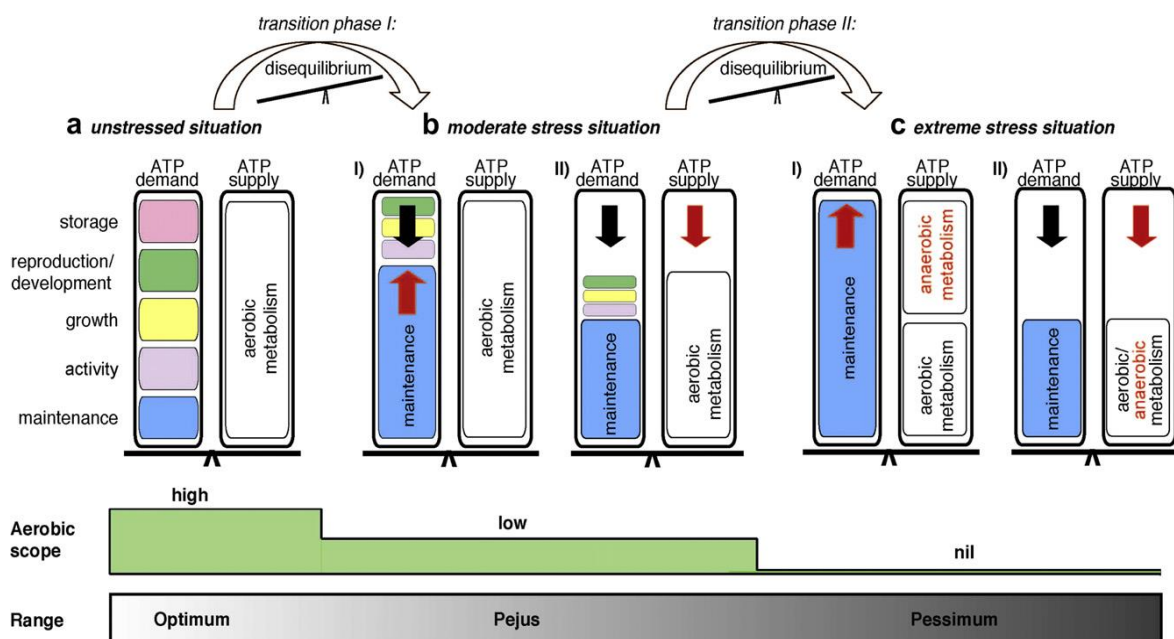


Fig. 16 : Répartition de la demande énergétique et de l'approvisionnement du métabolisme en ATP en fonction de la tolérance du métabolisme face au stress. a/ L' « optimum » correspond aux conditions normales sous lesquelles le métabolisme aérobie permet la production d'ATP et couvre les coûts de maintenance, l'activité, la reproduction, la croissance. L'excès d'énergie est alors mis en réserve en prévision d'une demande énergétique plus élevée. La forme physique de l'organisme est optimale et les coûts énergétiques normaux. b/ Le « pejus » correspond à un stress modéré. Soit les coûts de maintenance augmentent afin de couvrir la demande énergétique supplémentaire dont le but est de se protéger contre le stress et de réparer les dommages (bI). Soit l'agent de stress altère le métabolisme ou l'assimilation alimentaire (bII). La voie aérobie est moins utilisée et diminue, des compromis énergétiques se font pour couvrir les coûts de maintenance, et permettre la survie. L'énergie stockée est ici utilisée. c/ Le « pessimum » concerne une situation de stress extrême. Soit il y a une augmentation de la demande en ATP pour permettre la maintenance (cI) soit le métabolisme aérobie va se dégrader progressivement (cII). Le métabolisme passe à une anaérobiose partielle pour alimenter les coûts de maintenance et permettre la survie à court terme. Pour maintenir cet équilibre, beaucoup de fonctions sont exigeantes en ATP sont closes. Cette situation est permise et limitée dans le temps (quelques jours à plusieurs mois). Au-delà, c'est la mort assurée de l'organisme. (tiré de Sokolova *et al.*, 2012).

en énergie ne concordent plus et conduisent à la mort de l'organisme (Fig. 16) (Sokolova *et al.*, 2012).

En résumé, plus le stress augmente en durée et en intensité et plus le coût énergétique du maintien de l'homéostasie et de l'induction des systèmes de défense et de réparation des dommages seront importants. Des stratégies de compensation métabolique peuvent alors se mettre en place (Sokolova *et al.*, 2012). La réduction ou l'arrêt de la mise en réserve de l'énergie peut donc être utilisé comme un indicateur de stress modéré du milieu. En conditions fortement stressantes, l'épuisement de la réserve énergétique est considéré comme un indicateur d'une transition bioénergétiquement insoutenable, pouvant conduire à la mort, si la situation se prolonge (Sokolova, 2013). Différents marqueurs liés au métabolisme énergétique peuvent déterminer la stratégie métabolique employée par l'organisme et donc ses limites de tolérance. Les capacités énergétiques des organismes peuvent donc se mesurer à travers l'étude des voies aérobies et anaérobies ainsi que de la balance énergétique, face aux fluctuations de leur environnement naturel ou face à un stress environnemental (stress thermique, hypoxie, pollution,...).

Marqueurs du métabolisme énergétique ciblés chez le flet

Activités enzymatiques

La phosphorylation oxydative

La **Cytochrome C Oxydase (CCO)**, située dans la membrane mitochondriale interne chez les eucaryotes aérobies, est considérée comme un biomarqueur ayant une valeur prédictive quant au fonctionnement du métabolisme énergétique, particulièrement au niveau aérobie (Lapointe & Couture, 2010). La CCO (ou complexe IV) est un complexe protéique terminal de la chaîne respiratoire mitochondriale présent chez tous les organismes aérobiques. De nombreuses études ont montré que l'augmentation de l'activité CCO face aux polluants (métalliques, organiques...) est associée au coût physiologique lié au stress chimique (Cambier *et al.*, 2009 ; Lapointe et Couture, 2010). D'autres études établissent une corrélation négative entre la concentration de cadmium et la mesure de l'activité CCO. Plus la concentration en cadmium augmente dans le foie, plus l'activité CCO diminue (Li & Xie, 2018) chez le silure (*Silurus meridionalis*), ce qui mettrait en évidence une diminution de la capacité métabolique du foie face à la toxicité induite par de fortes concentrations en cadmium. D'autre part, il semblerait que la CCO soit tissu dépendante. Elle n'est souvent pas très ségrégeante entre

conditions stressantes et optimales chez les poissons, lorsque la mesure enzymatique s'effectue au niveau du foie (Pédrón *et al.*, 2017b) et lorsque l'expression du gène est mesurée au niveau du muscle (Dupuy *et al.*, 2015). La CCO est considérée dans notre étude comme un proxy de la **capacité métabolique du poisson à produire de l'énergie en aérobiose** (Cohen *et al.*, 2005; Pelletier *et al.*, 1994), notamment chez le flet (Dupuy *et al.*, 2015 ; Pédrón *et al.*, 2017b). Le niveau d'expression du gène CCO sera aussi quantifié dans cette thèse.

La voie des pentoses phosphates

La Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (**G6PDH**), enzyme cytoplasmique, se trouve au carrefour métabolique entre l'anabolisme (Gauthier *et al.*, 2008, Gauthier *et al.*, 2011, De Tonnac *et al.*, 2016), et les réponses antioxydantes (Grasset *et al.*, 2016). Responsable de la première étape de la voie des pentoses phosphates, elle convertit, indépendamment de la présence d'oxygène, le glucose en ribose 5 phosphate, précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et des coenzymes. De plus, elle produit de la NADPH, indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse (acides gras, stéroïdes) et à la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène produites par la mitochondrie. L'augmentation de la G6PDH est induite chez le poisson zèbre soumis à une contamination toxique par pesticides (thifluzamide) et métaux lourds (Yang *et al.*, 2017). L'augmentation de l'activité de la G6PDH est alors considérée comme un mécanisme compensatoire, induit par l'inhibition du cycle de Krebs, afin de lutter contre le stress toxique. Dans une autre étude sur le flet, les auteurs montrent une diminution de l'activité G6PDH causée par un stress thermique et hypoxique (Pédrón *et al.*, 2017b). Cette diminution serait liée à une réduction générale de l'anabolisme, et à une possible baisse de la capacité du poisson à répondre aux dommages oxydatifs. La G6PDH est généralement considérée comme un bon indicateur de l'**anabolisme** (Grasset *et al.*, 2014), qui pourrait être aussi impliqué dans la réponse des poissons au **stress oxydant** face aux contaminations métalliques (Grasset *et al.*, 2016), et au stress thermique (Enes *et al.*, 2006 ; Pédrón *et al.*, 2017a, b). Elle ne peut être mesurée avec précision que dans le foie, étant très peu active dans le muscle.

Expression de gènes

Afin de maintenir une balance énergétique stable en situation de stress, la capacité des mitochondries et/ou leur densité peut augmenter, assurant ainsi le maintien de la production d'énergie sous forme d'ATP. En environnements chauds, les capacités de ventilation et de

circulation limitées des poissons entraînent une diminution de la voie aérobie alors que la demande en oxygène des tissus est élevée (Pörtner, 2010). En environnements froids, c'est la capacité des mitochondries à synthétiser de l'ATP qui diminue ; on peut observer en conséquence une augmentation de la densité mitochondriale dans certains tissus pour compenser le ralentissement métabolique lié au froid, chez les ectothermes (Sommer & Pörtner, 2002 ; Pörtner *et al.*, 2007). Avec l'ajout de stress supplémentaires la voie aérobie peut encore diminuer. Une pollution sévère du milieu peut altérer directement les fonctions mitochondriales (Sokolova & Lannig, 2008). Il est donc probablement très pertinent d'appréhender les capacités mitochondriales d'un individu soumis aux stress, en ciblant de possibles proxys de la densité mitochondriale et de l'efficacité de la chaîne respiratoire. De plus, l'ATP est utilisée par les ARN polymérases afin de transcrire l'ADN en ARNs ribosomiques, indispensables à la traduction de l'information génétique en ARN messager (ARNm) puis en protéines. On peut remarquer que la synthèse d'ATP peut être mesurée via l'expression de l'ATP synthase, la densité mitochondriale via l'expression de l'ARN 12S mitochondrial (Desquret, 2008) et la biosynthèse de protéines via l'expression de l'ARN 18S cytoplasmique. L'**ATP synthase** est un complexe protéique formé de différentes sous-unités, dont 5 sont regroupées dans le complexe F1 (catalytique hydrophile) et 3 autres dans le complexe F0 (translocation du proton). L'ATP synthase catalyse la synthèse d'ATP couplée au transfert de protons transmembranaires. L'apport d'énergie provient du flux protonique à travers F0. L'expression de l'**ATP F₀** peut donc être considérée comme un proxy de la **production énergétique**.

L'**ARN ribosomique 18S** cytoplasmique, impliqué dans la lecture de l'ARN messager, vérifie que l'interaction soit bonne entre le codon sur le site A du ribosome et l'anticodon de l'ARN de transfert (ARNt). Ainsi, il contrôle que le décodage des ARN messagers (ARNm) soit correct. Il assure l'appariement des bons ARNt sur les codons des ARNm au cours de la traduction du message génétique en protéines. Il peut donc être considéré comme un proxy de la **biosynthèse des protéines**.

L'**ARN ribosomique 12S** détient ce même rôle indispensable au sein de la mitochondrie. Le génome de cet organelle code pour des protéines impliquées dans le transfert d'électrons et l'oxydation phosphorylante et dont la traduction sera contrôlée par cet ARN. Il pourrait être un bon proxy de la **densité mitochondriale**.

1.3 Les lipides : marqueurs de l'état des réserves d'un organisme, mais aussi de la fonctionnalité des membranes cellulaires face aux stress

Différentes classes de lipides ont été étudiées dans ce travail. Les **lipides neutres** contribuent directement au stockage énergétique. Ils sont surtout utilisés pour définir l'état des réserves d'un organisme, ie comme un proxy des capacités d'un organisme à stocker de l'énergie. Ces lipides neutres sont particulièrement représentés par les triglycérides et cires estérifiées. Dans notre travail, le rapport TG/ST (triacylglycérols/stérols) sera considéré comme un bon indicateur pour quantifier la perte de réserves lipidiques du flet en milieux pollués vs non pollués (Amara *et al.*, 2009 ; Kerambrun *et al.*, 2012).

Les **lipides polaires ou phospholipides** quant à eux sont principalement étudiés pour refléter la réponse de la physiologie d'un organisme face à son environnement. Ils ont des fonctions structurales et métaboliques au niveau des membranes cellulaires et sont principalement composés de phospholipides, de glycolipides et de sphingolipides (SPG), qui sont tous des lipides membranaires. La fluidité des membranes, la stabilité de la structure en bicouche ainsi que le fonctionnement des récepteurs membranaires dépendent directement de la nature des têtes polaires, de la longueur de la chaîne mais aussi des doubles liaisons (position et nombre) de ces acides gras. Notre étude porte sur les deux catégories de lipides, et les résultats obtenus à partir des lipides polaires permettront de répondre à notre interrogation principale : **la composition des phospholipides membranaires aurait-elle un rôle fonctionnel dans la capacité des poissons à répondre au stress chimique ?**

Le cas particulier des SPG sera principalement abordé. Ils sont reconnus comme étant un des composants majeurs des membranes cellulaires (Chianta *et al.*, 2013) par le rôle qu'ils y jouent dans les voies de signalisation cellulaire induisant la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose (ou mort programmée des cellules) (Spiegel *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2002 ; Hannun *et al.*, 2008 ; Young *et al.*, 2013 ; Texeira & Costa, 2016). Ils seraient aussi impliqués dans des processus d'acclimatation à la température et en réponse à différents stress (Hrobuchak *et al.*, 2017 ; Wen *et al.*, 2018). Le déséquilibre du métabolisme des sphingolipides serait aussi responsable de certains désordres neurologiques comme les maladies d'Alzheimer, de Huntington, et de Parkinson (Di Pardo & Maglione, 2018). Ils joueraient aussi un rôle important dans la signalisation liée au maintien des fonctions mitochondriales (Spincemaille *et al.*, 2014). Les résultats observés au cours de nos travaux

associés aux potentielles fonctionnalités des SPG, pourraient être à l'origine de nouvelles voies de recherche en écotoxicologie. Bien que très controversée (Pike, 2009), la notion de radeaux lipidiques (« lipid raft » en anglais) concerne directement les SPG. Les radeaux lipidiques sont des structures particulières de la membrane plasmique riches en cholestérol et glycosphingolipides (Fig. 17) (Pike, 2003), ces derniers sont des SPG avec divers oligosaccharides en groupe principal (« head group type » en anglais).

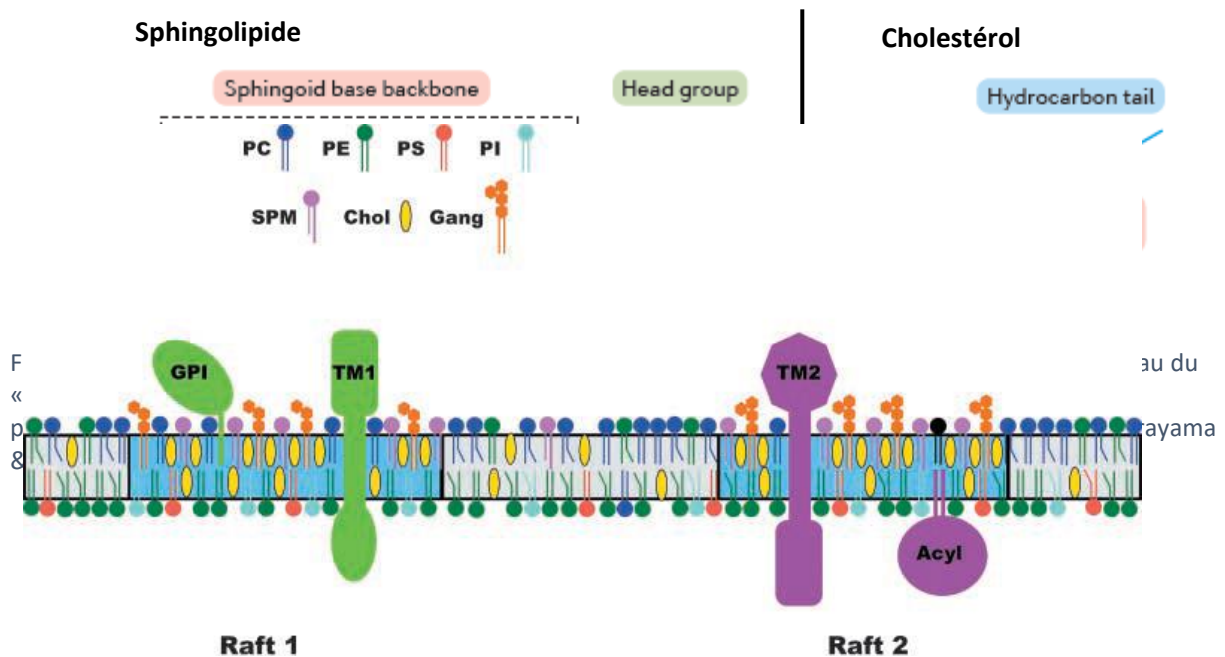


Fig. 18: Bicouche lipidique d'une membrane plasmique. Structure des radeaux lipidiques (« Lipid rafts »). Les radeaux lipidiques sont représentés par la bicouche bleue et sont composés d'une forte concentration en cholestérol (Chol), sphingomyéline (SPM), et gangliosides (Gang). Ils sont aussi enrichis en phospholipides qui contiennent des chaînes d'acyl gras saturé. Ceci confère à cette membrane une structure ordonnée, contrairement à la membrane représentée en gris qui est plus fluide car moins concentrée en Chol, SPM et Gang et composée de phospholipides à chaîne acyle insaturé. Des protéines sont présentes dans ces radeaux, comme des protéines transmembranaires (TM), deux protéines acylées (Acyl), et les protéines ancrées glycosylphosphatidylinositol (GPI). PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidylethanolamine ; PS : phosphatidylserine ; PI :

Les rafts constituent une composante structurale dynamique des membranes cellulaires intégrant des événements de signalisation et régulant le fonctionnement cellulaire dont la dérégulation peut conduire à des maladies telles que la maladie d'Alzheimer (Hicks *et al.*, 2012).

Certaines régions seraient composées d'une combinaison de glycosphingolipides et protéines (Fig. 18), ou de glyco-lipo-protéines, qui interviendraient dans certains processus cellulaires (rigidité membranaire, assemblage des molécules de signalisation, trafic de protéines membranaires). Les sphingomyélines, qui ont comme groupe principal une phosphocholine (Harayama & Riezman, 2018), sont les sphingolipides membranaires les plus abondants et

représenteraient environ 10 à 15% des phospholipides totaux de ces radeaux. Les sphingomyélines et métabolites, sont des messagers secondaires dans la transduction des signaux lors du développement, de la différenciation, et de la réponse immunitaire. Elles sont essentielles pour l'activité de certains récepteurs.

La méthode utilisée par notre laboratoire pour séparer les différentes classes de lipides, à partir des muscles blancs de flets, est la chromatographie en couche mince haute performance (dite HPTLC, « High-performance Thin Layer Chromatography »). Le travail mené sur le flet via cette méthodologie a été réalisé au sein de notre laboratoire grâce à la plateforme LIPIDOCEAN et son équipe représentée par F. Le Grand, et P. Soudant.

Ainsi, cinq classes de lipides neutres ont pu être mises en évidence : acides gras libres, les esters de stérols (ST EST), les éthers de glycérides (GL ETH), les triacylglycérols (TG, anciennement triglycérides), les alcools gras (ALC) et les stérols libres (FST). Quant aux lipides polaires, sept classes ont pu être différenciées : les cardiolipines (CL), les lypophosphatidylcholines (LPC), les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidylserine (PS), les phosphatidylinositol (PI), les phosphatidylethanolamines (PE) et les sphingolipides (SPG).

1.4 Approche sans a priori par la protéomique haut débit

Les expériences de nano LC-MS/MS ont été conduites au sein du laboratoire LI2D (Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic) du CEA-Marcoule, dans l'équipe de Jean Armengaud. Quant aux traitements de données, ils ont été réalisés au sein de notre laboratoire, avec la collaboration de Vianney Pichereau et Sébastien Artigaud.

Les approches en protéomique se sont considérablement développées ces 15 dernières années pour rechercher de nouveaux biomarqueurs de réponse des organismes face à la variabilité environnementale (Ang *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2017), et face à différents stressseurs dont les polluants chimiques (Huang *et al.*, 2017 ; Luo *et al.*, 2017, Gomes *et al.*, 2017 ; Lin *et al.*, 2018). L'intérêt de la **protéomique haut débit** (« shotgun ») en écotoxicologie est évident, cette technique permettant sans *a priori* de quantifier des centaines voire des milliers de protéines candidates sur un individu, à partir de quelques dizaines de milligrammes de tissu (Armengaud *et al.*, 2014 ; Trapp *et al.*, 2016). Ce type d'approche visant à appliquer les outils de la protéomique à l'écotoxicologie est caractérisé d'« écotoxicoprotéomique » (Bjørnstad *et al.*, 2006). Ce récent domaine, favorisé par l'innovation de la protéomique « shot-gun », n'a cessé d'évoluer durant la dernière décennie (Fig.19, Gouveia *et al.*, 2018).

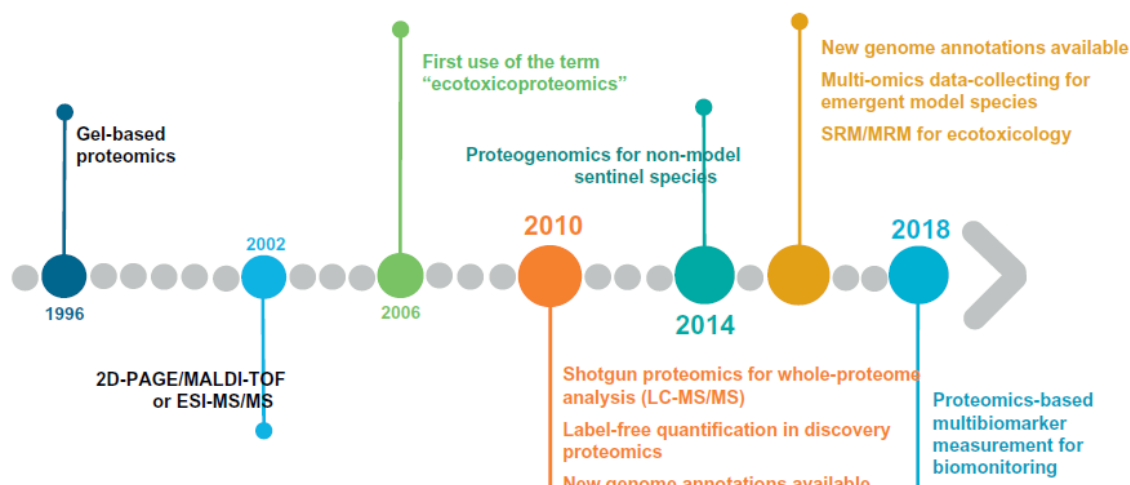


Fig. 19 : Contribution de la protéomique à l'écotoxicologie durant les deux dernières décennies (Gouveia *et al.*, 2018)

Cette approche est dite « bottom-up », partant du bas vers le haut, puisqu'elle extrait les protéines à partir d'un échantillon d'intérêt (Sinitcyn *et al.*, 2018) et vise à identifier des protéines par analyse de peptides issus de la digestion enzymatique (Liuu, 2014). Dans notre étude, le protéome du foie a été analysé à partir de 5 flets par site d'étude. L'enzyme qui a été utilisée pour réaliser la digestion est la trypsine qui permet d'obtenir des peptides de taille relativement homogène avec une bonne spécificité. Les peptides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse tandem MS/MS qui permet d'isoler et fragmenter les peptides, de mesurer la masse des fragments obtenus, et ainsi d'en obtenir la séquence en acides aminés (Chick *et al.*, 2015). A partir d'un mélange de peptides, cette technique permet de mettre en évidence des éléments de structure et de séquence pour les protéines/peptides présents dans le mélange. Cette méthode couplée à la nano-chromatographie (nanoLC-MS/MS) qui consiste en la miniaturisation des colonnes de chromatographie et d'instrumentation, a permis l'analyse d'un mélange complexe de peptides à de faibles concentrations (meilleur(e) pouvoir résolutif, sensibilité, facilité de couplage). A la suite de cette analyse, les spectres de masse obtenus sont comparés aux spectres de masse théoriques issus des séquences de protéines contenues dans des bases de données. Dans notre cas, ils ont été comparés aux protéines déduites du génome complet d'une espèce phylogénétiquement proche de *P. flesus*, ie. *Paralichthys olivaceus*. Cette phase permet l'identification et la quantification des protéines véritablement présentes dans l'échantillon (Fig. 20). En effet, les données expérimentales de

P. flesus sont comparées au génome de *P. olivaceus* ce qui permet d'établir une liste de peptides identifiés, une étape réalisée à l'aide du logiciel Mascot.

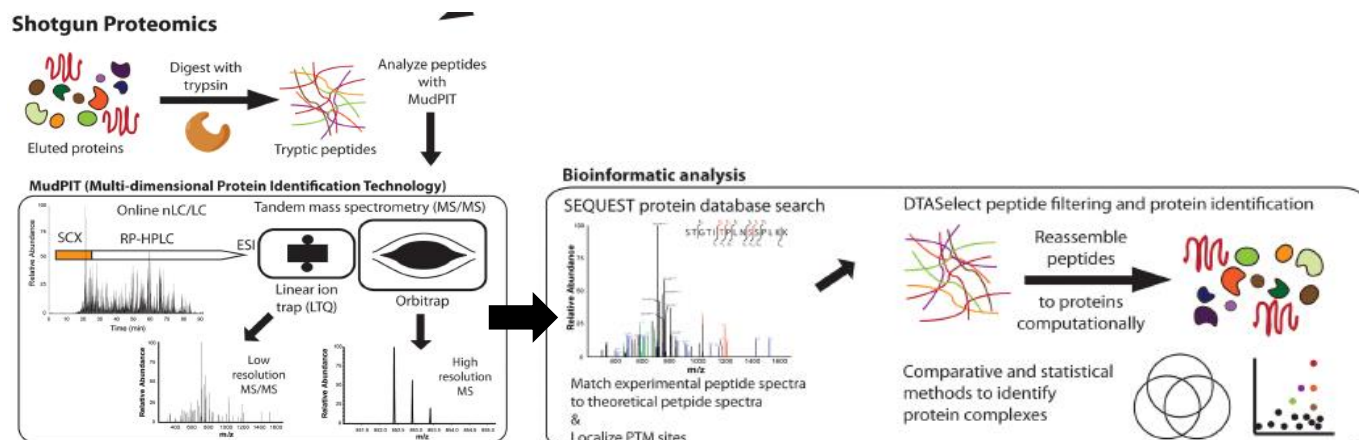


Fig. 20 : Principales étapes menées dans une démarche de protéomique haut-débit (« Shotgun proteomics »). La phase I consiste à obtenir un extrait protéique, puis à fragmenter les protéines en peptides par digestion enzymatique à l'aide de la trypsine. Les peptides tryptiques sont ensuite séparés par un système de chromatographie à nano débit (nanoLC), couplé en ligne à une source électrospray et un spectromètre de masse (de type Thermo LTQ-Orbitrap dans l'exemple décrit ici). Les peptides sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge, isolés, puis fragmentés de manière à en établir la séquence (MS/MS). L'analyse bioinformatique est ensuite lancée sur les données MS/MS afin de rechercher les adéquations entre les protéines issues de l'expérience et celles existantes dans les bases de données, au moyen de l'algorithme SEQUEST (qui peut également localiser d'éventuelles modifications post-traductionnelles (PTM) ; les protéines peuvent être ainsi identifiées. Une analyse statistique permettant de comparer les échantillons doit ensuite être effectuée (Fonslow et al., 2014).

Comme une protéine contient plusieurs peptides, et qu'un peptide peut éventuellement être affecté à plusieurs protéines, ce sont les peptides uniques qui permettent d'identifier la protéine. Ensuite, les protéines ont été analysées via le logiciel PatternLab qui réalise les tests de comparaison statistique via la méthode IRMA. Les protéines retenues dans notre analyse correspondent aux protéines ayant au moins 2 peptides, dont le Tfold >1.5 et la p-value <0.05. Le test Tfold est un des modules les plus populaires de PatternLab qui permet d'identifier, et quantifier les protéines différentiellement exprimées (Carvalho *et al.*, 2012) et vise à optimiser le choix des protéines présentes dans la liste. Suite à cette sélection, les protéines ont pu être rassemblées par comparaison entre deux sites d'étude afin d'être regroupées en grandes catégories. Pour cela, les listes de protéines avec leur numéro d'accès sont recherchées sur Blast de NCBI. On obtient une liste de noms de protéines utilisées par la communauté scientifique. Dans les bases de données en ligne telles que EggNOG ou Panther, il est possible de trouver les grandes catégories fonctionnelles (e.g. COG : « Cluster of Orthologous Group, et GO : « Gene Ontology ») de chacune des protéines.

1.5 Expérience de « caging »

L'approche en protéomique précédemment décrite a été réalisée sur des extraits de foies de flet, obtenus suite à une expérimentation de mise en cage de flets juvéniles en milieu naturel, que nous appellerons ici « caging ». Le caging a consisté à transplanter des flets juvéniles provenant d'un milieu considéré comme étant a priori peu impacté par la contamination chimique (Amara *et al.*, 2009), l'estuaire de la Canche, vers un milieu considéré comme très pollué, l'estuaire de Seine (Poisson, 2011). Les cages en Seine, ont été placées le long d'un gradient de pollution, du plus pollué en amont à Rouen, au moins pollué en aval à l'embouchure de l'estuaire de Seine. Notons que des poissons juvéniles ont aussi été placés en cage dans leur propre estuaire d'origine, la Canche, considéré comme « estuaire de référence ».

150 flets juvéniles 0+ (7-9 cm de longueur total) qui ont été prélevés en Septembre 2017 dans l'estuaire de Canche, à l'aide d'un petit chalut à perche, puis acclimatés durant 1 semaine en aquarium où ils ont été nourris journalièrement avec des *Mysidacea* et *Artemia sp* congelés. Un jour avant l'expérience, les flets ont été anesthésiés (eugénol 35 mg.L⁻¹), pesés au mg près, mesurés (longueur totale) et individuellement marqués avec un implant (1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology). Les cages ont été installées sur les différents sites les 12 et 13 Septembre 2017. Sur cinq sites expérimentés, seuls 3 sites de caging ont été retenus dans l'étude protéomique. Un site dans l'estuaire de la Canche (50° 30.982' N; 01° 37.852' E) et deux sites en Seine, un à l'embouchure de l'estuaire de la Seine dit Fosse Nord (49° 27.328' N; 00° 07.493' E), un autre à Rouen (49° 22.995' N; 01° 00.676' E) (Fig. 21). Entre 15 et 20 juvéniles ont été placés par cage, sachant que 3 cages par site ont été mises à l'eau. L'exposition a duré un mois.

Les avantages de cette technique de caging sont multiples car elle permet de sélectionner des individus homogènes (âge, nombre, taille, poids), de contrôler leur exposition (durée, saison, localisation) et permet ainsi d'optimiser la comparaison des réponses du poisson sur différents sites plus ou moins stressés (Wepener, 2013 ; Vieira *et al.*, 2017). Le couplage entre caging et protéomique shot-gun, nous paraît donc particulièrement pertinent pour identifier la qualité

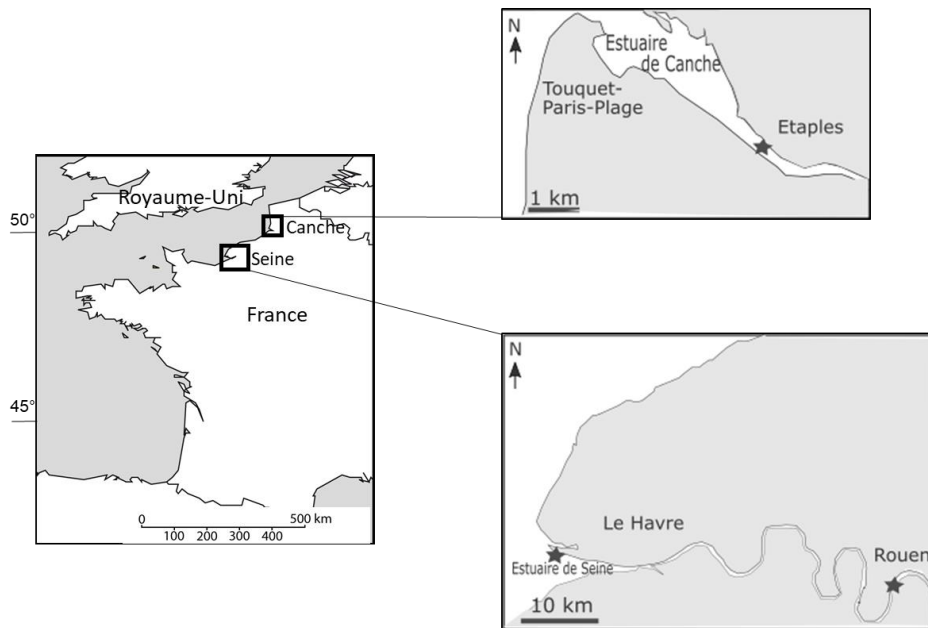


Fig. 21 : Sites de « caging » pour l'étude protéomique shot-gun, notés par une étoile. Deux sites en Seine (Rouen, Fosse Nord situé dans l'estuaire de la Seine) et un site en Canche à Etaples. (Carte inspirée et modifiée de Kazour et al. 2018)

des systèmes estuariens à micro-échelle et pour rechercher de nouveaux biomarqueurs moléculaires sur la réponse des poissons aux stress environnementaux.

CHAPITRE II : Approche Démo-génétique sur une population périphérique vs une population centrale

Introduction

Ce chapitre explore la vulnérabilité d'une population du Mondego, se trouvant en limite d'aire de répartition du flet. Les populations périphériques constituent potentiellement un réservoir de variation génétique adaptative, notamment en raison de leur histoire phylogéographique et des conditions environnementales extrêmes à laquelle elles doivent faire face (Hampe & Petit, 2005 ; Kawecki, 2008, Ledoux *et al.*, 2014). Par conséquent, ces populations périphériques peuvent présenter un intérêt majeur pour maintenir le potentiel évolutif et adaptatif de l'espèce à long -terme.

Le flet, distribué le long d'un gradient latitudinal le long de la côte Atlantique Est, constitue une excellente espèce modèle pour mieux comprendre la réponse des populations face aux variations climatiques (Marchand *et al.*, 2003 ; Calves *et al.*, 2013 ; Martinho *et al.*, 2013, Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b). De précédentes études ont montré des réponses différentielles des populations situées au sud de l'aire de répartition (Lima, Mondego) par rapport aux populations situées plus au nord (Borcier *et al.*, 2016 ; Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b). Les populations de flet, situées au sud de l'aire de distribution (Lima ou Mondego) ajustent leur métabolisme énergétique en fonction de leur environnement local (Borcier *et al.*, 2016 ; Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b), et montrent une plus grande capacité à résister aux stress chauds que les populations du nord (Pédrón *et al.*, 2017a,b). Ces résultats peuvent suggérer une possible adaptation locale des populations du Sud pour faire face au stress thermique.

Cependant, ces populations du Portugal sont également caractérisées par un déclin démographique important lié à l'impact du réchauffement climatique. En effet, l'abondance de juvéniles 0+ dans l'estuaire du Mondego a diminué ces dernières années (Martinho *et al.*, 2009) et une forte variabilité inter-annuelle du recrutement a été constatée dans cet estuaire (Cabral *et al.*, 2007, Martinho *et al.*, 2009, 2013). Un tel déclin démographique pourrait expliquer la faible diversité génétique observée dans la population du Mondego (Calvès *et al.*, 2013 ; Pédrón, 2016 ; Reis-Santos *et al.*, 2018), à travers une dérive génétique accrue.

Dans ce chapitre, nous allons donc tester l'hypothèse d'une érosion forte de la diversité génétique des populations de flets situées en limite sud d'aire de répartition en raison d'une dérive génétique induite par le réchauffement climatique. Dans cet objectif, la diversité génétique de la population périphérique du Mondego a été comparée avec celle d'une population de Vilaine située au centre de l'aire de distribution de l'espèce. Le calcul de la

diversité génétique à travers la richesse allélique et l'hétérozygotie peut permettre d'appréhender la perte de diversité génétique. Mais afin d'estimer l'intensité de la dérive génétique, la taille efficace contemporaine N_e a été estimée (Hare *et al.*, 2011). N_e peut être considéré comme un bon proxy du bon fonctionnement des populations et de leur vulnérabilité face aux changements futurs.

La taille efficace est généralement difficile à estimer dans les populations marines, en raison (1) des flux de gènes souvent importants dus au caractère dispersif du milieu marin, et (2) des tailles de populations souvent grandes. Les résultats de l'estimation de N_e sur des populations marines donnent ainsi souvent des résultats allant jusqu'à l'infini, et sont difficilement interprétables. Parmi la variété de choix proposés, seuls trois méthodes d'estimation ont été retenues pour cette étude, qui sont basées sur l'analyse d'un échantillon unique, à un instant t : excès en hétérozygotie (HE), déséquilibre de liaison (LD), reconstruction de fratries (SF).

Résultats et discussion

Parmi les trois méthodes employées pour estimer N_e , la méthode LD est apparue comme étant la plus pertinente. Sur les deux populations étudiées, à travers cette méthode, la Vilaine affiche une taille efficace allant jusqu'à l'infini et des intervalles de confiance de 1590.8 à l'infini et pourrait correspondre au fonctionnement normal d'une population marine de grande taille, avec de possibles échanges de gènes, et pas de problème démographique supposé. A l'opposé, la population du Mondego affiche un N_e de 831.6 et des intervalles de confiance allant de 481.7 à 2523.4. Ce résultat suggère clairement une très petite population au Mondego. Les méthodes HE et SF ont été testées, mais non conservées pour l'interprétation des données. En effet, la méthode HE est considérée comme surestimant les valeurs de N_e (Pudovkin *et al.*, 1996; Luikart & Cornuet, 1999; Gilbert & Whitlock, 2015), ce qui est le cas dans notre étude, N_e allant jusqu'à l'infini pour les deux populations. Cette méthode serait adaptée à des petites populations de 30 individus, ce qui n'est probablement pas notre cas (Dudgeon *et al.*, 2012). La méthode SF est réputée plus polyvalente que les autres estimateurs, mais nécessite de connaître des estimations historiques de N_e (Wang, 2016). Cette méthode, appliquée à nos données, sous-estime clairement N_e pour les deux populations.

En parallèle, de façon à savoir combien d'individus par population il est nécessaire d'échantillonner pour obtenir une estimation de la taille efficace robuste, nous avons réalisé des simulations permettant d'estimer N_e en faisant varier la taille de l'échantillon. Les résultats suggèrent que pour obtenir un résultat de N_e robuste dans une population de petite taille ($400 < N_e < 2500$) il est nécessaire d'échantillonner au moins 160 individus. En revanche, pour des populations de taille supposée grande, un effort d'échantillonnage de 245 individus n'est pas suffisant.

Nous avons aussi testé l'existence de goulots d'étranglement qui pourrait affecter la population du Mondego. Les différents tests utilisés (Bottleneck, M-ratio) n'ont montré aucun résultat significatif suggérant la signature d'un goulot d'étranglement. Nous suggérons alors que le goulot d'étranglement pourrait s'être réalisé trop récemment et/ou que le goulot n'est pas suffisamment intense, pour être détecté.

La perte de diversité allélique et la petite taille efficace estimée pour la population du Mondego, suggèrent qu'elle court un fort risque écologique. Sa viabilité à long terme pourrait être compromise face aux futurs changements environnementaux.

Conclusion

En conclusion, ce chapitre nous a montré que la population du Mondego affiche un N_e compris entre 400 et 2500, suggérant un risque possible pour le maintien à long terme de cette population périphérique. En effet, d'après Frankham *et al.* (2014), une population ayant un N_e compris entre 500 et 1000, ne pourrait pas maintenir son potentiel évolutif à long terme. En plus de sa faible taille efficace, la population du Mondego est concernée par une perte de diversité allélique, suggérant une forte dérive génétique. Il est alors possible de confirmer le risque écologique élevé qu'encourt cette population. L'approche démo-génétique employée dans cette étude confirme ainsi le risque écologique mis en évidence dans cette population par des études précédentes, en réponse au changement climatique (Cabral *et al.*, 2007, Martinho *et al.*, 2009, 2013).

Genetic signature of the recent decline of a boreal species at its southern edge: the case of European flounder (*Platichthys flesus*)

**Borcier E.¹, Handal W.¹, Martinho F.², Pardal, M.A.², Bidault A.¹, Laroche J.*¹,
Charrier G.*¹**

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

² Centre for Functional Ecology (CFE), Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal

Abstract

Rear edge populations located at low latitudes often harbor unique genetic variation, that may be of particular value for the evolutionary potential of the species. However, in many marine boreal species, rising temperatures related to ongoing global climate change are leading to poleward distribution shifts associated with a demographic decline of rear edge populations that may strongly erode their genetic diversity. European flounder (*Platichthys flesus*) is a boreal flatfish species distributed along the European Atlantic coasts, that has suffered important demographic declines at its southern distribution limit located in Portugal, for the last few decades. The present study aimed at thoroughly exploring how this decline may have led to an erosion of the genetic diversity in southern peripheral populations. To reach this objective, a southern edge population (Mondego estuary) and a central population (Vilaine estuary) were compared with a microsatellite-based study. The Mondego population displayed a lower allelic diversity than Vilaine. In addition, the contemporary effective population size (N_e) estimated according to the Linkage Disequilibrium method was relatively small in Mondego ($N_e = 775-832$, 95% CI = 479-2524), whereas it reached infinity in Vilaine. However, no signal of a recent bottleneck was detected with any of the tests conducted in the study, suggesting that the bottleneck may have occurred too recently (or may be still ongoing), and/or because that it may have not been sufficiently strong to lead to a detectable signature. Overall, small N_e and low genetic diversity reported in Mondego, may compromise the potential of this peripheral population to adapt to ongoing and future environmental changes, thus seriously threatening its long-term viability in a context of global climate change. This may be a major concern for the conservation of the evolutionary potential of *P. flesus*.

Key-words: Peripheral population, Rear edge, Genetic diversity, Bottleneck, Effective population size, Global climate change, European flounder, *Platichthys flesus*, Microsatellites

Introduction

As exposed in the “center-periphery hypothesis”, populations located at the margins of the species distribution range generally display low genetic diversity levels and higher extinction risks (Lawton, 1993; Eckert *et al.*, 2008; Cahill & Levinton, 2016). However rear edge populations located at low latitudes are often a reservoir of unique adaptive variability resulting from their phylogeographic history and/or the atypical environmental conditions they have to cope with (Orizaola *et al.*, 2010; Ledoux *et al.*, 2015; Lesica & Crone, 2017). As a consequence, rear edge populations are highly valuable for the long-term survival of species in a context of global climate change (Hampe & Petit, 2005; Kawecki, 2008).

In marine ecosystems, rising water temperatures associated with ongoing climate change (IPCC, 2014) are leading to poleward distribution shifts in many species (Perry *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2011). The thermal tolerance of species, and their ability to adapt and/or acclimate to environmental changes govern such distribution shifts (Harley *et al.*, 2006; Sunday *et al.*, 2012). For instance, in the North Atlantic, many coastal boreal species have declined at the southern edge of their distribution range (Rijnsdorp *et al.*, 2009). European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758), is a boreal flatfish species distributed along the North-East Atlantic coasts, from Portugal to Norway. This species displays a semi-catadromous life-stage and uses estuarine and freshwater habitats for extended periods of its life-cycle (Daverat *et al.*, 2012; Amorim *et al.*, 2016). The southern distribution limit of *P. flesus* is currently located along the Portuguese coast, in Tajo estuary (Cabral *et al.*, 2007). Portuguese flounder populations are genetically differentiated from those located at the center of the distribution range (Calvès *et al.*, 2013; Reis-Santos *et al.*, 2018), and exhibit also a strong physiological and phenotypical differentiation (Marthino *et al.*, 2013; Pedron *et al.*, 2017; Borcier *et al.*, 2016). In particular, contrasted energy metabolisms between flounder from Portugal and those from the Bay of Biscay and English Channel may suggest possible local adaption processes of southern populations to a warmer environment (Borcier *et al.*, 2016; Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b). However, southern edge populations of *P. flesus* have experienced a strong demographic decline in the surroundings of Lisbon, where this species

was abundant a few decades ago (Cabral *et al.*, 2001). The abundance of *P. flesus* seems negatively correlated with average seawater temperatures that occurred during the year of birth (Vinagre *et al.*, 2009; Hermant *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2016), thus suggesting an increased vulnerability of southern population of *P. flesus* with global climate warming. The recent demographic decline of European flounder at its southern distribution limit seems congruent with the lower genetic diversity exhibited by Portuguese populations (Calvès *et al.*, 2013; Reis-Santos *et al.*, 2018), that may suggest the impact of a genetic bottleneck. Following this line, a recent and abrupt erosion of the genetic diversity due to a strong increase of genetic drift may disrupt adaptive processes and thus compromise the long-term persistence of southern flounder populations. However, processes leading to a lower diversity in edge populations are diverse, and remain often poorly understood (Eckert *et al.*, 2008). For instance, a lower genetic diversity in southern peripheral populations may not only be due to a recent bottleneck, but also by their phylogeographic history.

In this context, the present study aimed at thoroughly testing whether the reduced genetic diversity reported in southern peripheral populations of *P. flesus* may be explained by their recent demographic decline associated with rising temperatures. To reach that objective, a microsatellite-based study was conducted to compare the genetic diversity between a southern edge population (Mondego estuary) and a central population (Vilaine estuary). In both populations, a large sample of 0+ juveniles collected in 2010 was genotyped with 20 microsatellites, in order to assess levels of genetic diversity and relatedness, as well as contemporary effective population sizes. In addition, traces of a recent bottleneck were explored using an array of three different methods.

Material and methods

Sampling

Juvenile flounder from the same 2010 year-class were sampled at age 0+ during fall 2010 in both Mondego and Vilaine estuaries. More than 250 fish were caught by trawling at the mouth of each estuary, and individual fin clips were collected and stored in 90% ethanol.

DNA extraction and microsatellite genotyping

DNA extraction was performed according to a phenol chloroform protocol adapted from Sambrook *et al.* (1989). DNA concentration was estimated using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and DNA samples were diluted to 20 ng·mL⁻¹ in ultrapure water for molecular biology, DNase, RNase and protease free (EMD Millipore).

A set of 20 microsatellites was successfully amplified and optimized, out of 30 published markers that were tested (Supplementary tables 1 & 2). These loci were chosen since they displayed limited departures from Hardy-Weinberg equilibrium in previous population genetics studies conducted on European flounder (Casas *et al.*, 2005; Calves *et al.*, 2013, Dixon, 2003; Fichou *et al.*, 2008; Florin *et al.*, 2008; Hemmer-Hansen *et al.*, 2007; Hoarau *et al.*, 2002; Kumari *et al.*, 1998; Pédrón *et al.*, 2015). For each locus, the forward primer was tailed with a universal primer to reduce the genotyping cost (Schuelke, 2000). Seven different universal primers that had previously proven efficient to genotype microsatellites in *P. flesus* (Calvès *et al.*, 2013; Pédrón *et al.*, 2015) were used, each of them labelled with a fluorescent dye,; Supplementary table 3). For loci suffering from excessive stuttering, a PIG-tail (5'-GTTTCTT) was added to the 5'-end of the reverse primer to avoid genotyping errors due to 'plus-A' PCR artefacts (Brownstein *et al.*, 1996; Supplementary table 1). Each locus was amplified by simplex polymerase chain reaction (PCR) in 10 µL volume, containing 5X green Go Taq reaction buffer (Promega), 0.5-1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.02 mM forward primer, 0.2 mM reverse primer, 0.2 mM universal primer (fluorescent), 0.25 U green Go Taq polymerase (Promega) and 1 µL DNA template. PCR amplifications were performed in a Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A touchdown procedure was included in the thermal cycling regime to increase the stringency of the PCRs and, for each locus, annealing temperatures were set up according to the melting temperature of the primer pair (T_{mL}) and the tailed universal primer (T_{mU}) (Supplementary tables 1 & 3): 95°C for 3 min, $T_{mL}+2^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 72°C for 30 s, (95°C for 30 s, $T_{mL}+1^{\circ}\text{C}$ for 30 s [-1°C per cycle until $T_{mU}-3^{\circ}\text{C}$], 72°C for 30 s) x 1-8 cycle(s), (95°C for 30 s, $T_{mU}-3^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 72°C for 30 s) x 28-44 cycles, 72°C for 5 min. The total number of cycles is indicated in Supplementary table 1.

The 20 microsatellites were grouped into three panels of six or seven markers, and for each panel, 3 µL of each amplified locus (except 6 µL for Nplaf_28) were mixed together (Supplementary table 1). One µL of pooled PCR products was mixed with 10µL Hi-Di formamide and 0.15 µL GeneScan 500-LIZ size standard (Applied Biosystems). The sequencing

of PCR products was carried out on a capillary sequencer ABI 3130 (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analysed with GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems), and were scored independently by two readers in order to minimize genotyping errors. Individuals with more than 50% missing data were removed from the data set, resulting in 257 individuals successfully genotyped in Vilaine and 245 in Mondego. For downstream analyses, the genotype matrix was converted into proper input files with CREATE 1.37 (Coombs *et al.* 2008).

Statistical analysis

Genetic diversity

Allelic diversity (N_a) was calculated with GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). Observed and expected heterozygosities (H_o and H_e , respectively) were assessed for each locus and over all loci in each population using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). F_{IS} were estimated for each locus and population in GENETIX in order to evaluate departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and their significance was tested with 5000 permutations. The occurrence of null alleles and genotyping errors was verified with MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). The presence of loci affected by natural selection was checked in LOSITAN 1.0.0 (50,000 simulations, stepwise mutation model, 95% confidence interval; Antao *et al.*, 2008). Subsequent demographic analyses were performed with and without the loci that were in any of these three cases: (1) significant departure from HWE, (2) signal of genotyping errors or null alleles, and (3) signature of natural selection

Relatedness

Relatedness by coancestry is defined as the probability that any two alleles sampled at random (each from a distinct individual) are identical by descent (IBD) (Malécot, 1948; Lyu *et al.*, 2017). Analyses of relatedness were conducted using COANCESTRY 1.0.1.6 (Wang, 2011). Simulations were performed in COANCESTRY in order to choose the most appropriate relatedness estimator, among those implemented in this software: five moment estimators (Queller & Goodnight, 1989; Li *et al.*, 1993; Ritland, 1996; Lynch & Ritland, 1999; Wang, 2002) and two likelihood methods (dyadic maximum-likelihood (DyadML; Milligan, 2003) and triadic maximum-likelihood (TrioML; Wang, 2007)). The first set of simulations tested the efficiency of each estimator according to three rates of genotyping errors (0.0, 0.02 and 0.05; Supplementary tables 4 & 5). The second set of simulations evaluated the performance of

each estimator in as a function of the relatedness structure of the population. To that aim, seven populations were simulated that displayed contrasted relatedness structure, varying from a large proportion of highly related individual (full- and half-sibs) to a majority of unrelated ones (Supplementary table 4). DyadML displayed the highest correlation with true values in the large majority of the simulations (Supplementary tables 6 & 7). This estimator was thus chosen to estimate the relatedness structure within each population, considering a genotyping error rate of 0.02.

Effective population size

The effective population size (N_e) was estimated according to three methods: the linkage disequilibrium (LD; Waples & Do, 2010), the heterozygosity excess (HE; Pudovkin *et al.*, 1996; Zhdanova & Pudovkin, 2008), and the sibship frequency (SF; Wang, 2009) methods. The LD method, which is the most commonly used estimator (Waples, 2006; Tallmon *et al.*, 2010; Wang, 2009, 2016; Jones *et al.*, 2016), is based on the principle that the non-random association between alleles at different loci is greater in a small population than in large ones (Macbeth *et al.*, 2013). This approach was applied using NeESTIMATOR v.2.01 (Do *et al.*, 2014), assuming random mating. In particular, NeESTIMATOR implements an improved method for dealing with missing data (Peel *et al.*, 2013), and offers the possibility to exclude rare alleles that are known to upwardly bias N_e estimates (Waples & Do, 2010). Three distinct thresholds were applied to screen out rare alleles ($P_{crit} = 0.01, 0.02$ or 0.05); however, Waples & Do (2010) recommended $P_{crit}=0.02$ as a good solution in most cases and $P_{crit}=0.01$ when using large samples sizes (>100 individuals).

The HE method builds on the negative relationship between the number of breeders and heterozygote excess in the progeny (Zhdanova & Pudovkin, 2008). This approach was conducted in NeESTIMATOR, to estimate the effective number of breeders (N_b) that produced the juvenile cohort sampled in each population.

The SF method uses the relatedness among individuals and variance in family size to estimate N_e (Wang, 2004; Ackerman *et al.*, 2017), and relies on the negative relationship between N_e and the probability for two random individuals to be related (full- or half-siblings). This approach was performed in COLONY 2.0.6.4 (Jones & Wang, 2010).

In order to test the appropriateness of the sample sizes used in the study to estimate N_e , the effect of varying sample sizes (n ranging from 10 to 245) on N_e estimates was explored in both Vilaine and Mondego. For each population, n individual multi-locus genotypes (considering 16 loci) were resampled 100 times in the data set. Using a bash script, N_e was estimated on all resampled data sets in NeESTIMATOR according to the LD method ($p_{crit} = 0.02$). In each population, the reliability of N_e estimates was evaluated by analyzing the percentage of finite N_e estimates as well as the percentage infinite values for upper and lower CI (95%).

Detection of recent bottlenecks

Three methods were applied to detect signatures of recent bottlenecks that may have occurred in each population. Three microsatellites that displayed odd-sized alleles were ignored for these tests (PFUSC7, PL142, STPFL002), in order not to violate the mutation models assumed by the methods applied here. The tests were thus performed on a reduced data set of 13 loci. However, analyses based on all 20 loci are shown in supplementary table 8.

First, recent bottlenecks (*ie* bottlenecks that occurred $<4N_e$ generations ago) were detected using the heterozygosity excess method implemented in BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). This approach is based on the principle that the number of alleles (k) is predicted to decrease faster than heterozygosity in a population that has experienced a recent reduction in N_e (Maruyama & Fuerst, 1985; De Meêus, 2012), thus resulting in an excess in heterozygotes given k . Thus, BOTTLENECK implements a sign test that compares the expected heterozygosity under HWE (H_e , calculated from allele frequencies) with the expected heterozygosity under the assumption of a constant population size (H_{eq} , calculated from k assuming mutation-drift equilibrium) (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet 1998). Three mutation models were considered: the Infinite Allele Mutation model (IAM; Crow & Kimura, 1970), Stepwise Mutation Model (SMM; Ohta & Kimura, 1973) and Two-Phase Mutation model (TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994). Most loci evolve following an intermediate model between IAM and SMM, that are considered as two extremes (see Luikart & Cornuet, 1998), and generally, TPM is considered as the more appropriate model for most microsatellites (Piry *et al.*, 1999). Two TPM models were applied, considering either 90% of single step mutations with a variance of 10% multiple steps mutations (Pujolar *et al.*, 2011), or 70% single-step mutations and 30% multiple-step mutations (De Meeûs, 2012). The occurrence of heterozygosity excess expected

after a severe bottleneck was tested with the Wilcoxon test, as advised by Piry *et al.* (1999), using 10,000 iterations.

Second, the distribution of allele frequencies was analyzed graphically in each population with BOTTLENECK, in order to test the occurrence of a mode-shift distortion resulting from a recent bottleneck that occurred the last few dozen generations (Luikart *et al.*, 1998). A frequency histogram was plotted, by grouping alleles across all loci into 10 frequency classes. This graphical method is based on the principle that alleles at low frequency (<0.1) are predicted to be the most abundant in a population near mutation-drift equilibrium (*ie* at constant size), thus resulting in a L-shaped distribution of allele frequencies. However, a bottleneck is supposed to induce a rapid loss of such rare alleles. As a consequence, a bottlenecked population is expected to display a mode-shift distortion, with fewer alleles at low frequency than at intermediate frequency.

Finally, recent bottlenecks were detected using the M-ratio method (Garza & Williamson, 2001), that calculates the mean ratio (M) between the number of alleles (k) and the range in allele size (r), across all loci. In a bottlenecked population, k is expected to decrease faster than r, thus resulting in a lower M. Values of $M < 0.68$ are interpreted as a signature of a recent bottleneck (Garza & Williamson, 2001). For each population, M was calculated manually according to the formula provided by Garza & Williamson, (2001), and then averaged over all 13 loci.

Results

Intra-population genetic diversity

The genetic diversity was very variable across loci, with N_a ranging from three (StPfl005) to 26 (Nplaf_35) in Vilaine, and from three (PFUSC3, Nplaf_14, Nplaf_30) to 23 (Nplaf_35) in Mondego (Table 1). The average allelic diversity across the 20 loci was lower in Mondego than Vilaine ($N_a = 7.7$ and 9.9 , respectively). This difference in allelic diversity seemed widespread in the genome, with 17 out of the 20 loci displaying a lower N_a in Mondego. Multilocus heterozygosities H_o and H_e were also lower in Mondego than Vilaine, even though values were very close between the two populations ($H_o = 0.578$ and 0.597 , respectively, $H_e = 0.584$ and 0.602 , respectively). Both populations followed Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and showed non-significant F_{IS} estimates when considering all 20 markers ($F_{IS} = 0.011-0.014$, p-

value > 0.05). However, significant heterozygote deficiencies were detected for some individual loci: PFUSC3 and Nplaf_28 in Vilaine, and Nplaf_8, Stpfl001 and Nplaf_28 in Mondego. According to MICRO-CHECKER, null alleles were suggested as the likely cause of each of these departures from HWE. The outlier analysis performed with LOSITAN identified StPfl001 as the only locus that could be under directional selection. The four loci that displayed

Table 1 : Genetic diversity parameters in Vilaine and Mondego populations : allelic diversity (N_a), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, and FIS estimates (5000 permutations : *: p-value<0.05, **: p-value <0.01, ***: p-value<0.001; FDR correction for multiple testing was applied). Multi-locus parameters were calculated on 20 or 16 loci. Markers that were discarded in the 16 loci dataset are indicated in bold (loci displaying significant FIS values, signal of null alleles, and/or signature of selection)

Locus	Panels	Vilaine				Mondego			
		N_a	H_o	H_e	FIS	N_a	H_o	H_e	FIS
Nplaf_8	1	6	0.413	0.432	0.045	5	0.452	0.51	0.116**
Nplaf_14	3	5	0.377	0.383	0.02	3	0.293	0.295	0.009
Nplaf_15	2	7	0.475	0.5	0.052	4	0.427	0.451	0.054
Nplaf_23	2	7	0.597	0.578	-0.031	5	0.651	0.637	-0.02
Nplaf_24	3	10	0.604	0.587	-0.03	6	0.399	0.406	0.02
Nplaf_25	3	8	0.636	0.617	-0.029	7	0.464	0.486	0.046
Nplaf_28	3	10	0.615	0.694	0.116***	8	0.656	0.733	0.108***
Nplaf_30	3	6	0.264	0.25	-0.053	3	0.326	0.332	0.02
Nplaf_35	1	25	0.923	0.922	0.001	23	0.967	0.926	-0.042
PFUSC3	1	5	0.35	0.404	0.136**	3	0.423	0.448	0.059
PFUSC4	3	6	0.543	0.528	-0.027	5	0.547	0.524	-0.042
PFUSC7	2	10	0.732	0.698	-0.046	9	0.687	0.659	-0.039
PFUSC8	1	7	0.606	0.636	0.05	8	0.592	0.595	0.008
PL142	2	23	0.881	0.909	0.033	20	0.855	0.897	0.05
StPfl001	1	26	0.799	0.82	0.027	16	0.799	0.853	0.066**
StPfl002	3	12	0.695	0.69	-0.005	8	0.776	0.746	-0.038
StPfl003	2	5	0.622	0.584	-0.064	6	0.504	0.466	-0.08
StPfl005	2	3	0.536	0.543	0.014	4	0.474	0.487	0.03
StPfl015	1	8	0.644	0.649	0.009	5	0.719	0.679	-0.056
StPfl025	2	9	0.62	0.612	-0.012	6	0.547	0.559	0.025
Number	20	9.90	0.597	0.602	0.011	7.49	0.578	0.584	0.014
of loci	16	9.44	0.61	0.6	-0.005	7.01	0.58	0.57	-0.007

a significant departure from HWE and /or seemed affected either by selection or null alleles in any of the two populations (PFUSC3, Nplaf_8, Nplaf_28 and StPfl001) were excluded for subsequent demographic analyses. The resulting set of 16 markers provided similar levels of allelic diversity (N_a = 9.4 in Vilaine and 7.7 in Mondego) and heterozygosity (H_o = 0.58-0.61, H_e = 0.57-0.60), in comparison to those obtained with 20 loci.

Relatedness

In both populations, most pairs of individuals appeared completely unrelated, with relatedness strictly equal to 0 in 49 % of pairwise comparisons in Vilaine and 48 % in Mondego. The distribution of pairwise relatedness values >0 appeared relatively comparable between the two populations (Figure 1). However, the proportion of individual pairs displaying low values of relatedness <0.20 was slightly larger in Vilaine, while the proportion of pairwise relatedness estimates ≥ 0.20 was somewhat larger in Mondego.

Effective population size

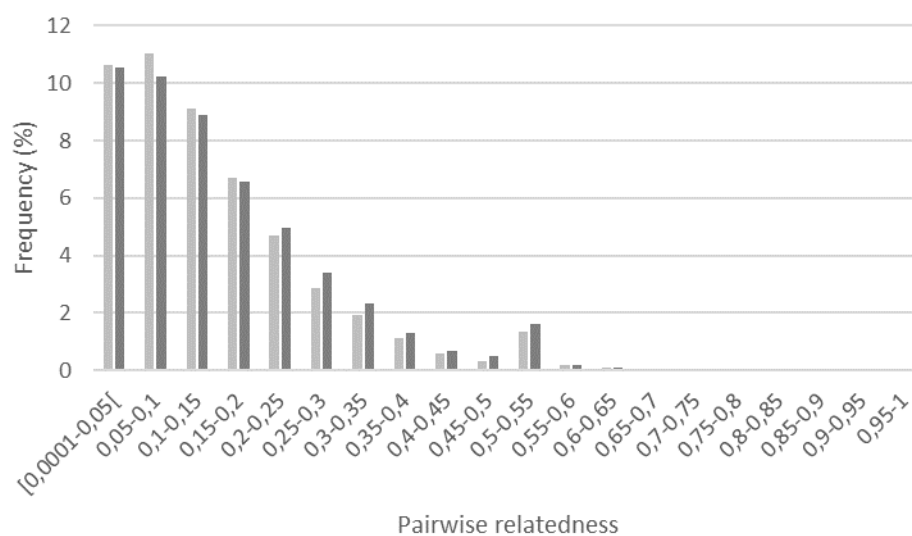


Figure 1 : Distribution of pairwise relatedness estimates in Vilaine (light grey) and Mondego (dark grey), estimated with DyadML (Miligan, 2003). Estimates with a value of 0 are not shown in this graph.

While the HE method suggested very large populations in both populations (N_e = infinity in both cases), the SF method suggested the opposite, with relatively low N_e estimates in both Vilaine and Mondego with N_e ranging between 212 and 368 (Table 2).

Table 2: Effective population size estimates (N_e) and 95% confidence intervals (CI 95%) for Vilaine and Mondego populations, using 16 loci.

Ne Methods		Vilaine		Mondego	
		Ne	CI 95 %	Ne	CI 95 %
LD	Pcrit 0.0	107.1	98.8 - 116.5	1240.6	678.3 - 5619.1
	Pcrit 0.01	∞	2391.4 - ∞	775	479.1 - 1821.8
	Pcrit 0.02	∞	1590.8 - ∞	831.6	481.7 - 2523.4
	Pcrit 0.05	2560.7	695.4 - ∞	623.7	354.3 - 1969.0
HE		∞	907.4 - ∞	∞	28.6 - ∞
SF		258	212 - 314	303	253 - 368

The LD method generated more contrasted results with N_e estimate including infinity in Vilaine and ranging between 300 and 2500 in Mondego (except with $p.crit = 0.00$), whereas it varied within a finite range comprised between 354 and 5620 in Mondego. More precisely, N_e in Mondego was even restricted to a narrower range between 479 and 2524 when applying $p.crit = 0.01$ or 0.02 , that seemed the most appropriate with the present data set according to Waples & Do (2010). Comparable results were obtained when using all 20 loci (Supplementary table 8). Increasing the sample size (n) clearly improved the accuracy of N_e estimates in Mondego. In this population, the proportion of finite N_e values was positively correlated with n , and reached a plateau $> 90\%$ with $n \geq 160$ (Figure 2a). The proportion of finite CI bounds followed the same trend, and $> 90\%$ of CI bounds were finite with $n \geq 230$ (Figure 2b). In addition, the precision of N_e in Mondego increased also with n (Figure 2c). To the opposite, the proportion of finite N_e estimates was always $< 50\%$ and decreased with increasing n in Vilaine, and the proportion of finite CI bounds was always $< 20\%$ regardless of n (Figure 2b).

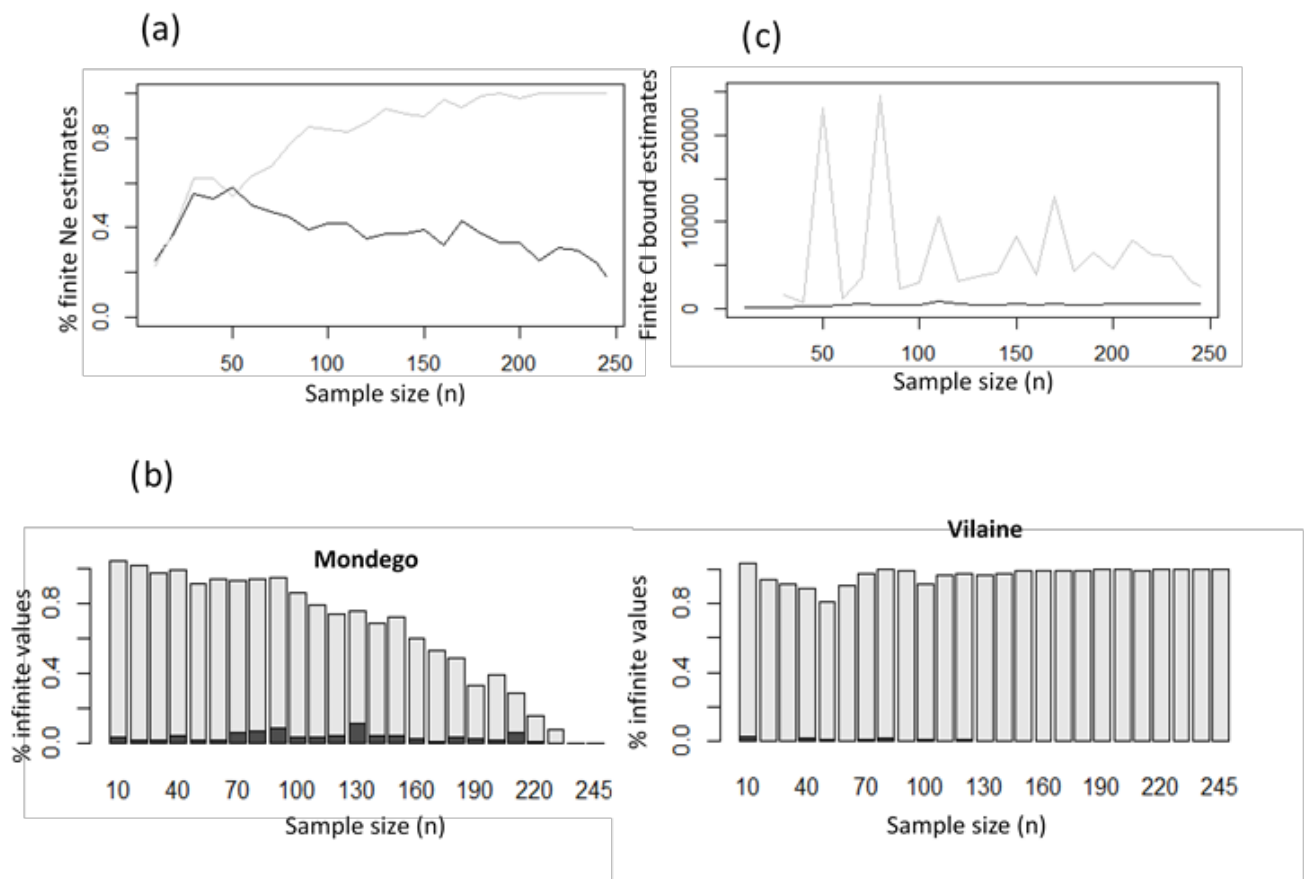


Figure 2: Estimation of N_e with resampled data sets. (a) Percentage of finite N_e estimates in Mondego (solid gray line) and Vilaine (solid black line). (b) Highest finite upper bound (dashed grey line) and lowest finite lower bound (dashed black line) of the CI in Mondego (c) Percentage of infinite upper (grey) and lower (black) CI bounds in Mondego and Vilaine.

Detection of recent bottlenecks

The Wilcoxon's test for heterozygosity excess yielded a significant value In Mondego only under the IAM (Table 3). All tests performed under the TPM or SMM were non significant in both populations.

Table 3: Detection of bottleneck signatures using the Wilcoxon's test for heterozygosity excess (three mutation models, IAM, TPM and SMM, 10,000 iterations) and the M ratio. These analyses were performed on 13 loci (microsatellites with odd sized alleles were ignored).

	IAM	Heterozygosity excess		SMM	M-ratio
		TPM			
<i>Variance for TPM</i>	-	70%-30%	90%-10%	-	-
Vilaine	0.06	0.97	0.99	0.99	0.83
Mondego	0.004	0.79	0.98	0.99	0.80

*Variance for TPM corresponds to a proportion of SMM in the TPM e.g. 70% single step mutations and 30% of multiple-step mutations.

In addition, allele frequencies in Vilaine and Mondego displayed a L-shaped distribution, that is expected in non-bottlenecked populations (Figure 3). Similarly, M-ratio values were relatively high in Vilaine (M=0.83) as in Mondego (M=0.80), thus showing no evidence of a bottleneck signature in both populations (Table 3). Relatively similar results were obtained when using either 16 or 20 loci, except that the test for heterozygosity excess was also significant for Vilaine under the IAM (Supplementary tables 9 & 10).

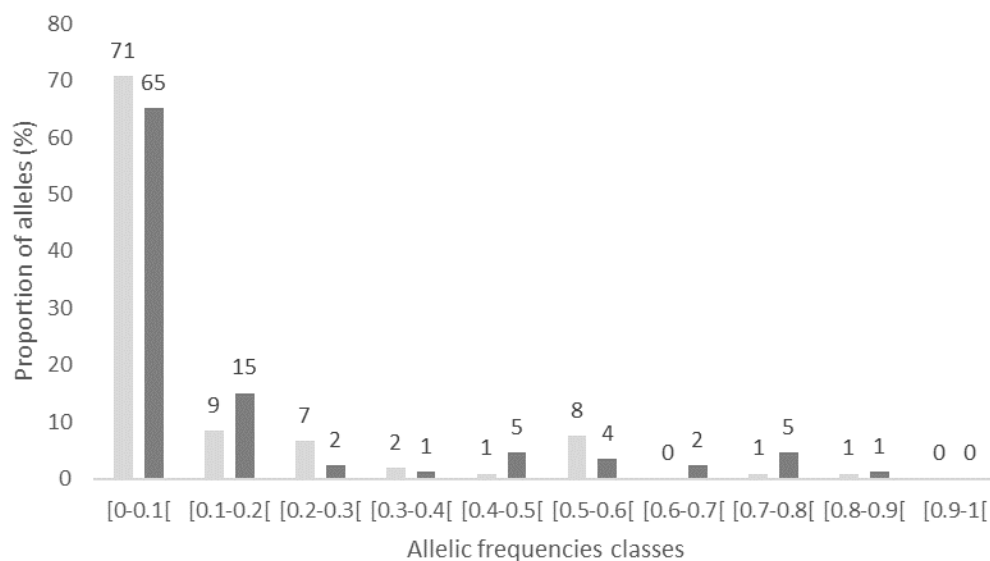


Figure 3: Distribution of allele frequencies in Vilaine (light grey) and Mondego (dark grey). These analyses were performed on 13 loci (microsatellites with odd sized alleles were ignored).

Discussion

Lower genetic diversity in the southern peripheral population

Only four out of the 20 microsatellites analyzed in the study displayed significant heterozygote deficiencies and/or null alleles (PFUSC3, Nplaf_8, Nplaf_28 and StPfl001). In addition, a signal of directional selection was detected for the locus StPfl001. These markers were excluded from the data set, since loci that do not follow HWE may bias demographic analyses and should be used with strong caution (e.g. Cornuet & Luikart, 1996; Waples et Do 2010); however, Waples & Do (2010) suggested that selection may only slightly bias N_e estimates in the case of microsatellites. A clear choice was made in the present study to select a highly reliable set of markers (16 microsatellites were finally selected) to conduct demo-genetic analyses. In addition, the same analyses were also conducted on all 20 markers in order to provide a complete picture of the informations carried by the microsatellites (see supplementary data). The genetic diversity was clearly lower in Mondego than Vilaine. This was particularly true for the allelic richness, that appeared lower in Mondego for 17 out of 20 microsatellites, but heterozygosity levels were only marginally lower in Mondego. This result confirms previous microsatellite studies that compared flounder populations from the Portuguese coast and the Bay of Biscay, either at the same juvenile stage as in the present study (0+ juveniles from the 2009 year-class; Calvès *et al.*, 2013), or at the adult stage (Reis-Santos *et al.* 2018). However, Calvès *et al.* (2013) reported slightly higher heterozygosities in Mondego than Vilaine.

The lower diversity found in the southern flounder population is congruent with other studies conducted on boreal fishes (Hasselman *et al.*, 2013; Ninua *et al.*, 2018, Horreo *et al.*, 2018) or arctic-alpine species (Hirao *et al.*, 2017). In the northern hemisphere, global warming is inducing a northward shift of the distribution of ectotherm species, especially the cold-adapted ones (Perry *et al.*, 2005, Sunday *et al.*, 2012). Rising temperature makes increasingly inhospitable areas located at the southern edge of the distribution range of boreal species, thus inducing a demographic decline of southern peripheral populations (Hampe & Petit, 2005). Stronger genetic drift associated with such declines may in turn explain the lower genetic diversity reported in the southern edge population of *P. flesus*, as often reported in edge populations (Eckert *et al.*, 2008; Kawecki, 2008; Pauls *et al.*, 2013; Lira-Noriega & Manthey, 2014). In contrast, the higher genetic diversity in Vilaine may reflect a long-term demographic stability, since large populations persisting for long periods can maintain a high genetic diversity due to a lower genetic drift (Assis *et al.*, 2013).

Allelic diversity is more sensitive to genetic drift than heterozygosity, and thus decreases faster than heterozygosity in bottlenecked populations (see Cornuet & Luikart, 1996; Luikart *et al.*, 1998). As a consequence, the fact that genetic diversity in Mondego appears lower in terms of allelic richness than heterozygosity suggests that the bottleneck affecting this population may be recent, and possibly still ongoing (see below). This finding is congruent with a strong demographic decline of the southern edge population of *P. flesus* that would be triggered by global climate warming.

The lower genetic diversity in Mondego could result not only from stronger genetic drift, but also from restricted gene flow between the southern peripheral population and the more northern ones (Neel *et al.*, 2013). The strong genetic differentiation reported between flounder populations from the Bay of Biscay and Portuguese coasts (Calvès *et al.*, 2013; Reis-Santos *et al.* 2018) suggests limited gene flow between these regions. In addition, such a genetic split could be the product of an historical divergence between the Bay of Biscay and Portuguese populations. The present genetic structure and diversity of contemporary populations has been shaped, at least partly, by phylogeographic processes associated with the Pleistocene glacial cycles (Hewitt, 2000; Rius *et al.*, 2014). During the last glacial maximum (LGM) that occurred about 18-25,000 years ago (e.g. Maggs *et al.*, 2008), the distribution of most species followed a contraction toward refugia. In the North-east Atlantic, the Iberian Peninsula has been identified as southern glacial refugium for many marine coastal species, but signatures of northern periglacial refugia have been reported in many marine species, in other regions such as in the Faeroes / Southern Iceland, Southwest Ireland or Western English Channel (Maggs *et al.* 2008; Provan *et al.*, 2013). As a consequence, the contrasted diversity patterns observed in flounder populations from Mondego and Vilaine may reflect (1) an old divergence between two phylogeographic units related to distinct refugia, possibly a southern Iberian refugium and a northern periglacial one, in combination with (2) a recent erosion of the genetic diversity of the southern peripheral population related to its demographic decline.

A compromised long-term viability of the southern edge population?

Genetic drift is a stochastic force that reduces the adaptive potential of populations and thus increases their vulnerability to demographic declines. Therefore, estimating the contemporary N_e is crucial in conservation and evolutionary biology, since it integrates the effect of drift over the last generations (Waples, 2010; Hare *et al.*, 2011). However, estimating N_e is highly

challenging, and various methods have been developed during the last decade to conduct this task (Palstra & Fraser, 2012). The three methods used in the present study to estimate N_e (LD, HE and SF) yielded diverging results. Estimates provided by both HE and SF approaches appeared largely inaccurate. On the one hand, HE seemed to over-estimate N_e with values reaching infinity in both Vilaine and Mondego, that seemed particularly unlikely in the case of Mondego. The HE method is known to be quite imprecise and often provides very large estimates even for populations with actually a small N_e (Pudovkin *et al.*, 1996; Luikart & Cornuet, 1999; Gilbert & Whitlock, 2015). This estimator seems more adapted to study very small populations, *i.e.* with a size of less than 30 individuals (Zhdanova & Pudovkin, 2008), and thus seems inappropriate in cases such as flounder populations. On the other hand, N_e estimates were much lower according to the SF method, with $N_e \sim 250-400$ in both Vilaine and Mondego. If this estimate was in agreement with those obtained with the LD method in Mondego, the SF approach seemed to strongly under-estimate N_e in Vilaine. The SF estimator is considered to be more versatile than other methods (Wang, 2016), since it allows non random mating, immigration, diploid or haploid species, and genotyping errors. However, this method may require very important sample sizes to properly estimate N_e in large populations like in Vilaine. The LD method is the most widely used approach (Palstra & Fraser, 2012), since it is considered to be more powerful and accurate than other ones to estimate the contemporary N_e of a population (Gilbert & Whitlock, 2015; Waples, 2016). In the present study, the most relevant N_e estimates were obtained with the LD method, when alleles with frequencies below 0.02 or 0.01 were screened out as recommended by Waples & Do (2010). This estimator reached infinity in Vilaine, suggesting a very large N_e for this population, whereas it showed a small N_e with finite CI in Mondego ($N_e = 775-832$, 95%CI = 479-2524).

Estimations of N_e according to the sample size (n) clearly confirmed that the accuracy and precision of N_e estimates is highly dependent on n and the proportion of N_e that is sampled, as reported in the literature (e.g. Hare *et al.* 2011). Accurate and precise estimates were obtained in Mondego with $n \sim 160-240$, thus suggesting that the sample size used in the present study ($n = 245$) was sufficient to provide estimates of good quality for this population. Interestingly, this result is in line with Palstra & Ruzzante (2012) who suggested that accurate N_e estimates are expected with $n \sim 10\%$ of N_e . In contrast, data collected in the present study were clearly not sufficient to provide satisfying N_e estimates in Vilaine, thus showing that this

population is probably much larger than those in Mondego. The precision and accuracy of N_e estimates in Vilaine should be improved by increasing the sampling effort and/or the number of genetic markers (Waples 1989; Berthier *et al.* 2002; Wang 2009). Small and finite N_e estimates as depicted for the flounder population in Mondego are not very common in marine fishes, and are more often observed in species such as terrestrial (e.g. bears; Samuk *et al.*, 2017) or marine mammals (e.g. dolphins; Hamner *et al.*, 2017). In marine fishes, such low N_e estimates with finite CI have been reported in isolated (e.g. Atlantic cod; Sinclair-Waters *et al.*, 2018), or severely depleted populations (e.g. Atlantic salmon; Nikolic *et al.*, 2009). In the case of European flounder, recent bottleneck combined with restricted gene flow may explain the small N_e as well as low genetic diversity found in the southern peripheral population in Mondego.

In conservation, it is generally assumed that the long-term viability of a population requires to maintain N_e at a level ≥ 500 -1000 (Franklin & Frankham, 1998), or ≥ 1000 -5000 (Lande, 1995; Lynch & Lande, 1998). More recently, $N_e \geq 1000$ was suggested as a conservation goal to ensure the long-term viability of a population (Frankham *et al.*, 2014). These threshold values match quite well with $N_e \sim 500$ -2500 estimated in Mondego, thus raising concerns about the vulnerability of this population. Such a small N_e , along with a low genetic diversity, may compromise the potential of this peripheral population to adapt to ongoing and future environmental changes, thus seriously threatening its long-term viability in a context of global climate change.

However, relatedness levels in Mondego were relatively comparable to those in Vilaine. This result may underline that the Mondego population is still large enough to allow random mating among unrelated fish. In addition, no signal of inbreeding was suggested by F_{IS} values. As a consequence, the Mondego population may not suffer any major threat over the short-term, since risks of a reduction of fitness due to inbreeding seems rather limited. However, the proportion of more related individuals was slightly higher in Mondego, suggesting that inbreeding may increase progressively in the near future in this population.

Undetectable signatures of recent bottleneck

No signal of a recent bottleneck was detected with any of the tests conducted in the study, with the exception of the sign test for heterozygosity excess performed under the IAM. Finding

significant heterozygosity excess under the IAM when the other two models SMM and TPM do not yield any significant tests is commonly reported in the literature (e.g. Busch *et al.*, 2007; Massa-Gallucci *et al.*, 2010; Watson *et al.*, 2016). With microsatellite data, the IAM is generally not the most appropriate model, and the sign test under the IAM is more susceptible to erroneously indicate evidence of a bottleneck, while the TPM or SMM are more conservative (Cornuet & Luikart, 1996; Cornuet *et al.* 1998). As a consequence, the significant heterozygosity excess detected under the IAM in both populations should be interpreted very cautiously. The lack of positive tests for a recent bottleneck that may have occurred in the southern population of Mondego was unexpected, given the low genetic diversity and small N_e found in this population. However, several reasons may explain the absence of significant results yielded by the tests for bottleneck. First, the number of loci or individuals might be insufficient. However, sample sizes were large ($n \sim 250$) and the number of markers was in the range of 10-20 loci recommended by Cornuet & Luikart (1998). In addition, the same results were obtained with either 13 or 20 microsatellites. Second, samples may not be representative of the studied populations. Each sample was composed of a single cohort of 0+ juveniles, and could thus not be representative of the whole population. However, this hypothesis seems unlikely given that genetic diversity parameters were similar to those obtained in previous studies conducted in the same regions, either at the juvenile (Calvès *et al.*, 2013) or adult stages (Reis-Santos *et al.*, 2018). Third, a bottleneck that would have occurred a long time ago might be undetectable, since the signature of past demographic history progressively decays through time (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart *et al.*, 1998; Garza & Williamson, 2001). However, this explanation does not match with the low allelic diversity contrasting with relatively high heterozygosity in Mondego, that suggests the effect of a recent bottleneck (see above). Fourth, gene flow from neighbouring populations is susceptible to erase signals of bottleneck with incoming new alleles. Such gene flow is plausible in a species like *P. flesus*, and cannot be ruled out. Fifth, a bottleneck that occurred too recently (or still ongoing) may also not be detectable, since the signal of a bottleneck is generally delayed in time (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart *et al.*, 1998; Garza & Williamson, 2001). For instance, the sign test for heterozygosity excess can detect a bottleneck within a window of approximately $0.2-4 N_e$ generations (Cornuet & Luikart, 1996). A strong reduction of the abundance of *P. flesus* has been documented in the Tagus estuary between the late-70's and mid-90's, that likely resulted from rising temperatures (Cabral *et al.*, 2001). Such demographic decline related to climate

warming, that may have impacted southern edge flounder populations for the last 50 years, is congruent with the hypothesis of a recent (and probably ongoing) bottleneck in Mondego. Interestingly, increasing temperatures are also suspected to have induced a decrease of *P. flesus* densities in the Bay of Biscay between the late-80's and mid-2000's (Hermant *et al.*, 2010). Finally, the demographic decline reported in southern flounder populations (Cabral *et al.*, 2001) may have induced a genetic bottleneck that is not sufficiently strong to lead to a detectable signature, since the tests performed in the present study are designed to detect drastic bottlenecks.

Value of the southern peripheral population for the conservation of P. flesus

The strong genetic differentiation between flounder populations from the Portuguese coast and the Bay of Biscay (Calvès *et al.*, 2013, Reis-Santos *et al.*, 2018) possibly reflects an old divergence between two distinct phylogeographic units. Therefore, the southern peripheral population in Mondego is likely to harbor endemic genetic variation, that may be of particular value for the evolutionary potential of the species (Hampe & Petit, 2005; Provan *et al.*, 2013). Contrasted energy metabolisms have been reported between flounder from Portugal and those from the Bay of Biscay and English Channel, thus suggesting local adaption to distinct environmental pressures (Borcier *et al.*, 2016; Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b). In particular, a common garden experiment highlighted a higher capacity of the Portuguese population of Lima to cope with thermal and hypoxic stressors (Pédrón *et al.*, 2017a), and this was confirmed at the proteomic level (Pédrón *et al.*, 2017b). In addition, fish from the Mondego population are characterized by a slower energy metabolism associated with a greater capacity to increase mitochondrial density, thus suggesting a local adaptation of this population to a warmer environment (Borcier *et al.*, 2016).

An erosion of the genetic diversity related to the demographic decline of the southern peripheral population may lead to a disruption of local adaptations and ultimately population extinction (Frankel & Soulé, 1981; Maruyama & Fuerst, 1985, Assis *et al.*, 2013; Steeves *et al.*, 2017). Environmental pressures on the southern edge population of *P. flesus* will probably increase with ongoing global climate warming, thus further eroding their adaptive potential through increased genetic drift. As a consequence, genetic bottleneck related to ongoing global climate warming might be a major threat for the long-term survival of *P. flesus*.

Future directions

Given the increasing threats on the southern peripheral population of *P. flesus*, it seems crucial to further explore the value of this population for the long-term conservation of the species. Thus, it is essential to investigate the phylogeographic history of flounder population and test the possibility of an old divergence between Portuguese and northern populations, in order to assess the value of the genetic diversity encountered in Portuguese population for the evolutionary potential of the species. In addition, the application of population genomics approaches, such as RADseq (Restriction site Associated DNA sequencing ; Baird *et al.*, 2008 ; Andrews *et al.*, 2016) would be highly valuable to (1) better investigate adaptive processes that may have shaped the genetic diversity of Portuguese populations (e.g. McKinney *et al.*, 2017), and also to (2) more thoroughly explore the demographic history of populations by tremendously increasing the number of markers (e.g. Waples *et al.* 2016).

References

- Ackerman, M. W., Hand, B. K., Waples, R. K., Luikart, G., Waples, R. S., Steele, C. A., Garner, B.A., McCane, J., & Campbell, M. R. (2017). Effective number of breeders from sibship reconstruction: Empirical evaluations using hatchery steelhead. *Evol. Appl.* 10(2), 146-160.
- Amorim, E., Ramos, S., Elliott, M., & Bordalo, A. A. (2016). Immigration and early life stages recruitment of the European flounder (*Platichthys flesus*) to an estuarine nursery: The influence of environmental factors. *J. Sea. Res.* 107, 56-66.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Gen.* 17(2), 81.
- Antao T., Lopes A., Lopes R. J., Beja-Pereira A., & Luikart G. (2008). LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F ST-outlier method. *BMC Bioinformatics.* 9(1), 323.
- Assis, J., Coelho, N. C., Alberto, F., Valero, M., Raimondi, P., Reed, D., & Serrão, E. A. (2013). High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE.* 8(7), e68646.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E.U., Cresko, W.A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLOS ONE.* 3(10), e3376.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). [URL:http://www.genetix.univmontp2.fr/genetix/intro.htm](http://www.genetix.univmontp2.fr/genetix/intro.htm)
- Berthier, P., Beaumont, M. A., Cornuet, J. M., & Luikart, G. (2002). Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: a genealogical approach. *Genetics*, 160(2), 741-751.
- Bongaerts, P., Ridgway, T., Sampayo, E. M., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Assessing the 'deep reef refugia'hypothesis: focus on Caribbean reefs. *Coral reefs*, 29(2), 309-327.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. *JoX.* 6(2).
- Brown, P. M., Thomas, C. E., Lombaert, E., Jeffries, D. L., Estoup, A., & Handley, L. J. L. (2011). The global spread of *Harmonia axyridis* (*Coleoptera: Coccinellidae*): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl*, 56(4), 623-641.
- Busch, J. D., Waser, P. M., & DeWOODY, J. A. (2007). Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Mol. Ecol.* 16(12), 2450-2462.
- Cabral, H. N., Costa, M. J., & Salgado, J. P. (2001). Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes?. *Clim. Res.* 18(1-2), 119-126.
- Cabral, H. N., Vasconcelos, R., Vinagre, C., França, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., Freitas, V., Santos, P.T., & Costa, M.J. (2007). Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *J. Sea Res.* 57(2-3), 209-217.
- Cahill, A. E., & Levinton, J. S. (2016). Genetic differentiation and reduced genetic diversity at the northern range edge of two species with different dispersal modes. *Mol. Ecol.* 25(2), 515-526.

- Calves, I., Lavergne, E., Meistertzheim, A. L., Charrier, G., Cabral, H., Guinand, B., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 472, 257-273.
- Casas L., Martinez P., & Sanchez L. (2005). Characterization of microsatellite markers derived from sequence databases for the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol. Ecol. Notes.* 5(3), 664-665.
- Coombs J. A., Letcher B. H., & Nislow K. H. (2008). CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Mol. Ecol. Resour.* 8(3), 578-580.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* 144(4), 2001-2014.
- Crow, J. F., & Kimura, M. (1970). An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York.
- Daverat, F., Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Martin, J., Eon, M., Fablet, R., Pécheyran, C., & Antunes, C. (2012). Plasticity of European flounder life history patterns discloses alternatives to catadromy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 465, 267-280.
- De Meeûs, T. (2012). Initiation à la génétique des populations naturelles : Applications aux parasites et à leurs vecteurs. IRD éditions.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *P. Natl. A. Sci.* 91(8), 3166-3170.
- Dixon, T.J., 2003. Molecular genetic studies of pollutant response in the European flounder, *Platichthys flesus*. Ph.D. thesis - University of Stirling.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14(1), 209-214.
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17(5), 1170-1188.
- Elliott, M., Burdon, D., Hemingway, K. L., & Apitz, S. E. (2007). Estuarine, coastal and marine ecosystem restoration: confusing management and science—a revision of concepts. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74(3), 349-366.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3), 564-567.
- Fichou Y., Génin E., Le Maréchal C., Audrézet M. P., Scotet V., & Férec C. (2008). Estimating the age of CFTR mutations predominantly found in Brittany (Western France). *J. Cyst. Fib.* 7(2), 168-173.
- Florin A. B. & Höglund J. (2008). Population structure of flounder (*Platichthys flesus*) in the Baltic Sea: differences among demersal and pelagic spawners. *Heredity.* 101(1), 27.
- Fisher, R. A. (1930). The evolution of dominance in certain polymorphic species. *Am. Nat.* 64(694), 385-406.
- Frankel, O., & Soulé, M. E. (1981). Conservation and evolution. CUP Archive.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol. Conserv.* 170, 56-63.
- Franklin, I. R., & Frankham, R. (1998). How large must populations be to retain evolutionary potential? *Anim. Conserv.* 1(1), 69-70.

- Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10(2), 305-318.
- Gilbert, K. J., & Whitlock, M. C. (2015). Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. *Evolution.* 69(8), 2154-2166.
- Gilpin, M. E., & M. E. Soulé. 1986. Minimum viable populations: the processes of species extinctions. Pages 13–34 in M. E. Soulé, editor. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hamner, R. M., Constantine, R., Mattlin, R., Waples, R., & Baker, C. S. (2017). Genotype-based estimates of local abundance and effective population size for Hector's dolphins. *Biol. Conserv.* 211, 150-160.
- Hampe, A., & Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol. Lett.* 8(5), 461-467.
- Hare, M. P., Nunney, L., Schwartz, M. K., Ruzzante, D. E., Burford, M., Waples, R. S., Ruegg, K., & Palstra, F. (2011). Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. *Conserv. Biol.* 25(3), 438-449.
- Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Thornber, C. S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* 9(2), 228-241.
- Hasselman, D. J., Ricard, D., & Bentzen, P. (2013). Genetic diversity and differentiation in a wide ranging anadromous fish, American shad (*Alosa sapidissima*), is correlated with latitude. *Mol. Ecol.* 22(6), 1558-1573.
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E. E., Grønkjær, P., & Loeschcke, V. (2007). Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Mol. Ecol.* 16(15), 3104-3118.
- Hermant, M., Lobry, J., Bonhommeau, S., Poulard, J. C., & Le Pape, O. (2010). Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J. Sea Res.* 64(1-2), 45-53.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.* 405, 907-913
- Hirao, A. S., Watanabe, M., Tsuyuzaki, S., Shimono, A., Li, X., Masuzawa, T., & Wada, N. (2017). Genetic diversity within populations of an arctic–alpine species declines with decreasing latitude across the Northern Hemisphere. *J. Biogeogr.* 44(12), 2740-2751.
- Hoarau G., Cook D., Stam W. T., & Olsen J. L. (2002). New microsatellites primers for plaice, *Pleuronectes platessa* L. (*Teleostei: Pleuronectidae*). *Mol. Ecol. Notes*, 2(1), 60-61.
- Horreo, J. L., Griffiths, A. M., Machado-Schiaffino, G., Stevens, J. R., & Garcia-Vazquez, E. (2018). Northern areas as refugia for temperate species under current climate warming: Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) as a model in Northern Europe. *J. Fish. Biol.*
- IPCC, 2014: *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Jones, O. R., & Wang, J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3), 551-555.
- Jones, A. T., Ovenden, J. R., & Wang, Y. G. (2016). Improved confidence intervals for the linkage disequilibrium method for estimating effective population size. *Heredity.* 117(4), 217.
- Kawecki, T. J. (2008). Adaptation to marginal habitats. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 321-342.

- Kumari P. & Kemp S. J. (1998). Polymorphic microsatellite markers in the ostrich (*Struthio camelus*). *Mol. Ecol.*, 7(1), 133-133.
- Koubbi, P., Loots, C., Cotonnec, G., Harlay, X., Grioche, A., Vaz, S., Martin, C., Walkey, M., & Carpentier, A. (2006). Spatial patterns and GIS habitat modelling of *Solea solea*, *Pleuronectes flesus* and *Limanda limanda* fish larvae in the eastern English Channel during the spring. *Sci. Mar.* 147-157.
- Lande, R. (1995). Mutation and conservation. *Conserv. Biol.* 9(4), 782-791.
- Lawton, J. H. (1993). Range, population abundance and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 8(11), 409-413.
- Ledoux, J. B., Aurelle, D., Bensoussan, N., Marschal, C., Féral, J. P., & Garrabou, J. (2015). Potential for adaptive evolution at species range margins: contrasting interactions between red coral populations and their environment in a changing ocean. *Ecol. Evol.* 5(6), 1178-1192.
- Lesica, P., & Crone, E. E. (2017). Arctic and boreal plant species decline at their southern range limits in the Rocky Mountains. *Ecol. Lett.* 20(2), 166-174.
- Li, C. C., Weeks, D. E., & Chakravarti, A. (1993). Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Hum. Hered.* 43(1), 45-52.
- Lira-Noriega, A., & Manthey, J. D. (2014). Relationship of genetic diversity and niche centrality: a survey and analysis. *Evolution.* 68(4), 1082-1093.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., & Sherwin, W. B. (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89(3), 238-247.
- Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12(1), 228-237.
- Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 151(3), 1211-1216.
- Lynch, M., & Lande, R. (1998). The critical effective size for a genetically secure population. *Anim. Conserv.* 1(1), 70-72.
- Lynch, M., & Ritland, K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*. 152(4), 1753-1766.
- Lyu, D., Wang, W., Luan, S., Hu, Y., & Kong, J. (2017). Estimating genetic parameters for growth traits with molecular relatedness in turbot (*Scophthalmus maximus*, *Linnaeus*). *Aquaculture*. 468, 149-155.
- Macbeth, G. M., Broderick, D., Buckworth, R. C., & Ovenden, J. R. (2013). Linkage disequilibrium estimation of effective population size with immigrants from divergent populations: a case study on Spanish Mackerel (*Scomberomorus commerson*). *G3-Genes Genom. Genet.* g3-112.
- Maggs, C. A., Castilho, R., Foltz, D., Henzler, C., Jolly, M. T., Kelly, J., Olsen, J., Perez, K.E., Stam, W., Väinölä, R., Viard, F., & Wares, J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*. 89(sp11), S108-S122.
- Malécot, G. (1948). *Mathematics of heredity*. Freeman, San Francisco, CA USA.
- Marandel, F., Lorance, P., Berthelé, O., Trenkel, V. M., Waples, R. S., & Lamy, J. B. (2019). Estimating effective population size of large marine populations, is it feasible? *Fish. Fish.* 20(1), 189-198.
- Martinho, F., van der Veer, H. W., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2013). Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *J. Sea Res.* 84, 61-69.

- Maruyama, T., & Fuerst, P. A. (1985). Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 111(3), 675-689.
- Massa-Gallucci, A., Coscia, I., O'Grady, M., Kelly-Quinn, M., & Mariani, S. (2010). Patterns of genetic structuring in a brown trout (*Salmo trutta* L.) metapopulation. *Conserv. Gen.* 11(5), 1689-1699.
- McKinney, G. J., Larson, W. A., Seeb, L. W., & Seeb, J. E. (2017). RAD seq provides unprecedented insights into molecular ecology and evolutionary genetics: comment on Breaking RAD by Lowry *et al.*(2016). *Mol. Ecol. Res.* 17(3), 356-361.
- Milligan, B. G. (2003). Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*. 163(3), 1153-1167.
- Neel, M. C., McKelvey, K., Ryman, N., Lloyd, M. W., Bull, R. S., Allendorf, F. W., Schwartz, M.K., & Waples, R. S. (2013). Estimation of effective population size in continuously distributed populations: there goes the neighborhood. *Heredity*, 111(3), 189.
- Nikolic, N., Butler, J. R., Bagliniere, J. L., Laughton, R., McMYN, I. A., & Chevalet, C. (2009). An examination of genetic diversity and effective population size in Atlantic salmon populations. *Gen. Res.* 91(6), 395-412.
- Ninua, L., Tarkhnishvili, D., & Gvazava, E. (2018). Phylogeography and taxonomic status of trout and salmon from the Ponto-Caspian drainages, with inferences on European Brown Trout evolution and taxonomy. *Ecol. Evol.* 8(5), 2645-2658.
- Ohta, T., & Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22(2), 201-204.
- Orizaola, G., Dahl, E., & Laurila, A. (2010). Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos*, 119(6), 980-987.
- Palstra, F. P., & Fraser, D. J. (2012). Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal. *Ecol. Evol.* 2(9), 2357-2365.
- Palstra, F. P., & Ruzzante, D. E. (2008). Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Mol. Ecol.* 17(15), 3428-3447.
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., & Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol. Ecol.* 22(4), 925-946.
- Pédrón, N., Morvezen, R., Le Moan, A., Guinand, B., Zambonino-Infante, J. L., Laroche, J., & Charrier, G. (2015). New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to anthropogenic stress and contrasted environments. *Conserv. Genet. Resour.*, 7(4), 823-826.
- Pédrón, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J. (2017a). Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: Differential sensitivities of populations. *Sci. Total Environ.* 586, 890-899.
- Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J. L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V.F., Le Grand, F., & Laroche, J. (2017b). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 129, 258-267.
- Peel, D., Waples, R. S., Macbeth, G. M., Do, C., & Ovenden, J. R. (2013). Accounting for missing data in the estimation of contemporary genetic effective population size (N_e). *Mol. Ecol. Resour.* 13(2), 243-253.

- Perry, A.L., Low, P.J., Ellis, J.R., & Reynolds, J.D. (2005) Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*. 308, 1912-1915
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90, 502-503.
- Provan, J. (2013). The effects of past, present and future climate change on range-wide genetic diversity in northern North Atlantic marine species. *Frontiers of Biogeography*. 5(1).
- Pudovkin, A. I., Zaykin, D. V., & Hedgecock, D. (1996). On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*. 144(1), 383-387.
- Pujolar, J. M., Bevacqua, D., Capoccioni, F., Ciccotti, E., De Leo, G. A., & Zane, L. (2011). No apparent genetic bottleneck in the demographically declining European eel using molecular genetics and forward-time simulations. *Conserv. Genet.* 12(3), 813-825.
- Queller, D. C., & Goodnight, K. F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 43(2), 258-275.
- Reis-Santos, P., Tanner, S. E., Aboim, M. A., Vasconcelos, R. P., Laroche, J., Charrier, G., Pérez, M., Presa, P., Gillanders, B.M., & Cabral, H. N. (2018). Reconciling differences in natural tags to infer demographic and genetic connectivity in marine fish populations. *Sci. Rep.- UK*. 8(1), 10343.
- Reusch, T. B. (2013). Climate change in the oceans: evolutionary versus phenotypically plastic responses of marine animals and plants. *Evol. Appl.* 7(1), 104-122.
- Rijnsdorp, A. D., Peck, M. A., Engelhard, G. H., Möllmann, C., & Pinnegar, J. K. (2009). Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES J. Mar. Sci.* 66(7), 1570-1583.
- Ritland, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet. Res.* 67(2), 175-185.
- Rius, M., Clusella-Trullas, S., McQuaid, C. D., Navarro, R. A., Griffiths, C. L., Matthee, C. A., Von Der Heyden, S., & Turon, X. (2014). Range expansions across ecoregions: interactions of climate change, physiology and genetic diversity. *Global Ecol. Biogeogr.* 23(1), 76-88.
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Samuk, K., Owens, G. L., Delmore, K. E., Miller, S. E., Rennison, D. J., & Schluter, D. (2017). Gene flow and selection interact to promote adaptive divergence in regions of low recombination. *Mol. Ecol.* 26(17), 4378-4390.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18(2), 233.
- Sinclair-Waters, M., Bradbury, I. R., Morris, C. J., Lien, S., Kent, M. P., & Bentzen, P. (2018). Ancient chromosomal rearrangement associated with local adaptation of a postglacially colonized population of Atlantic Cod in the northwest Atlantic. *Mol. Ecol.* 27(2), 339-351.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *J. Exp. Biol.* 213(6), 912-920.
- Steeves, T. E., Johnson, J. A., & Hale, M. L. (2017). Maximising evolutionary potential in functional proxies for extinct species: a conservation genetic perspective on de-extinction. *Funct. Ecol.* 31(5), 1032-1040.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nat. Clim. Change*. 2(9), 686.
- Tallmon, D. A., Gregovich, D., Waples, R. S., Scott Baker, C., Jackson, J., Taylor, B. L., Archer, E., Martien, K.K., Allendorf, F.W., & Schwartz, M. K. (2010). When are genetic methods useful for

- estimating contemporary abundance and detecting population trends?. *Mol. Ecol. Resour.* 10(4), 684-692.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P., & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4(3), 535-538.
- Vinagre, C., Santos, F. D., Cabral, H. N., & Costa, M. J. (2009). Impact of climate and hydrology on juvenile fish recruitment towards estuarine nursery grounds in the context of climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85(3), 479-486.
- Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*. 160(3), 1203-1215.
- Wang, J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*. 166(4), 1963-1979.
- Wang, J. (2007). Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genet. Res.* 89(3), 135-153.
- Wang, J. (2009). A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Mol. Ecol.* 18(10), 2148-2164.
- Wang, J. (2011). COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol. Ecol. Resour.* 11(1), 141-145.
- Wang, J. (2016). A comparison of single-sample estimators of effective population sizes from genetic marker data. *Mol. Ecol.* 25(19), 4692-4711.
- Waples, R. S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121(2), 379-391.
- Waples, R. S. (2006). A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv. Genet.* 7(2), 167.
- Waples, R. S. (2010). Spatial-temporal stratifications in natural populations and how they affect understanding and estimation of effective population size. *Mol. Ecol. Resour.* 10(5), 785-796.
- Waples, R. S., & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.* 3(3), 244-262.
- Waples, R. S. (2016). Making sense of genetic estimates of effective population size. *Mol. Ecol.* 25(19), 4689-4691.
- Watson, H. V., McKeown, N. J., Coscia, I., Wootton, E., & Ironside, J. E. (2016). Population genetic structure of the European lobster (*Homarus gammarus*) in the Irish Sea and implications for the effectiveness of the first British marine protected area. *Fish. Res.* 183, 287-293.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Wright, S. (1938). The distribution of gene frequencies under irreversible mutation. *P. Natl. Acad. Sci.* 24(7), 253-259.
- Zhdanova, O. L., & Pudovkin, A. I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. *J. Hered.* 99(6), 694-695.

Supplementary data

Supplementary table 1 : List of the 20 microsatellites used in the study divided into three panels. Reverse primers that were combined with a PIG-tail (5'-GTTTCTT; Brownstein *et al.*, 1996) are indicated with the suffix '-pt'. The melting temperature of each locus (T_{mL}) was estimated according to Marmur & Doty (1962).

Primer Name	Panel	Primer sequence (5' > 3')	Universal primer	[MgCl ₂] mM	T_{mL} (°C)	Total number of PCR cycles	Size range	Genbank accession number	Reference
NPlaf_8_F	1	CATCCACAAACCCTCATTCA	UP4	1.5	56	41	217-231	KT354907	Pedron <i>et al.</i> , 2015
NPlaf_8_R-pt		CAGTCTTGATGGATTCCGGCT							
Nplaf_14_F	3	ACACCCCTATAGCAACACTTGA	UP2	1.5	55	36	111-115	KT354908	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_14_R-pt		TCAGCTCCGGATATTTCTGA							
Nplaf_15_F	2	GGTTTTCTCTATCCCCCAA	UP1	1.5	53	31*	235-245	KT354918	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_15_R		ACCAGTAAGCGGATAAAAAACA							
Nplaf_23_F	2	TCTCTGCATGTCTCACCTG	UP2	1.5	57	36	213-225	KT354909	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_23_R		AACGCAAAGAAAGATACAACCTGC							
Nplaf_24_F	3	GCTGCAATTATGCAGGAGT	UP1	1.5	55	31*	148-166	KT354910	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_24_R		CAATAACCTTGGCTGCTTGT							
Nplaf_25_F	3	AAAATGTGTTACCAACGGACG	UP4	1.5	56	41	93-99	KT354911	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_25_R		ATTAGGTGCAATCTGCTGCC							
Nplaf_28_F	3	TTGTCCCCTCAAAAATCCAG	UP2	0.5	56	48	220-253	KT354913	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_28_R-pt		TTGTGTTGGTTGAACAGGGA							
Nplaf_30_F	3	GTGCACCAATTCATGCCATA	UP1	1.5	55	41	285-291	KT354914	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_30_R		GCAAGGTCATTAAGATAAACTGATTT							
Nplaf_35_F	1	ATGTGTTCTGAGCTGAGTGG	UP1	1.5	57	36	145-220	KT354916	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_35_R-pt		CATCAACTGGCAGAAGAACC							
PFUSC3_F	1	CAGTGTAATGACCACACACCA	UP7	1.5	56	36	197-199	BE638426	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC3_R		CTGGACAAATAAGCATCCAAG							
PFUSC4_F	3	TGGGCCGACGTGAAATAGT	UP1	1.5	53	41	196-198	AJ543360	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC4_R		TGCTACTGGCTTTGTGATTT							
PFUSC7_F	2	GGCTCTACCCAACACCCATA	UP2	1.5	51	41**	131-141	AJ578004	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC7_R-pt		CCATCACCTTGCTCTACTCAAG							
PFUSC8_F	1	ACCGCAGTTCATTGTTTGTG	UP3	1.5	56	41	158-168	AJ543382	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC8_R-pt		TTGGAGGGTTCCATTCTGTG							
PL142_F	2	GCCTCATTTTCACACTGTTACC	UP3	1.5	51	48	122-190	AF406750	Hoarau <i>et al.</i> , 2002
PL142_R-pt		AACTTGGGCAATTACTTGAGATG							
StPfl001_F	1	CATCAAAGCATGAAACCC	UP3	1.5	56	48	235-340	AJ315970	Dixon, 2003
StPfl001_R-pt		CTGGCCCAAGTGGAGCAT							
StPfl002_F	3	ACCCGATCAAGTTGTAGTCAT	UP4	1.5	56	41	147-154	AJ315975	Dixon, 2003
StPfl002_R		CATTTCTCCTCTCGGCGTGTT							
StPfl003_F	2	GTCAAATTAGGGAGGGCAGTG	UP5	1.5	56	41	163-175	AJ315971	Dixon, 2003
StPfl003_R		CTCTGACCTTGACAGATAAAT							
StPfl005_F	2	TGCTGCCGAGCTGGGCTTATTATC	UP6	1.5	56	41	99-117	AJ315974	Dixon, 2003
StPfl005_R		CACACGGCATCCCAACTGTCACAT							
StPfl015_F	1	GAGGGTTTAGTCTTGTTGTCATTG	UP5	1.5	56	41	116-136	AJ538313	Dixon, 2003
StPfl015_R		AGGCCATCAGCTTGCTTTCT							
StPfl025_F	2	TTCAACAATGACCAAGGGGCATCA	UP1	1.5	57	36*	150	AJ538323	Dixon, 2003
StPfl025_R		TTTGCAATCTTGTAACACCTGAGA							

* + 5 cycles for Mondego

** + 7 cycles for Mondego

Supplementary table 2 : List of microsatellites unsuccessfully tested and not included in the study.

Primer Name	Primer sequence (5' > 3')	Universal primer	T _{mL} (°C)	Size range	Genbank n° accession	Reference
LIST001_F	CATGACCTCAATCAGATACC	UP3	55	82-86	U85808	Kumari <i>et al.</i> , 1998
LIST001_R	CGCTTTGCAATATTCCAAGC					
Nplaf_27_F	ATTCTGTTCATCATTACAGTATTTTC	UP1	57	339-359	KT354912	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_27_R	TCGTCTGTCTCACTCTCCTGTC					
Nplaf_33_F	CTATCCCCTGATCGCTTCTG	UP2	57	448-523	KT354915	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_33_R	AGACGAATGGCTGCTGATCT					
Nplaf_51_F	CGTGCAATTCATGTTAACGCT	UP3	53	391-414	KT354917	Pedron <i>et al.</i> , 2015
Nplaf_51_R	GCAGAAAACATTCCGCAAAT					
PFUSC1_F	CTATCATGTCCCAGGGTGAA	UP5	57	188-218	AJ508552	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC1_R	AGATGGAGGAGGTGGAGGAG					
PFUSC8_F	ACCGCAGTTCATTGTTTGTG	UP7	55	158-168	AJ543382	Casas <i>et al.</i> , 2005
PFUSC8_R	TTGGAGGGTTCCATTCTGTG					
PL167_F	CAGACAAAATGAATGACAGG	UP3	53	116-222	AF406751	Hoarau <i>et al.</i> , 2002
PL167_R	CAAGCAGCAGTCCCAGCA					
StPfi004_F	ATGAGGACGTGGATGTTCTTC	UP5	58	138-188	AJ315973	Casas <i>et al.</i> , 2005
StPfi004_R	CCCCTATCTCTGCTTAATGTTTAC					
StPfi006_F	TGTAGATACTCCGCTATAAAAAAGT	UP7	53	257-500	AJ315972	Dixon, 2003
StPfi006_R	TCTGTGGACCATTGGGTA					
StPfi016_F	CTTTAATTGCGCCAGACTGACAG	UP5	59	174	AJ538314	Dixon, 2003
StPfi016_R	CCCTCCGGGGATGAATAAAGT					
StPfi022_F	GCACTCACCTTTCACCTCAACCTT	UP6	62	164-234	AJ538320	Dixon, 2003
StPfi022_R	CAGAAGCAGCGCGAGAAGATAAAG					

Supplementary table 3 : List of universal primers, including the fluorochrome and the melting temperature (T_{mU}) calculated according to Marmur & Doty (1962).

Universal Primer			T _{mU}	
Name	Primer Sequence (5' > 3')	Fluorochrome	(°C)	Reference
UP1	TAGAAGGCACAGTCGAGG	DO	56	Morvezen <i>et al.</i> , 2013
UP2	TGTAAAACGACGCCAGT	FAM	56	Morvezen <i>et al.</i> , 2013
UP3	GCAGGAAACAGCTATGAC	PET	53	Morvezen <i>et al.</i> , 2013
UP4	GCCGCTCTAGAACTAGTG	YY	53	Morvezen <i>et al.</i> , 2013
UP5	GACTTCGGATAGCTAGTCGT	YY	57	Calves <i>et al.</i> , 2013
UP6	GACTCTGGCCGTCGTTTAC	DO	59	Calves <i>et al.</i> , 2013
UP7	GTCGTAGTCGACGACCGTTA	FAM	57	Calves <i>et al.</i> , 2013

Supplementary table 4 : Detail of the simulated populations considered in COANCESTRY in order to assess the most appropriate relatedness estimator.. Each simulated population displayed a distinct relatedness structure, with varying numbers of the different types of relationships : full-sib (FS), half-sib (HS), first cousin (FC), second cousin (SC), unrelated (UN).

Simulated population	1	2	3	4	5	6	7
FS	100	50	20	0	0	0	0
HS	100	50	50	100	20	0	0
FC	100	100	100	100	50	100	20
SC	100	100	500	100	500	100	100
UN	100	200	1000	100	1000	100	1000

Supplementary table 5 : Correlation coefficients between each of the seven relatedness estimator available in COANCESTRY and the true simulated values, when considering three different genotyping error rates (0.00, 0.02 and 0.05). The relatedness structure used for these simulations corresponded to the simulated population n°1 shown in supplementary table 4.

Estimator compared	Vilaine			Mondego		
True Value (TV)	0	0.02	0.05	0	0.02	0.05
TrioMI-TV	0.73	0.7	0.67	0.71	0.73	0.64
DyadML-TV	0.75	0.71	0.68	0.73	0.74	0.66
LynchRD-TV	0.67	0.64	0.61	0.69	0.66	0.6
Wang-TV	0.68	0.65	0.59	0.67	0.69	0.57
LynchLI-TV	0.67	0.66	0.62	0.67	0.68	0.59
QuellertGT-TV	0.68	0.66	0.64	0.7	0.69	0.6
Ritland-TV	0.41	0.48	0.52	0.41	0.55	0.44

Supplementary table 6 : Correlation coefficients between each of the seven relatedness estimator available in COANCESTRY and the true simulated values in Vilaine. The relatedness structure of each simulated population is detailed in supplementary table 4. For each simulated population, the best estimator is indicated in bold.

Simulated population	1	2	3	4	5	6	7
TrioMI-TV	0.7	0.73	0.55	0.48	0.48	0.50	0.31
DyadML-TV	0.71	0.73	0.56	0.50	0.50	0.52	0.32
LynchRD-TV	0.64	0.65	0.54	0.45	0.49	0.48	0.37
Wang-TV	0.65	0.68	0.45	0.46	0.41	0.47	0.22
LynchLI-TV	0.66	0.67	0.42	0.47	0.38	0.40	0.19
QuellertGT-TV	0.66	0.67	0.46	0.46	0.40	0.36	0.22
Ritland-TV	0.48	0.46	0.48	0.32	0.38	0.42	0.32

Supplementary table 7 : Correlation coefficients between each of the seven relatedness estimator available in COANCESTRY and the true simulated values in Mondego. The relatedness structure of each simulated population is detailed in supplementary table 4. For each simulated population, the best estimator is indicated in bold.

Simulated population	1	2	3	4	5	6	7
TrioMI-TV	0.73	0.69	0.53	0.45	0.35	0.49	0.28
DyadML-TV	0.74	0.7	0.54	0.47	0.37	0.51	0.29
LynchRD-TV	0.66	0.63	0.52	0.47	0.41	0.48	0.3
Wang-TV	0.69	0.61	0.45	0.43	0.31	0.44	0.24
LynchLI-TV	0.68	0.61	0.42	0.4	0.31	0.42	0.17
QuellertGT-TV	0.69	0.63	0.44	0.44	0.32	0.41	0.2
Ritland-TV	0.55	0.54	0.42	0.41	0.31	0.33	0.29

Supplementary table 8 : Effective population size estimates (N_e) and 95% confidence intervals (CI 95%) for Vilaine and Mondego populations, using 20 loci.

Ne Methods		Vilaine		Mondego	
		Ne	CI 95 %	Ne	CI 95 %
LD	Pcrit 0.0	101.6	95.7-108.0	1042.2	662.5-2295.2
	Pcrit 0.01	∞	78324.6 - ∞	928	583.7-2098.3
	Pcrit 0.02	∞	10343.2 - ∞	801.1	506.7-1761.2
	Pcrit 0.05	∞	1226.5 - ∞	498.9	331.0-934.4
HE		∞	∞ - ∞	∞	301.5 - ∞
SF		304	255 - 367	313	257 - 378

Supplementary table 9 : Detection of bottleneck signatures using the Wilcoxon's test for heterozygosity excess (three mutation models: IAM,TPM and SMM; 10,000 iterations) and the M-ratio. These analyses were performed on 16 loci.

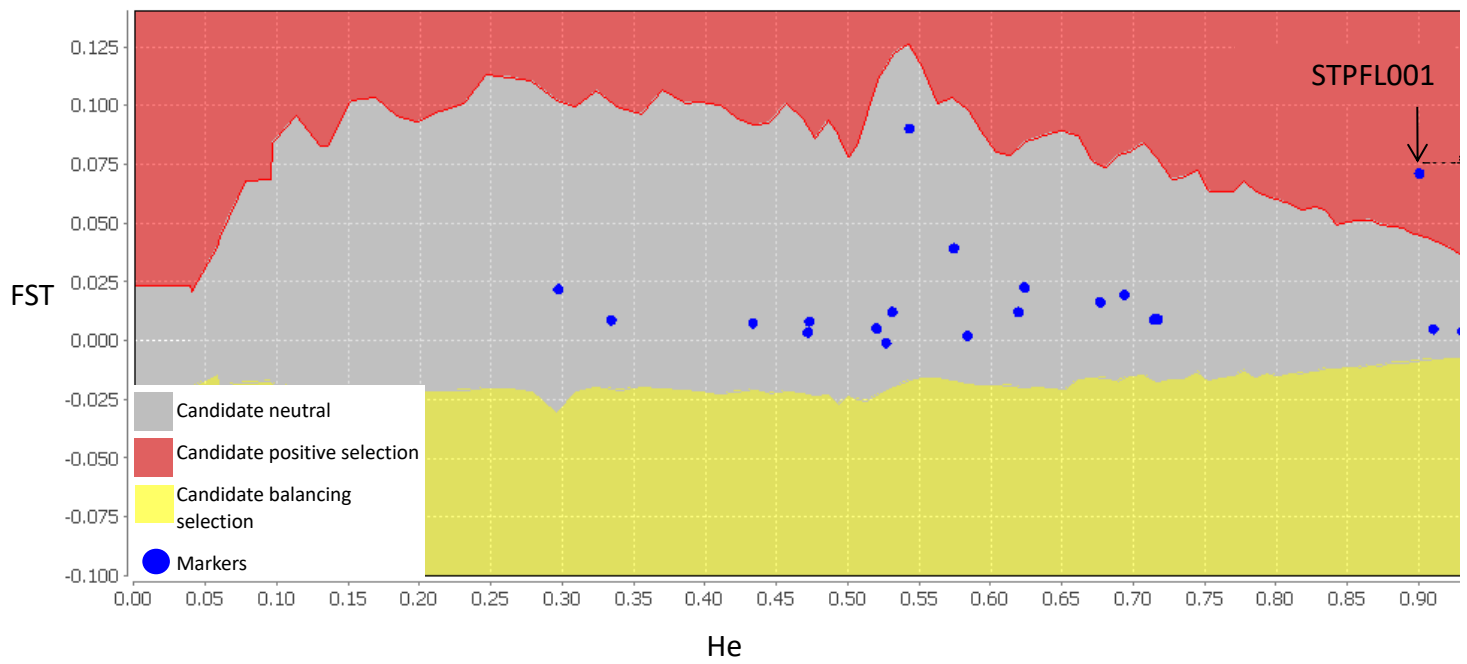
	Heterozygosity excess				M-ratio
	IAM	TPM		SMM	
<i>Variance for TPM</i>	-	70%-30%	90%-10%	-	-
Vilaine	0.022	0.98	0.99	0.99	0.38
Mondego	0.002	0.68	0.99	0.99	0.36

*Variance for TPM corresponds to a proportion of SMM in the TPM e.g. 70% single step mutations and 30% of multiple-step mutations.

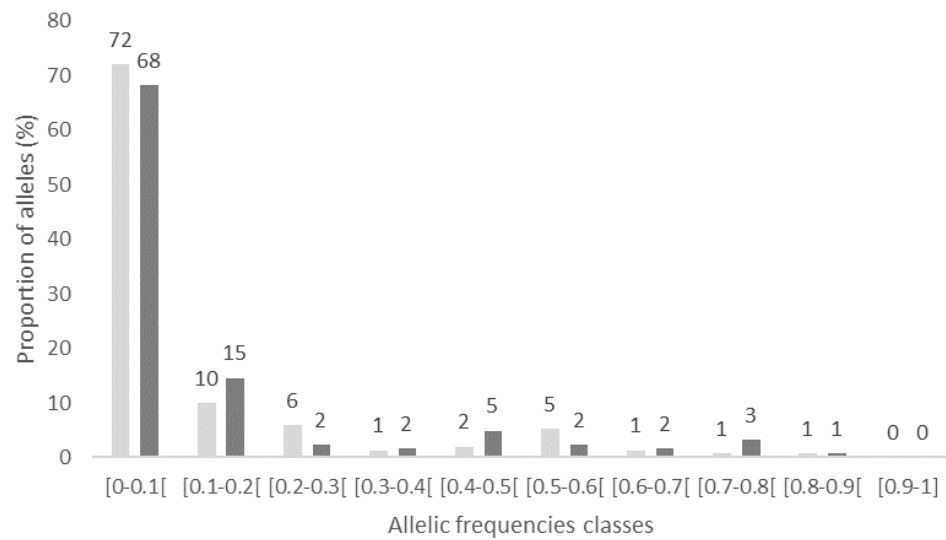
Supplementary table 10 : Detection of bottleneck signatures using the Wilcoxon's test for heterozygosity excess (three mutation models: IAM,TPM and SMM; 10,000 iterations) and the M-ratio. These analyses were performed on 20 loci.

	Heterozygosity excess				M-ratio
	IAM	TPM		SMM	
<i>Variance for TPM</i>	-	70%-30%	90%-10%	-	-
Vilaine	0.045	0.99	1	1	0.38
Mondego	0.00004	0.56	0.99	0.99	0.36

*Variance for TPM corresponds to a proportion of SMM in the TPM e.g. 70% single step mutations and 30% of multiple-step mutations.



Supplementary figure 11: Graphical output from the outlier analysis performed with LOSITAN. For each marker, the level of genetic differentiation (F_{ST}) is plotted against the expected heterozygosity (H_e).



Supplementary figure 12: Distribution of allele frequencies in Vilaine (light grey) and Mondego (dark grey). These analyses were performed on 16 loci (microsatellites with odd sized alleles were ignored).

CHAPITRE III : Réponses bioénergétiques de populations en environnements contrastés

Introduction

L'approche démo-génétique conduite précédemment (chapitre 2), a confirmé la réduction significative de la taille efficace de la population de flet du Mondego en limite Sud, relativement à celle de Vilaine localisée au cœur de la distribution de l'espèce. Il est donc clair que la population du Sud est affectée par des goulots d'étranglement démographiques récents liés au réchauffement climatique, confirmés par la variabilité interannuelle forte du recrutement du flet dans cet estuaire (Cabral *et al.*, 2007 ; Martinho *et al.*, 2009, 2010).

Des expériences de type « common garden » ont par ailleurs été menées dans le passé au LEMAR pour comparer les performances de flets juvéniles issus de différents estuaires (Mondego, Vilaine, Seine) vis-à-vis de stress expérimentaux ; elles se sont révélées d'un intérêt majeur pour mettre en évidence une vulnérabilité différentielle de ces 3 populations face à des stress : thermique ou thermique & hypoxique (Lavergne *et al.* 2015 ; Pédrón *et al.* 2017a, Pédrón *et al.* 2017b).

Dans ce chapitre 3, nous allons maintenant explorer le statut bioénergétique *in natura* des populations de flet précédentes, caractérisées par des environnements contrastés : un régime thermique élevé (Mondego), une pollution chronique soutenue (Seine) et un environnement globalement peu stressé (Vilaine). Les stress thermiques et chimiques peuvent conduire à des altérations significatives de la physiologie et des traits d'histoire de vie ; les organismes tendent alors à maintenir l'homéostasie de leur milieu intérieur par des compromis énergétiques (ou trade-off) entre différentes fonctions : maintenance, réparation des tissus, croissance , reproduction,... (Jayasundara *et al.*, 2017). Une rupture de l'équilibre énergétique se traduira par une perte de fitness au niveau individuel (Pörtner & Peck, 2010 ; Rosa *et al.*, 2012 ; Jayasundara *et al.*, 2017 ; Anacleto *et al.*, 2018).

Nous choisissons ici de comparer le métabolisme énergétique de flets sacrifiés *in natura*, afin d'identifier une possible signature de vulnérabilité dans les populations exposées à des stress thermique (Mondego) ou chimique (Seine), relativement à une population peu stressée (Vilaine). **Nous recherchons en fait des indicateurs bioénergétiques qui permettraient d'améliorer l'évaluation du risque écologique dans les populations de poissons sous stress chroniques.**

Méthodologie

Des flets juvéniles (0+) ont été capturés en automne 2009 au chalut à perche dans les trois estuaires de Seine, Vilaine et Mondego, puis immédiatement sacrifiés et disséqués sur le terrain. Les foies et les muscles blancs ont été prélevés et stockés en azote liquide. Des analyses chimiques sur les polluants organiques persistants (dont les PCB : CB 153) et le dosage des lipides totaux ont été réalisés sur un pool de foie et de muscle pour chacune des populations.

L'expression génique de 5 biomarqueurs du métabolisme énergétique a été étudiée : **CYP450 1A1** conduisant à l'oxydation d'un certain nombre de polluants organiques (première étape de la détoxification), **CCOII** et **ATPase FO** impliqués dans la chaîne de respiratoire mitochondriale, **12S** et **18S** considérés comme de bons indicateurs respectivement de la densité mitochondriale, et de l'activité de biosynthèse des protéines au niveau cytoplasmique.

Synthèse des résultats et discussion

Le contenu lipidique du foie est deux fois moins élevé en Seine relativement à la Vilaine et au Mondego ; il est aussi deux fois moins élevé dans le muscle en Seine et Mondego vs Vilaine. Ces résultats montrent globalement une capacité réduite des flets juvéniles issus d'estuaires contaminés (Seine) et chauds (Mondego) à stocker de l'énergie, relativement au système peu stressé (Vilaine).

L'analyse du CB 153 confirme un haut niveau de contamination chimique dans le foie des flets de Seine (800 ng.g⁻¹ DW) comparable à celui de grands estuaires de la façade Atlantique tels que la Gironde et la Loire (Evrard et al. 2010), relativement à une contamination très modérée en Vilaine comme dans le Mondego (CB 153 < 100 ng.g⁻¹ DW).

Mondego vs Vilaine-Seine

Le niveau d'expression de 4 gènes (CYP450, COII, 12S et 18S) est significativement plus élevé dans les populations du Nord (Vilaine et Seine) relativement à celle du Mondego en limite Sud de l'aire de répartition. Ce résultat conforte l'hypothèse généralement admise que les populations acclimatées aux conditions froides présentent une activité métabolique plus soutenue relativement aux populations en eaux chaudes (Fangue et al., 2009) ;

l'accroissement métabolique lié à une température croissante en zone Sud devant rester mesuré pour maintenir le registre métabolique du poisson et ainsi sa performance individuelle (Pörtner *et al.*, 2008 ; Sylvestre *et al.*, 2007). On remarque de plus, que les ratios COII/12S et ATP F0/12S sont significativement plus élevés dans le Mondego vs en Vilaine - Seine ; ils pourraient indiquer une plus forte activité par mitochondrie, soit un accroissement de l'efficacité mitochondriale dans la population du Sud. **Le statut bioénergétique du Mondego suggère que cette population présente une perte de fitness modérée relativement au réchauffement climatique, la réduction générale de son métabolisme énergétique étant classiquement considérée dans la littérature comme une réponse adaptative des populations du Sud. Notons que des expériences de common garden menées par notre équipe sur des flets juvéniles ont ainsi confirmé la meilleure aptitude d'une population Sud (Lima 200 km au Nord du Mondego) à résister à une multi-stress thermique et hypoxique, relativement à des populations Nord (Vilaine et Canche) (Pédrón et al. 2017a, 2017b).**

Nous suggérons que les populations de flets du Sud sont capables de minimiser leur densité de mitochondrie au niveau du foie et de maximiser l'activité par mitochondrie. Cette probable adaptation leur permettrait : (1) de prévenir une augmentation excessive de leur taux d'activité métabolique durant les événements chauds et (2) de maintenir une production d'ATP suffisante pendant les périodes froides durant lesquelles ces populations sont incapables d'augmenter la densité mitochondriale de leurs tissus, comparativement aux populations du Nord (Dhillon & Schulte, 2011).

Seine vs Vilaine

On observe une augmentation de la variabilité inter-individuelle dans l'expression des 4 gènes précédents (CYP450, COII, 12S et 18S) en Vilaine (milieu peu stressé) vs en Seine (très polluée). Cette variabilité phénotypique dans une population pourrait être considérée comme un proxy de sa variabilité génétique ; elle pourrait devenir un indicateur de l'état de santé d'une population en écotoxicologie (Devin *et al.*, 2014).

Le statut physiologique des poissons pourrait être a priori relativement proche en Vilaine et en Seine (régimes thermiques identiques, forte disponibilité en nourriture à la fin de l'automne), or nous observons une différence nette entre ces deux estuaires. Les plus fortes valeurs en Vilaine (vs Seine) concernant l'état des réserves et la diversité inter-individuelle dans l'expression des gènes pourraient refléter une meilleure capacité

adaptative de la population de Vilaine vis-à-vis de futurs changements environnementaux. Nous suggérons donc que la population de flets peu stressée de Vilaine présente un risque écologique limité. A l'inverse, la population de Seine soumise à une pollution chronique forte et caractérisée par une faible diversité inter-individuelle au niveau bioénergétique pourrait être soumise à un risque écologique significatif. Cette hypothèse a été partiellement confirmée par une expérimentation menée au LEMAR qui montre que la population de Seine pourrait présenter une plus faible tolérance au stress thermique, comparativement à la population de Vilaine (Lavergne *et al.*, 2015).

Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming

E. Borcier,¹ G. Charrier,¹ A. Amérand,² M. Théron,² V. Loizeau,³ N. Pédrón,¹ J. Laroche¹

¹Université de Bretagne Occidentale, LEMAR UMR 6539 CNRS/IRD/UBO/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané; ²Université de Bretagne Occidentale, EA 4324, Laboratoire Optimisation des Régulations Physiologiques (ORPHY), Brest; ³Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie, IFREMER, Centre de Brest, Plouzané, France

range and can be considered as a warm environment for the flounder.⁹ The chemical signature of the three estuaries was determined by measuring the concentration of a persistent organic pollutant, the polychlorinated biphenyl (PCB) CB153 in fish liver and muscle, that is a pertinent proxy of the contamination level of estuarine systems.¹⁰ This was followed with molecular markers evaluations in fish liver from the three locations, considering the expression level of several genes involved in detoxification (Cytochrome P450) and bioenergetics (Cytochrome C Oxidase, ATP synthase, 12S, 18S). The modulation of gene expression is an important component of acclimatization and/or adaptation of organisms to environmental changes,^{11,12} but can also provide reliable indicators of sub-lethal stress.¹³ The final objective of the study was to explore the variability in bioenergetic responses of flounder populations among the three environmentally contrasted estuaries, to assess the possible impacts of pollution and warming on fish collected in respectively the Seine and Mondego estuaries in comparison to fish from a weakly stressed system, the Vilaine.

Introduction

Estuaries are among the most anthropogenically degraded habitats on Earth. These shallow waters are particularly exposed to the impacts of pollution and global warming.^{1,2} The European flounder, *Platichthys flesus*, is a northern temperate catadromous fish widely distributed over Europe, that is considered as a sentinel species for the monitoring of estuarine water quality.^{3,4} The southern distribution limit of *P. flesus* is presently located along the Portuguese coast, and the European flounder is currently rare in the surroundings of Lisbon, where it was abundant a few decades ago.⁵ The southern limits of numerous other cold-water marine species are also shifting North along the Portuguese coast, this trend being probably linked to recent warming.⁶

The concept of energy-limited tolerance to stress, that focuses on the bioenergetic effects of stressors on organisms and their immediate consequences on fitness, appears particularly relevant for estuarine species that have to cope with a broad range of stressors.⁷ This approach provides useful tools to: i) investigate the vulnerability of wild populations facing stressors; and ii) improve the assessment of ecological risk in complex systems.

In this study, bioenergetic markers of *P. flesus* were assessed *in natura* in three contrasted environments: the highly polluted Seine estuary (France) that displays a chronic diffuse contamination, the moderately contaminated Vilaine estuary (France)⁸ and the Mondego estuary (Portugal) that represents the southern limit of the species' distribution

Materials and Methods

Fish collection and rearing

Thirty 0+ juvenile *P. flesus* were captured by trawl, in September-October 2009, in two estuaries located in the core of the distribution range of the European flounder (*i.e.*, Seine and Vilaine, France), as well as in the southernmost population of this species (*i.e.*, Mondego, Portugal) (Figure 1). Fish of similar size were quickly euthanized by cerebral dislocation. The liver and a piece of white muscle were sampled and immediately frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C until chemical and gene expression analyses.

Lipid storage and chemical analysis

All tissue samples were kept at -20°C until freeze-drying. The water content of samples was estimated from the weight loss during freeze-drying. Extraction and cleanup of fish tissues (liver and muscle) were performed.¹⁴ The lipid storage was assessed by gravimetric method and the concentration in CB153 was subsequently analysed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column.¹⁵

Gene expression

Five gene expression markers were evaluated: CYP450 1A1 (detoxification process), Cytochrome C oxidase sub-unit 2 and ATP synthase F0 (COII & ATP F0: mitochondrial respiratory chain), 12S and 18S (ribosomal activi-

Correspondence: Jean Laroche, LEMAR UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France. E-mail: jean.laroche@univ-brest.fr

Key words: European flounder; *Platichthys flesus*; pollution; global warming.

Funding: this work was financed by the ANR program: VMCS-EVOLFISH (Paris), the Région Bretagne and the Institution d'Aménagement de la Vilaine (IAV, La Roche Bernard).

Conference presentation: part of this paper was presented at *ECOBIM meeting*, 2016 May-June, Le Havre, France.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright E. Borcier et al., 2016
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2016; 6:6586
doi:10.4081/xeno.2016.6586

ties in the mitochondria and in the cytoplasm, respectively). Respectively 21, 26 and 25 fish from the Seine, Vilaine and Mondego were analysed. Total RNA was extracted from 150 mg of liver tissue using TRI Reagent® (Ambion), according to the manufacturer's recommendations. An additional DNase treatment using DNase RQ1 (Promega) was included to eliminate traces of genomic DNA. The concentration of extracted RNA was determined with a ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop®) and total RNA quality was analyzed by capillary electrophoresis with the Agilent 2100 bioanalyser (Agilent technologies) with an Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit. For each sample, 1 µg total RNA was reverse transcribed into cDNA using Revert Aid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit® (Fermentas), and a reference cDNA sample was produced by mixing equal amounts of RNA from individual samples.

All the primers used in the quantitative PCR amplifications are available in the literature.^{4,8,10,16} Two classical housekeeping genes were screened (Alpha-tubulin, Elongation Factor 1), and their variation coefficients were analyzed directly from their cycle threshold (Ct) values to define the gene displaying the most stable expression level. The Alpha-tubulin, a sub-unit protein of microtubules and thus a major constituent of the cytoskeleton, was finally retained as housekeeping gene, since it displayed the highest stability. PCR efficiency (*E*) was estimated for each primer pair by using a serial dilution (from 1/20 to 1/380) of reverse transcription products. Standard curves were generated for each

primer pair and E was determined using the formula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1. \quad (1)$$

For each primer pair, the dissociation curve generated a unique peak, and the PCR efficiency ranged between 99 and 100%. Real-Time PCRs were carried out in triplicate in a final volume of 10 μL using 4.86 μL of cDNA (1/40 dilution) with 5 μL of Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) and 0.07 μL of each primer (70 nM). PCR amplifications were performed in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) as follows: initial enzyme activation at 94°C for 15 min, followed by 50 cycles of 94°C for 15 s and 60°C for 1 min. For each reaction, a dissociation curve was calculated from 95 to 60°C by decreasing temperature by 0.5°C each 10 s in order to assess the specificity of the amplification. Each run included a reference cDNA control, a no template control, and a water control. The relative quantification of gene expression was calculated according to the comparative Ct method. The relative quantification value of each sample, normalized to the *Alpha-tubulin* gene and relative to the reference cDNA sample, was expressed as $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, where $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}(\text{candidate gene}) - \text{Ct}(\text{Alpha-tubulin}))$ and $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ of cDNA sample - ΔCt of reference cDNA control, with $E = 100\%$.

Data analysis

A Shapiro-Wilk test of normality and a Levene's test of homogeneity of variances were performed in R 2.13.2 (www.r-project.org/). Since data did not follow a normal distribution after logarithmic transformation, a Kruskal-Wallis Rank Sum Test using *kruskal.test* was followed by a multiple comparison test between treatments with *kruskalmc* function.

Results and Discussion

Fish total length (Mean $\pm$ SD in cm) was 13.60 $\pm$ 1.7 in the Seine, 13.28 $\pm$ 0.96 in the Vilaine and 13.41 $\pm$ 2.76 in the Mondego.

Lipid storage and contaminant level in fish tissue

The high PCB concentration observed in fish tissues (Figure 2) in the Seine (liver CB 153: 800 ng.g⁻¹ dw) confirms previous measurements in large and polluted French estuaries (*i.e.*, the Gironde & Loire: flounder liver CB 153 : 300 ng.g⁻¹ dw).¹⁰ On the other hand, the contaminant load measured in fish from the Vilaine and Mondego (liver CB 153 <100 ng.g⁻¹ dw) is comparable to that observed in the

pristine Ster estuary, France (liver CB 153 : 100 ng.g⁻¹ dw).¹⁰ These results suggest that the level of chemical stress is high in the Seine estuary and probably limited in the Vilaine and Mondego systems.

Contrasted patterns of lipid storage were observed by gravimetric method. The Seine estuary displayed a two times lower lipid content in liver (Mean $\pm$ SD: 10.36 $\pm$ 2.46) compared to the Vilaine and Mondego (19.05 $\pm$ 1.91 and 18.21 $\pm$ 4.43, respectively), and the Seine and Mondego showed a two times lower lipid content in muscle (2.35 $\pm$ 0.96 and 2.83 $\pm$ 0.71, respectively) compared to the Vilaine (5.96 $\pm$ 1.02). These results probably underline a reduced ability of flounder to store energy in the highly contaminated system (the Seine) and in the southern estuary (the Mondego) compared to the Vilaine, a moderately stressed system. This also confirms the general decrease in lipid content detected in juvenile flounder muscle in polluted *vs* pristine estuaries,¹⁷ and also a reduced capacity of southern *vs* northern fish populations to store energy.¹⁸

Detoxification and bioenergetic markers

A significant general increase of the gene expression level was clearly detected for four of the five analyzed genes in the Seine and Vilaine, *vs* the Mondego populations: CYP450 1A1, CO II, I2S and 18S (Figure 3). In addition to this gene upregulation a higher inter-individual variability (*i.e.*, standard deviation) was found for the same four genes in Vilaine *vs* Seine samples. The level of inter-individual variation could be a relevant indicator of population health in ecotoxicology.¹⁹ Considering that the physiological status of the sampled fish was probably similar in the two northern estuaries that display a similar thermal regime (immature young of the year, identical feeding status linked to a high abundance of preys in estuaries at the beginning of autumn), we suggest that the higher phenotypic diversity detected in the less stressed environment (Vilaine estuary) could reflect a higher genetic



Figure 1. Localization of the sampling sites (estuaries of the Seine, Vilaine and Mondego).

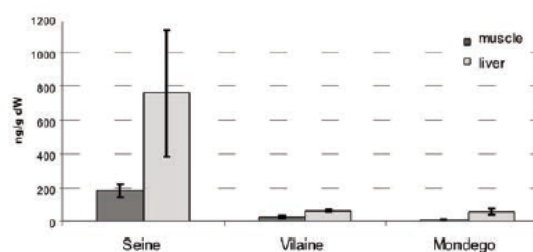


Figure 2. Mean (and standard deviation) of CB153 concentrations observed in flounder muscle and liver, for three Atlantic estuaries, expressed in ng.g⁻¹ of dry weight.

variability and possibly a better adaptive ability of this population. In contrast, the heavily polluted flounder population of the Seine estuary that displays a lower inter-individual variability could be possibly at risk. The same conclusion could also be formulated for the Mondego population, which also displayed a low inter-individual variability in gene expression levels for CYP450 1A1, COII, 12S and 18S; this might be also related to a differential physiological status of the fish sampled in this estuary.

The CYP450 is involved in the detoxification process and particularly in phase I of xenobiotics metabolism and is thus classically upregulated in contaminated estuaries.²⁰ Surprisingly, in the present study, the upregulation of CYP450 observed is relatively limited

in the highly polluted Seine system in comparison to the Vilaine estuary. However organisms chronically exposed to organic pollutants can develop a resistance conducting to a reduced inducibility of the CYP450.²¹ On the other hand, the expression level of CYP450 could be related to the level of contaminants in the other estuaries, with a lower signal in the weakly contaminated Mondego and a higher signal in the Vilaine where the presence of PAH was detected in a previous investigation.¹⁰

The lower expression level of three major genes involved in bioenergetics (CO II: oxidative phosphorylation; 12S: proxy of the mitochondrial density; 18S: proxy of protein biosynthesis) in the Mondego population compared to those from the Seine and Vilaine underlines

a general reduction of the metabolism in the southern peripheral population *vs* northern ones. On the other hand, no significant difference was detected among populations in the expression of ATP F0 (last complex of the oxidative phosphorylation). Furthermore, both ratios CO II/12S and ATP F0/12S showed higher values in the Mondego *vs* the Vilaine and Seine samples, that could indicate a higher activity per mitochondria, *i.e.*, an increase of the mitochondrial power output in the southern population. Gene expression changes do not necessarily equate to actual physiological changes in enzyme activity,²² however positive correlations were observed between proxies of molecular bioenergetics (levels of gene expression and enzymatic activities) in estuar-

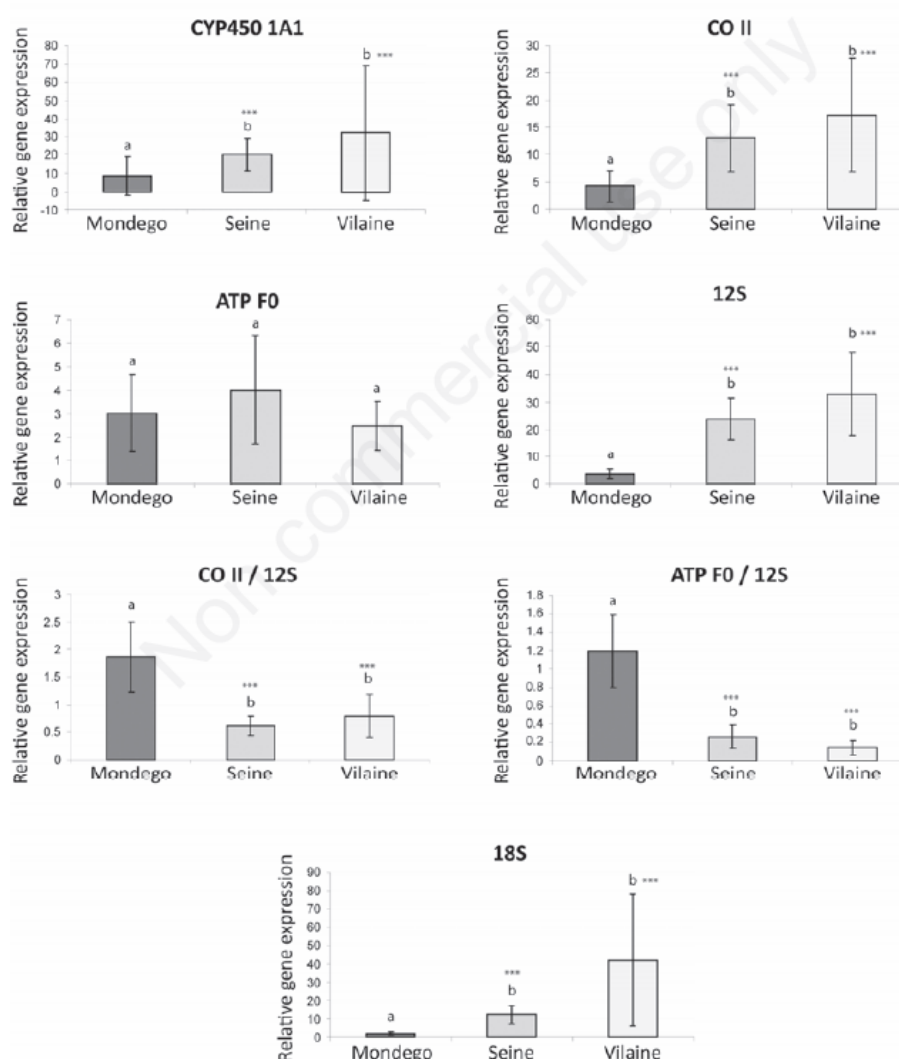


Figure 3. Expression level of six transcripts (CYP450, CO II, ATP F0, 12S, 18S) in the flounder liver tissues from different estuaries of the Atlantic coast (mean and SD) and ratios of expression levels (CO II/12S, ATP F0/12S). ***Significant difference ($P < 0.001$) between the considered population and the Mondego population.

ine fish populations of *Fundulus heteroclitus*.²³

Thus, in the present study, the molecular analysis of fish responses to estuarine conditions highlights contrasting patterns of gene expression in the Mondego population, localized at the southern limit of the species' range, compared to northern populations. These results support the hypothesis that cold-acclimated northern populations tend to display higher levels of metabolism compared to southern ones, as demonstrated in killifish along a latitudinal gradient (greater Cytochrome C Oxidase enzyme activity and CO II gene expression in most tissues in northern fish).²³ Results obtained in both European flounder and killifish confirm the concept of oxygen-limitation of thermal tolerance in ectotherms:²⁴ this model predicts that the metabolic increment elicited by rising temperature must be kept small in order to maintain aerobic scope and thus the individual performance. Furthermore, the prediction of this model is also supported at the level of the whole organism in two studies on killifish²³ and cod,²⁵ which underline a greater metabolic rate in northern fish than in southern ones.

Finally, the present study suggests that the European flounder may minimize the mitochondrial density in liver and maximize the activity per mitochondria in the southernmost region of its distribution range. This acclimation and/or adaptation mechanism may probably allow: i) preventing an excessive increase of the metabolic rate in *hot water* periods; and ii) maintaining a sufficient ATP production during *cold water* periods, when southern fish are probably unable to increase the mitochondrial density in tissues, comparatively to northern fish.²⁶

Conclusions

Energy-limited tolerance to stress can be considered as a framework to integrate effects of stressors⁷ in European flounder populations. The high values observed in fish energy reserve, metabolic activity and inter-individual variability in gene expression levels confirm that the moderately polluted Vilaine population is probably facing a low ecological risk. In the Seine estuary, the high fish load in contaminants associated with a decrease in energy reserve and a loss of inter-individual variability indicate a highly stressed system, probably displaying a significant ecological risk. In the southern population of the Mondego, the suggested general reduction of the energy metabolism in this *warm* environment is classically considered in the literature as a common adaptive response of southern fish populations. Thus this suggests that juvenile flounder from the Mondego may experience only a mod-

erate fitness loss in response to warming; however, the low inter-individual variability in gene expression may suggest a limited genetic variability, inducing a reduced ability of the southern population to evolve and adapt to future changes. Moreover, enzymatic activities linked to aerobiosis (Citrate synthase and Cytochrome C Oxidase) were measured in the three previous populations in a common garden experiment; they confirmed the inter-population variation in bioenergetics observed in the present study and suggested that much of this variation is possibly due to local adaptation.²⁷

References

- Rabalais NN, Turner RE, Diaz RJ, Justic D. Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES J Mar Sci* 2009;66:1528-37.
- Gillanders BM, Elsdon TS, Halliday IA, Jenkins GP, Robins JB, Valesini FJ. Potential effects of climate change on Australian estuaries and fish utilizing estuaries: a review. *Mar Freshwater Res* 2011;62:1115-31.
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, et al. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Env Sci Poll Res* 2013;20:738-48.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, et al. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Poll Bull* 2015;95:634-45.
- Cabral HN, Costa MJ, Salgado JP. Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Clim Res* 2001;18:119-26.
- Assis J, Castilho Coelho N, Alberto F, Valero M, Raimondi P, et al. High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLoS One* 2013;8:e68646.
- Sokolova IM. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr Comp Biol* 2013;53:597-608.
- Lavergne E, Pedron N, Calves I, Claireaux G, Mazurais D, Zambonino-Infante J, et al. Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Poll Bull* 2015;95:658-64.
- Martinho F, van der Veer H, Cabral HN, Pardal MA. Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *J Sea Res* 2013;84:61-9.
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Burgeot T, Riso R, Budzinski H, et al. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 2010;15:11-127.
- Whitehead A, Crawford DL. Neutral and adaptive variation in gene expression. *PNAS USA* 2006;103:5425-30.
- Larsen P, Nielsen EE, Williams TD, Hemmer-Hansen J, Chipman JK, Kruhöffer M, et al. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol* 2007;16:4674-83.
- Evans TG, Hofman GE. Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. *Philos T R Soc* 2012;367:1733-45.
- Bodiguel X, Loizeau V, Le Guellec AM, Roupsard F, Philippon X, Mellon-Duval C. Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p,p'DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean). *Sci Total Environ* 2009;408:304-11.
- Jaouen-Madoullet A, Abarnou A, Le Guellec AM, Loizeau V, Le Boulenger F. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *J Chromatogr A* 2000;886:153-73.
- Leaver MJ, Diab A, Boukouvala E, Williams TD, Chipman JK, Moffat CF, et al. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquat Toxicol* 2009;96:234-45.
- Kerambrun E, Henry F, Cornille V, Courcot L, Amara R. A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* 2013;91:498-505.
- Fangue NA, Mandic M, Richards JG, Schulte PM. Swimming performance and energetics as a function of temperature in killifish *Fundulus heteroclitus*. *Physiol Biochem Zool* 2008;81:389-401.
- Devin S, Giamberini L, Pain-Devin S. Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environ Int* 2014;73:282-7.
- Williams TD, Gensberg K, Minchin SD,

- Chipman JK. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquat Toxicol* 2003;65:141-57.
21. Brammel BF, Price DJ, Birge WJ, Elskus AA. Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: two varieties of resistance? *Comp Biochem Physiol C* 2013;157:212-9.
22. Nikinmaa M, Rytönen, KT. Functional genomics in aquatic toxicology-do not forget the function. *Aquat Toxicol* 2011;105:16-24.
23. Fangue NA, Richards JG, Schulte PM. Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *J Exp Biol* 2009;212:514-22.
24. Pörtner HO, Bock C, Knust R, Lannig G, Lucassen M, Mark FC, et al. Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Clim Res* 2008;37:253-70.
25. Sylvestre EL, Lapointe D, Dutil JD, Guderley H. Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol B* 2007;177:447-60.
26. Dhillon RS, Schulte PM. Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *J Exp Biol* 2011;214:3639-48.
27. Pédrón N. Structure génétique, réponses bioénergétiques et traits de vie, de populations de flets (*Platichthys flesus*) soumises au réchauffement climatique, sur un gradient latitudinal. PhD thesis. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2016.

CHAPITRE IV : Réponses des populations au stress chimique

Introduction & Méthodologie

L'approche en bioénergétique abordée dans le chapitre précédent a suggéré que la population de flet de Seine présente probablement un risque écologique important face aux futurs changements environnementaux. Cette hypothèse repose (1) sur la faible variabilité interindividuelle détectée en Seine au niveau de l'expression de certains gènes majeurs (CYP450 1A1, COII, 12S, 18S ; Borcier *et al.*, 2016), (2) sur la réserve énergétique réduite des individus, et (3) sur des expériences de laboratoires qui ont souligné la capacité réduite de cette population de Seine à répondre au stress thermique (Lavergne *et al.*, 2015).

La détermination de la nature des pressions environnementales et la compréhension de leurs effets sur les populations marines, doivent conduire à déterminer leur degré de vulnérabilité, afin de prendre des mesures de protection de ces populations, dans le contexte de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM, 2008).

Dans ce chapitre 4, nous prolongeons nos explorations sur le statut bioénergétique des populations de flet *in natura* dans l'estuaire fortement contaminé de Seine, vs dans un écosystème côtier a priori peu impacté par la contamination chimique, la Baie de Douarnenez. Nous élargissons nos recherches en incluant l'analyse des signatures lipidiques des tissus, et la variabilité génétique au niveau populationnelle. Ainsi, nous mesurons les activités enzymatiques, CCO et G6PDH, qui se sont révélées être des indicateurs pertinents respectivement du métabolisme énergétique et de la réponse possible au stress oxydant (Pédron *et al.*, 2017b). De plus, les indicateurs de défense (EROD), et de dommage (AChE), nous donnent des informations sur les niveaux de détoxification et de neurotoxicité. La quantification des lipides de réserve et des lipides membranaires permet d'étudier la capacité de stockage d'énergie au niveau individuel et le rôle structurel des lipides au sein des membranes cellulaires. Enfin, la réponse des poissons au stress chimique est aussi abordée au niveau populationnel, par une approche en génétique de populations ; nous recherchons ici une perte possible de diversité génétique dans le milieu fortement pollué relativement au système témoin. Parallèlement à l'analyse des marqueurs biologiques qui viennent d'être cités, les dosages de polluants organiques (PCBs, HAPs) et de métaux (As, Pb, Zn, Cd, Co, Cu, Cr, Ni, V) sont réalisés sur un pool de 5 poissons par population (muscle et foie analysés séparément) pour identifier le niveau d'exposition des poissons aux polluants.

Les approches précédemment décrites étaient menées sur des populations de flet juvéniles. Ce nouveau chapitre vise à développer une approche intégrative à travers

l'utilisation de nombreux outils sur des flets adultes en situation de post-ponte. L'objectif est ici de déterminer le statut « physiologique » des populations de Seine vs Douarnenez, durant une phase caractérisée par des réserves énergétiques limitées liées au coût physiologique élevé de la reproduction chez le flet (Kopko & Dabrowska, 2018), réduisant potentiellement la capacité des organismes à répondre aux stress environnementaux (Wang *et al.*, 2001 ; Wiersma *et al.*, 2004). Pour cela, 36 flets adultes (longueur totale > 25 cm) par estuaire ont été échantillonnés au printemps 2016 à l'aide d'un chalut à perche, en baie de Douarnenez et dans l'estuaire de la Seine, en aval du Pont de Normandie. Chaque individu capturé est sexé macroscopiquement, puis la longueur totale et le poids de la carcasse éviscérée ont été notés. Les échantillons de foie, muscle et cerveau ont été prélevés individuellement et stockés dans l'azote liquide. Deux pools de cinq muscles et de cinq foies ont également été collectés par estuaire et conservés à -20 ° C pour les analyses chimiques (métaux, PCBs, HAPs). Un fragment de nageoire caudale a été collecté individuellement et stocké dans de l'éthanol à 95% pour l'étude génétique.

Nous allons dans cette étude intégrer différents indicateurs bioénergétiques (activités enzymatiques concernant le métabolisme énergétique, contenu en lipides de réserve et membranaires) avec d'autres marqueurs biologiques (indicateurs de défense et de dommage, variabilité génétique) et chimiques (dosage de polluants métalliques et organiques) afin d'évaluer la vulnérabilité des populations de Seine et Douarnenez face au stress chimique ; ces populations étant affaiblies suite à l'effort de reproduction.

Synthèse des résultats et discussion

Globalement, les teneurs de polluants organiques et métalliques sont plus fortes en Seine vs Douarnenez. La somme des 7 PCBs (CB-28, -52, -101, -118, -138, -153, -180) dans le foie est ainsi dix fois plus élevée en Seine vs Douarnenez (720 / 70 ng.g⁻¹ poids sec, respectivement). Les dosages de métaux montrent une concentration plus élevée dans le foie que dans le muscle pour les deux populations. En général, les teneurs en métaux sont aussi plus fortes pour la Seine, sauf en ce qui concerne les niveaux de Cr et Pb qui sont nettement plus élevés (5,5 à 7 fois plus) dans le muscle à Douarnenez, ainsi que les niveaux de Pb et Zn, 1,5 fois plus importants dans le foie à Douarnenez. Ces tendances confirment le caractère plus fortement pollué du système estuarien de Seine vs de la Baie de Douarnenez, malgré l'amélioration de la qualité de l'eau de la Seine depuis les années 90 (Poisson, 2011).

Douarnenez, signatures de la migration de la population

Les forts niveaux de polluants métalliques trouvés dans le muscle (Cr et Pb) et le foie (Pb et Zn) en Baie de Douarnenez sont a priori surprenants ; cette baie ouverte se caractérisant par de très petits cours d'eau très peu impactés par la pollution chimique. Les forts niveaux pour certains métaux dans la population de Douarnenez pourraient être liés à la migration de reproduction des flets adultes, dans cette région de la pointe Bretonne. Les flets arrivent en Baie de Douarnenez pour débiter leur période de ponte en janvier, le pic de ponte étant en février ; en mars les individus reproducteurs quittent la Baie ; Déniel (1981) a ainsi émis l'hypothèse d'une migration des flets mâtures, de la Rade de Brest vers la Baie de Douarnenez pour se reproduire ; les individus hors période de reproduction étant localisés principalement dans l'estuaire de l'Aulne associé au plus gros bassin versant de la Rade de Brest. La migration entre les écosystèmes Rade de Brest & Baie de Douarnenez pourrait être confirmée par les fortes signatures métalliques (Pb, Zn) que nous trouvons dans les flets adultes capturés sur Douarnenez ; en effet, l'embouchure de l'Aulne est caractérisée par une contamination métallique (Pb, Zn, Ag) dans les sédiments et les mollusques, une des plus fortes de la façade Atlantique (Chiffolleau, 2017) ; notons que cette contamination métallique chronique est liée à d'anciens sites miniers présents dans le bassin de l'Aulne. Cette contamination métallique des flets capturés sur Douarnenez se traduit par une inhibition de l'ACHé du cerveau, plus forte relativement à celle de Seine : elle confirme que certains métaux peuvent induire de la neurotoxicité comme cela a été observé chez les poissons en contaminations expérimentales et *in natura* (Suresh *et al.*, 1992 ; Labrot *et al.*, 1996 ; de la Torre *et al.*, 2002)

Seine : signatures de stress, acclimatation-adaptation ?

L'activité G6PDH mesurée est plus faible dans les foies de flet de Seine vs Douarnenez. Cette baisse de l'activité pourrait traduire une moindre capacité des flets se trouvant dans un système fortement contaminé à répondre au stress oxydant ; elle pourrait conduire à terme à une perte de fitness de la population de Seine. Une plus forte activité CCO dans le muscle des flets détectée en Seine vs Douarnenez suggère un métabolisme énergétique plus élevé chez les poissons soumis à un fort stress chimique ; il pourrait refléter le coût physiologique lié à l'activation de mécanismes de protection et de réparation des dommages. La mesure de l'activité EROD ne montre aucune différence entre les flets de Seine par rapport aux flets de Douarnenez, ce qui est surprenant au vu de la forte contamination de l'estuaire de Seine par

des polluants organiques. Cette observation révélerait une capacité d'adaptation et/ ou une résistance plastique des poissons exposés à des pollutions chroniques soutenues (Brammell *et al.*, 2013).

Le ratio TG/FS (triacylglycérol/free stérols) est deux fois plus faible en Seine qu'à Douarnenez (2,38 vs 5.06) ce qui confirme un statut nutritionnel très réduit dans les milieux fortement contaminés. Les lipides membranaires en Seine montrent une plus forte proportion des FS (free stérols), SPG (sphingolipides) et PS (phosphatidylsérine) ainsi qu'une diminution des PC (phosphatidylcholine) et PI (phosphatidylinositol). Ceci pourrait être lié à une augmentation de la quantité de micro-domaines dans les membranes cellulaires (appelés radeaux lipidiques), particulièrement dans le réticulum endoplasmique, afin d'améliorer la capacité des cellules à métaboliser les xénobiotiques.

Intégration des réponses phénotypiques

La corrélation positive entre le niveau de sphingolipides et l'activité EROD pour la population de Douarnenez suggère que dans des milieux présentant une contamination par les polluants organiques modérée, une augmentation des SPG dans les membranes augmenterait l'activité catalytique du CYT P4501A et donc permettrait une meilleure gestion des xénobiotiques (biotransformation, élimination).

En Seine, une corrélation positive est observée entre les activités CCO, G6PDH et SPG. Les SPG, caractérisés par de longues chaînes d'acides gras saturés, pourraient être peu affectés par le stress oxydatif induit par les polluants ; ce stress oxydatif limité permettrait alors d'assurer un meilleur fonctionnement de la G6PDH et de la chaîne de phosphorylation oxydative. Cette hypothèse sur les relations entre phospholipides membranaires – stress oxydatif – métabolisme des xénobiotiques doit être considérée avec précaution, car elle repose uniquement sur des corrélations entre marqueurs biologiques.

Diversité génétique maintenue dans une population exposée à une pollution chronique forte

La diversité génétique intra-populationnelle est identique entre les deux populations de flet de Seine et Douarnenez ; par ailleurs aucune différenciation génétique significative n'a été mise en évidence entre les deux populations. Ces résultats reflètent probablement (1) l'existence de flux de gènes significatifs sur l'ensemble du secteur Manche Est – Manche Ouest, (2) que la population de Seine n'a vraisemblablement pas été affectée par des goulots

d'étranglements démographiques successifs pouvant accélérer la dérive génétique. Finalement, en considérant les marqueurs génétiques neutres retenus dans notre étude (microsatellites) la population de Seine maintient donc sa diversité génétique.

Conclusion

Cette étude confirme la pertinence du modèle flet comme une espèce sentinelle majeure pour évaluer le statut écologique des zones côtières et estuariennes. Nous avons pu ici diagnostiquer une perte de fitness dans la population la plus exposée au stress chimique, particulièrement matérialisée par une perte des réserves énergétiques, par une capacité moindre à gérer le stress oxydant par la voie de la G6PDH, et enfin par une augmentation du métabolisme énergétique. A l'inverse une certaine capacité adaptative de la population hyper-exposée s'exprime particulièrement au niveau de l'interaction entre l'augmentation de la teneur des membranes en sphingolipides, une réduction possible des effets du stress oxydant sur ces membranes et en conséquence un meilleur fonctionnement du métabolisme des xénobiotiques et de la phosphorylation oxydative. Au final, cette étude suggère que le suivi des modifications de la teneur des membranes en phospholipides pourrait devenir un outil majeur pour approfondir notre compréhension sur les mécanismes d'acclimatation-adaptation aux xénobiotiques et potentiellement sur les capacités de résilience des populations dans des contextes de pollutions chroniques massives.

Impacts of differentially contaminated coastal ecosystems on European flounder populations: biomarkers, bioenergetics and phospholipids

Elodie Borcier^a, Grégory Charrier^a, Jérôme Couteau^b, Géraldine Maillet^b, Fabienne Le Grand^a, Antoine Bideau^a, Matthieu Waeles^a, Stéphane Le Floch^c, Rachid Amara^d, Vianney Pichereau^a, Jean Laroche^a

^a Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

^b TOXEM, Le Havre, France

^c CEDRE, Brest, France

^d Université du Littoral, Laboratoire d'Océanologie et Géosciences UMR 8187, Wimereux, France

Abstract

Adult flounders were collected in the field after the spawning season, in the heavily polluted Seine estuary vs in the moderately polluted Bay of Douarnenez. Globally, the analysis of liver fish contamination underlined higher levels of PAH, PCB and metals in Seine vs Douarnenez. However, higher levels of Pb and Zn were detected in the Douarnenez flounders; this trend being probably related to the fish habitat outside the reproduction period, located in a metal contaminated estuary.

The body reserves were seriously depleted in Seine vs Douarnenez fish, considering condition factor, level of muscle protein, lipid ratio (triacylglycerol / free sterols). Furthermore, the heavily polluted fish displayed reduced level of liver G6PDH activity, but higher level of cytochrome c oxydase activity, underlining respectively a possible reduced capacity to manage the oxidative stress and a higher energetic metabolism in the Seine estuary.

A reduced brain AChE activity in the moderately polluted Douarnenez bay could be linked to the particular fish metallic contamination.

An increase of particular muscle membrane phospholipids (sphingolipids, phosphatidylserine, free sterols) was detected in the Seine vs Douarnenez fish.

The integration of the previous markers allowed to hypothesize a “mechanistic approach” on the relationships between membrane phospholipids, oxidative stress and xenobiotic metabolism. We suggest that membrane lipids could become efficient markers in the future, to better explore pathways and mechanisms in xenobiotic acclimation and resilience.

The genetic diversity of the two flounder populations was analysed considering neutral biomarkers and showed no loss in genetic variability in the Seine vs Douarnenez populations. We suggest that the current maintenance of the genetic diversity in the Seine fish could be linked to the absence of frequent demographic bottlenecks in this population, and thus to a limited possibility of genetic drift or inbreeding leading to a genetic diversity loss.

Introduction

All over the world, the estuaries are affected by numerous anthropogenic pressures: diffuse chemical pollution and dredging inducing an alteration of the water quality, eutrophication increasing the risk of hypoxia, and expansion of harbours, industries and cities reducing intertidal areas; furthermore, these shallow estuarine systems are particularly exposed to the global change related heat stress, and thus are increasingly submitted to multistress (Wolanski and Elliott, 2015; Robins *et al.*, 2016; Gunderson *et al.*, 2017; Hallett *et al.*, 2017; Sinha *et al.*, 2017).

Over European coastal areas and estuaries, integrated assessment of contaminants impacts are currently developed encompassing different matrices (sediment, fish, molluscs) and end-points (chemical analyses, biological effects) (Hylland *et al.*, 2017; Vethaak *et al.*, 2017); their main objective being to assess the status of marine environments in the context of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD 2008).

The European flounder (*Platichthys flesus*) is becoming a major sentinel species to explore the environmental status of estuarine systems. This weakly exploited species is commune over Europe, young juveniles being recruited in estuaries where they stay at least two years, before migrating to the mouth of estuaries for reproduction; most individuals returning to their original estuary after spawning (Dando, 2011). Fitness loss (reduced fish growth and condition index, reduced fecundity), numerous changes in gene expression (alteration in apoptosis, energetic metabolism, immunity; response to oxidative stress; induction of detoxification pathways) and “biomarker” signals were detected in flounder populations located in chronically contaminated environments (Marchand *et al.*, 2004; Falciani *et al.*, 2008; Evrard *et al.*, 2010; Zacchino *et al.*, 2012; Laroche *et al.*, 2013; Dupuy *et al.*, 2015; Borcier *et al.*, 2016; Capela *et al.*, 2016; Burgeot *et al.*, 2017; Dabrowska *et al.*, 2017).

Contrasting patterns of energy metabolism detected by transcriptomic responses, enzymatic and proteomic approaches (Galland *et al.*, 2013; Borcier *et al.*, 2016; Pédrón *et al.*,

2017a) and differential membrane phospholipid composition (Pédrón *et al.*, 2017b) were observed between European flounder populations *in natura*, and in common garden experiments. These inter-population differences in bioenergetics suggest that flounder populations could display differential capacity to cope with environmental stressors (Lavergne *et al.*, 2015; Pédrón *et al.*, 2017b); furthermore, they highlight that the Cytochrome C Oxidase activity (CCO: the terminal electron acceptor in electron chain transport) and of the G6PDH activity (involved in the pentose phosphate pathway shunt) could be considered as pertinent proxies of respectively aerobiosis and anabolism - defense against oxidative damage.

Population genetics studies were also conducted on the European flounder; they highlighted selective pressure on different genes involved in detoxification, apoptosis and bioenergetics, modifying the genetic variability in polluted vs moderately contaminated populations (Marchand *et al.*, 2010, 2013; Calvès *et al.*, 2013).

In the present study we have compared the levels of chemical contamination and phenotypic signatures in flounder populations (condition index, biomarker of defense (EROD), biomarker of damage (Acetylcholinesterase), bioenergetics and phospholipids), in two contrasted environments: the moderately contaminated bay of Douarnenez (Chiffolleau, 2017) vs the Seine estuary ranked among Europe's most highly polluted estuaries (Burgeot *et al.*, 2017). Adult flounders were collected after the spawning season, spent fish being characterized by the lowest condition index and muscle lipid level (Kopko and Dabrowska, 2018). We suggest that this post-spawning stage could be a sensitive period of the life cycle in polluted environments, because physiological cost of reproduction could conduct to a diminished stress resistance (Wang *et al.*, 2001; Wiersma *et al.*, 2004).

Population-genetic methods applied to wild fish exposed to pollution may improve our understanding of demographic process (O'Leary *et al.*, 2013; Hamilton *et al.*, 2016). We suggest that the life cycle of *P. flesus* could promote the development of fine-scale population structure; thus in this study, we have compared the genetic diversity of Douarnenez vs Seine populations, considering neutral markers (microsatellites), to assess the level of genetic differentiation between them and explore a possible loss in genetic diversity in the heavily polluted population.

Finally, the main objectives of the present study were to analyse the potentiality of several markers (bioenergetics, phospholipids, genetic diversity): (1) to explore the flounder

responses to chemical stress in the field, (2) to contribute to the environmental status assessment of coastal ecosystems.

Materials and Methods

Fish sampling

Adult flounders (fish total length > 25 cm) were sampled by a beam trawl, over the same period (8-12 march 2016), in the bay of Douarnenez and in the lower part of the Seine estuary, downstream the “Pont de Normandie” (Fig.1). The limited total river basin of the bay of Douarnenez (230 km²) is mainly devoted to agriculture and shows two main rivers (Kerharo and Ris) characterized by a weak flow < 3 m³/s; a reduced human population being observed over the basin (29000 inhabitants) (FDPPMA29, 2012). The bay of Douarnenez shows levels of metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn), PAHs (fluoranthene and phenanthrene), PCBs (CB 153, CB 118) in sediment and mussels below the median observed for a large coastal region including the northern part of the bay of Biscay and Brittany (Chiffolleau, 2017); thus the bay of Douarnenez could be considered as a moderately contaminated ecosystem.

On the other hand, the Seine river basin is displaying big cities (Paris: 10 millions inhabitants, Rouen: 400 000 i., Le Havre: 250 000 i.), big harbors (Rouen, Le Havre) and major industrial areas (Elbeuf, Rouen, Le Havre); the average annual Seine flow was measured 150 km upstream from the mouth of the estuary (500 m³/s) (Poisson, 2011). Despite a general improvement of the Seine water quality since 1990, levels of Pb, Zn, Cd and Hg in sediments and levels of Ag, Pb and Cd in mussels remain very high relatively to the median detected over the French Atlantic coasts; furthermore, the levels of PAHs in mussels are higher compared to the median contamination of the Atlantic coast, while the levels of PCBs in sediments and mussels are clearly the highest of the French coasts (Poisson, 2011). Thus, the Seine estuary could be considered as a heavily polluted ecosystem.

36 fish were collected by estuary, then killed by cervical dislocation immediately after capture. For each individual sample, sex was determined macroscopically, then the total length and the gutted-carcass weight were measured. A sample of gonad was conserved in a solution of formaldehyde 4% for histology. The whole brain, the liver and a sample of muscle were flash-frozen and stored in liquid nitrogen until further analysis. Two pools of 5 muscles and 5 livers were also collected by estuary, and conserved at -20°C for chemical analyses

(metals, PCBs, PBDEs, PAHs). A caudal fin fragment was collected individually and stored in 95% ethanol for the genetic study.

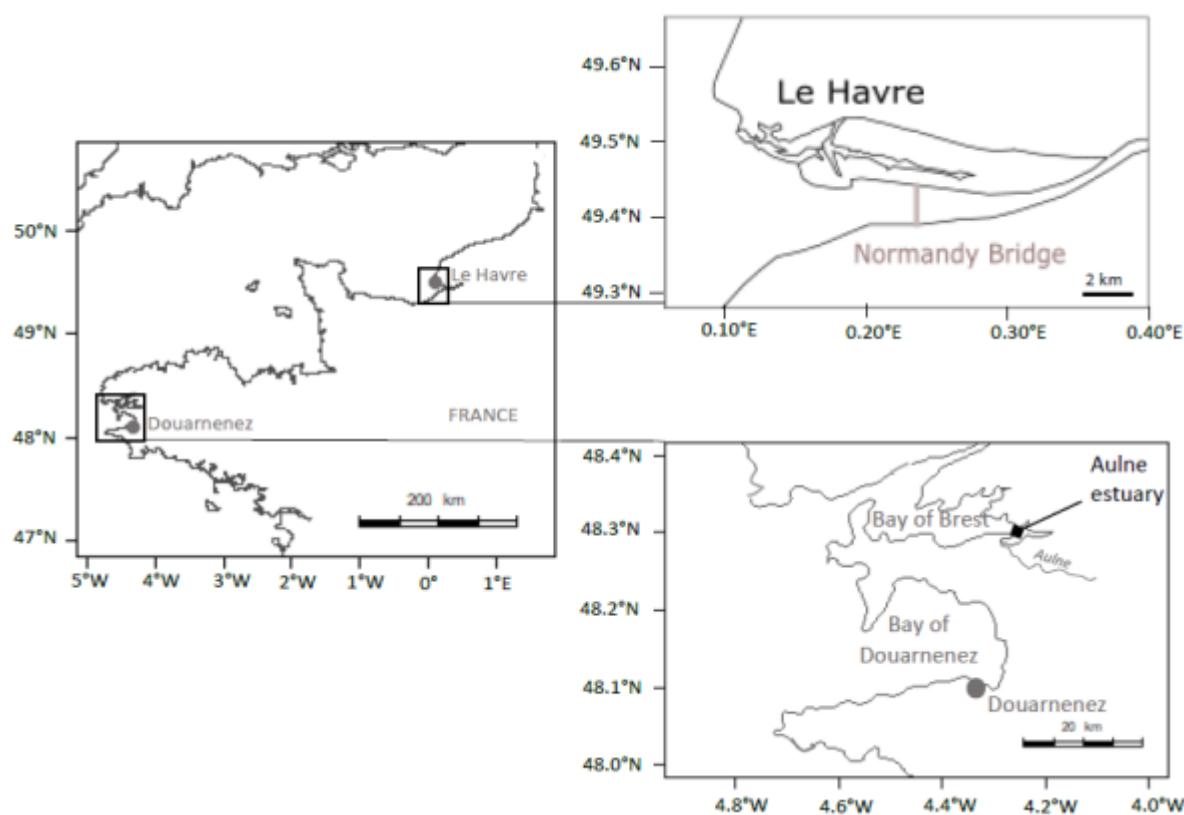


Fig. 1: Location of sampling sites (Bay of Douarnenez, Seine Estuary).

Fulton's condition index (K) was assessed with the formula : $k = 100 \cdot (W/L^3)$ where W= gutted body weight (i.e. carcass without internal organs) (g) and L = total length (cm) (Peig and Green, 2010). The hepato-somatic index (HSI) was calculated with the relation : $HSI = 100 \cdot (LW/W)$ where LW= liver weight (g) (Lambert and Dutil, 1997).

Metal analysis

After weighting 200 mg of dried and powdered material, digestions were done at 105°C for 4h in closed 15-mL Teflon screw-cap vials (Savillex, Minnetonka, USA) with 4 mL suprapur 65 % nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 mL suprapur 30% hydrogen peroxide (Merck). Measurements were then conducted on diluted mixtures (2.5% HNO₃) using an ICP-quadrupole mass spectrometer (X-series II, Thermo Scientific) operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest). The various concentrations presented in this study were well above detection limits and digestion blanks were below detection limits. Three certified reference materials from NRCC (National Research Council of Canada) including, fish

protein, dogfish liver and lobster hepatopancreas, were used for assessment of the method accuracy (Table 1).

	DORM-4		DOLT-5		TORT-3	
	measured (n=5)	certified	measured (n=5)	certified	measured (n=5)	certified
As	7.6±0.7	6.9±0.5	32±6	35±6	59±11	60±4
Cd	0.31±0.04	0.30±0.02	12±2	14.5±0.6	34±5	42±2
Co	0.28±0.03	0.25*	0.29±0.09	0.27±0.03	1.04±0.06	1.06*
Cr	1.5±0.1	1.9±0.2	1.0±0.2	2.3±0.6	0.9±0.1	1.9±0.3
Cu	16.1±0.9	15.7±0.5	31±4	35±3	350±80	500±30
Ni	1.20±0.08	1.3±0.2	0.7±0.2	1.7±0.7	4.2±0.4	5.3±0.3
Pb	0.30±0.09	0.42±0.06	0.04±0.03	0.16±0.04	0.26±0.07	0.23±0.02
V	1.5±0.1	1.6±0.2	0.50±0.04	0.51±0.06	8.8±0.3	9.1±0.4
Zn	49±7	52±3	96±14	105±6	125±9	136±6

*indicative value

Table 1 : Determination of elemental concentrations (in $\mu\text{g.g}^{-1}$, dry material), compared to certified values for reference materials from NRCC: DORM-4 (fish protein), DOLT-5 (dogfish liver), and TORT-3 (lobster hepatopancreas).

Organic pollutants analysis

The concentration of 24 HAPs, 26 PCBs, 28 pesticides and 7 PBDEs were studied in fish tissues by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) using a method adapted from Lacroix et al. (2014). Briefly, for each organism, 100 mg wet weight (w.w.) of tissue were digested by saponification and analytes were extracted for 16 hours at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). Bars were subsequently analysed using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). The GC column is a Restek Rxi-5ms (30m, 0.25 mm, 0.25 μm). Thermodesorption and GC-MS/MS conditions were as previously described. Analytes were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar. A mean tissues water percentage of 81% was measured by drying samples at 50°C until mass remained constant. Results are expressed as μg analytes/kg dry weight (d.w.). Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava et al, 2011) and limit of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by 3. Analytical quality control was made using the Standard Reference Materials 1974c "Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)" provided by the National Institute of Standards (SRM) and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

Enzymatic activities

AChE & EROD

The liver and the brain were weighed and homogenized in cold 0.1 M phosphate buffer with pH 7.8 (and 0.1% Triton 100X for brain) (250 mg brain tissue per ml of buffer), and the extractions were realized with a manual homogenizer. Homogenates were centrifuged in refrigerated centrifuge at 4°C for 20 min at 10 000×g and supernatants used for EROD activity, cholinesterase activity and protein assays.

Brain AChE activity was determined within 24h in quadruplicate according to the colorimetric method of Ellman et al. (1961) at room temperature. Acetylthiocholine iodide (ATCh) was used with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) as the thiol indicator. The reaction mixture contained: 340 µl phosphate buffer (pH 7.8, 0.1 M), 20 µl DTNB (0.01 M in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.8) and 10 µl of aliquots of supernatants. The reaction was initiated by addition of 10 µl of ATCh 0.1 M to the reaction mixture. The rate of TNB production evaluated during 2 min at 412 nm was used to estimate substrate hydrolysis.

Liver ethoxyresorufin O - deethylase (EROD) activity was measured in quadruplicate with modification as described by Burke and Mayer (1974) and in accordance with AFNOR standard XP T90-336-2. The reaction mixture contained 200 µl phosphate buffer (pH 7.8, 0.1 M), 10 µl ethoxyresorufin (46 µM), and 10 µl of aliquots of supernatants. The reaction was initiated by addition of 10 µl of NADPH (10 mM) to the reaction mixture. The progressive increase in fluorescence, resulting from resorufin formation, was measured for 8 min (excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 585 nm).

Protein was determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. AChE and EROD activities were respectively expressed as µmol of acetylthiocholine (AcSCh) hydrolyzed per min per milligram of protein and pmol of resorufin per min per milligram of protein.

CCO & G6PDH

Liver and muscle tissues were crushed in a mixer mill (MM400, RETSCH, Germany) under nitrogen atmosphere. Tissues were homogenized in ice-cold buffer for three bursts of 20 s using Ultra Turrax T25 tissue homogeniser. Homogenization conditions were realised in

extraction buffer of pH 7.5, 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), 1 mM EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid), 0.1 % Triton X-100.

Enzymes were measured on a 96-wells microplate spectrophotometer (OMEGA PolarStar, BMG, Labtech) using 8 x 12 multicell blocks, maintained at a temperature of 22°C.

Reaction conditions varied according to enzymes and protocole used:

Cytochrome C Oxydase (CCO; EC 1.9.3.1, Dupuy *et al.* 2015, Gauthier *et al.*, 2008, Pédrón *et al.*, 2017): NaPhosphate Buffer 0.33 M, pH=7, Cytochrome C 2 mM, DTT 0.1 M. Activity of CCO were measured at 550 nm.

Glucose 6-phosphate hydrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49, Gauthier *et al.*, 2008) : Imidazole buffer ((imidazole 50 mM, MgCl₂ 25 mM, KCl 70 mM), pH 7.5, β - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 0.3 mM, glucose-6-phosphate 200 mM (omitted in controls). G6PDH activity was undetected in muscle samples and was only measured in liver at 340 nm.

Protein extraction was carried out with approximately 100 mg of tissue adjusted to 1/40 for liver tissue and 1/50 for muscle tissue with the corresponding volume of HEPES-EDTA extraction buffer (pH 7.5, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100). To calculate the protein concentration, the Bradford method was applied using bovine serum albumin as a standard (BIORAD Laboratories, USA): 10 μ L of the dilution (1/40 or 1/50) were put in 200 μ L of Bradford reagent, following a dilution range (from 0.5 mg.ml⁻¹ to 0.0625 mg.ml⁻¹ for liver and from 0.5 mg.ml⁻¹ to 0.031 mg.ml⁻¹ for muscle). The absorbance DO was reading at 595 nm.

Lipids analysis

Muscle tissue fragment (approximately 150 mg) were extracted in 6 ml of Folch solution (chloroform:methanol, 2:1) and placed 10 min in ultrasonic condition before agitation. The high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) method on glass plates (20 x 10 mm) pre-coated with silica gel 60 from Merck (Darmstadt, Germany) were developed for *P. flesus* lipid classes analysis. Neutral lipids (TAG) and polar lipids (PL) were analysed separately by HPTLC as described in Haberkorn *et al.* (2010). Firstly, run was performed to remove possible impurities using hexane; diethyl ether (97:3, v:v), and plate was activated for 30 min at 120°C. Lipid samples were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland). TAG and other neutral lipid were separated with double distinct solvent systems. The first solvent system contained hexane: diethyl ether: acetic acid (20:5:0.5, v:v:v). The second was composed of hexane:diethyl ether (97:3, v:v). After dipping

plates in a copper sulfate-phosphoric acid solution and heating for 30 min at 180°C (charring), six neutral lipids classes were analysed: sterol esters (ST EST), glyceride ethers (GL ETH), triacylglycerol (TG), free fatty acid (FFA), fatty alcohols (ALC), and free sterols (FST), as black spots. All these lipids, excepted FST, are the storage lipids. For PL, it's the same technique of activation and coloration than TAG class. The system solvent used for the pre-run and run was contained of methyl acetate: isopropanol: chloroform:methanol:KCl aqueous solution of 0.25% (10:10:10:4:3.6, v:v:v:v:v). Some phospholipids were separated: sphingolipids (SPG), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), cardiolipins (CL), phosphatidylethanolamine (PE). All of these lipids are part of membrane lipids class.

Genetic diversity

GENOTYPING

DNA extraction was performed according to a phenol chloroform protocol adapted from Sambrook et al. (1989). DNA concentration was estimated using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and DNA samples were diluted to 20 ng·mL⁻¹ in ultrapure water for molecular biology, DNase, RNase and protease free (EMD Millipore).

A set of 20 microsatellites was successfully amplified and optimized. These loci were chosen since they displayed limited departures from Hardy-Weinberg equilibrium in previous population genetics studies conducted on European flounder (Dixon, 2003; Casas *et al.*, 2005; Hemmer-Hansen *et al.*, 2007; Florin & Höglund, 2008; Calvès *et al.*, 2013; Pédrón *et al.*, 2015). For each locus, the forward primer was tailed with a universal primer to reduce genotyping cost (Schuelke, 2000). Seven different universal primer were used, each of them labelled with a fluorescent dye, that had been previously used to genotype microsatellites in *P. flesus* (Calvès *et al.*, 2013; Pédrón *et al.*, 2015). For loci suffering from excessive stuttering, a PIG-tail (5'-GTTTCTT) was added to the 5'-end of the reverse primer to avoid genotyping errors due to 'plus-A' PCR artefacts (Brownstein *et al.*, 1996). Each locus was amplified by simplex polymerase chain reaction (PCR) in 10 µL volume, containing 5X green Go Taq reaction buffer (Promega), 0.5-1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.02 mM forward primer, 0.2 mM reverse primer, 0.2 mM universal primer (fluorescent), 0.25 U green Go Taq polymerase (Promega) and 1 µL DNA template. PCR amplifications were performed in a Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A touchdown procedure was included in the thermal cycling regime to

increase the stringency of the PCRs and, for each locus, annealing temperatures were set up according to the melting temperature of the primer pair (T_{mL}) and the tailed universal primer (T_{mU}) : 95°C for 3 min, $T_{mL}+2^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 72°C for 30 s, (95°C for 30 s, $T_{mL}+1^{\circ}\text{C}$ for 30 s [-1°C per cycle until $T_{mU}-3^{\circ}\text{C}$], 72°C for 30 s) x 1-8 cycle(s), (95°C for 30 s, $T_{mU}-3^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 72°C for 30 s) x 28-44 cycles, 72°C for 5 min.

The 20 microsatellites were grouped into three panels of six or seven markers, and for each panel, 3 μL of each amplified locus (except 6 μL for Nplaf_28) were mixed together. One μL of pooled PCR products was mixed with 10 μL Hi-Di formamide and 0.15 μL GeneScan 500-LIZ size standard (Applied Biosystems). The sequencing of PCR products was carried out on a capillary sequencer ABI 3130 (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analysed with GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems), and were scored independently by two readers in order to minimize genotyping errors. Individuals with more than 50% missing data were removed from the data set, resulting in 30 individuals successfully genotyped per population (Douarnenez and Seine). For downstream analyses, the genotype matrix was converted into proper input files with CREATE 1.37 (Coombs et al. 2008).

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY

Allelic diversity (N_a) was calculated with GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). Observed and expected heterozygosities (H_o and H_e , respectively) were assessed for each locus and over all loci in each population using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). F_{IS} were estimated for each locus and population in GENETIX in order to evaluate departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and their significance was tested with 5000 permutations. Pairwise F_{ST} values (Weir and Cockerham, 1984) were calculated with GENETIX v 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). The occurrence of null alleles and genotyping errors was verified with MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Statistical analyses

Statistical analyses were realised with R software (v.3.5.0) implemented in Rstudio (v. 1.1.453). Differences between populations were tested using t-test when the homoscedasticity and homogeneity of variances were respected. Otherwise, the Kruskal-Wallis tests were applied. Graphical analyses were performed with “ggplot” package of R. A p-value lower than 0.05 was considered as a significant difference. Principal Component Analyses were performed with the FactorMineR (Lê *et al.*, 2008) package with default settings.

Results

Contaminant concentrations

The concentrations of particular metals (Co, V, Zn) in flounder muscle were significantly higher in Seine vs Douarnenez (ratio of concentrations ≈ 1.5), the bioaccumulation of As being also higher in Seine (ratio = 5.5) (Fig 2a). On the other hand, higher concentrations of Cr and Pb were detected in Douarnenez vs Seine ($5.5 < \text{ratio} < 7$). No differentiation in bioaccumulation of Cd, Ni and Cu in muscle was observed between the two flounder populations (Fig 2a).

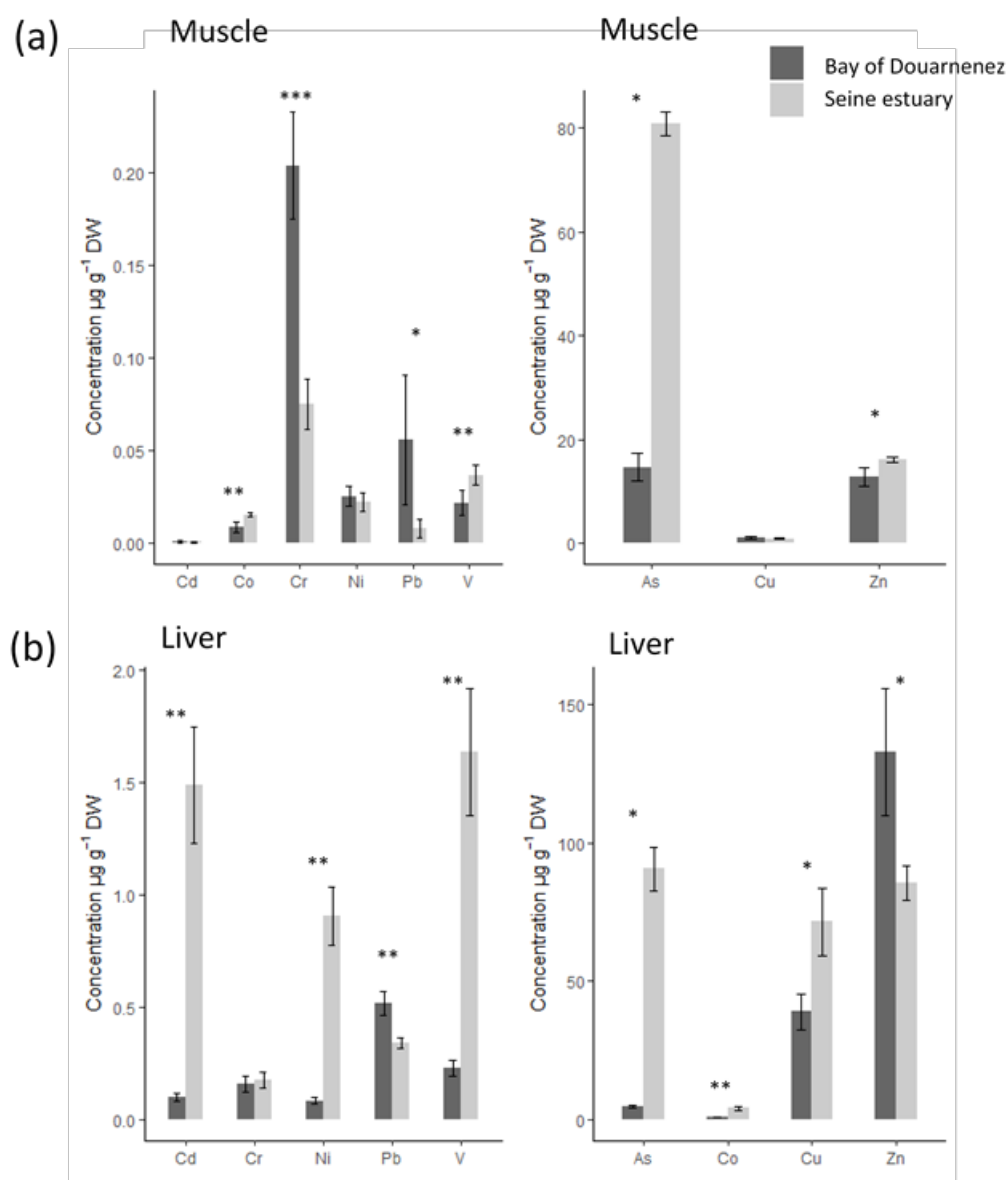


Fig.2 : Metal concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) in muscle (a) and liver (b), for two fish populations (Seine and Douarnenez). (p-value following Kruskal-Wallis test : * : p-value<0.05; ** : p-value<0.01; *** : p-value<0.001).

The levels of metals are higher in liver vs muscle ($2 < \text{ratio of concentrations} < 10$) (Fig 2b). The patterns of metal concentration were very contrasted between liver and muscle; thus liver Cd, Ni, V, As concentrations were significantly higher in Seine vs Douarnenez ($7 < \text{ratio} < 20$). An inverse trend was detected for the liver Pb and Zn concentrations which were higher in Douarnenez vs Seine (ratio = 1.5) (Fig 2b).

The analysis of organic pollutants (PAHs and PCBs) in flounder tissues confirmed the differential contamination status of Seine vs Douarnenez. The PAH naphthalene was detected in the Seine liver ($97 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$), but was undetected in the Douarnenez liver (Table 2). Furthermore, the concentrations of liver PCBs (101, 118, 153, 138, 180) were higher in Seine vs in Douarnenez populations (ie, PCB 153: $255 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ vs undetected; PCB 138: 290 vs $45 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$). The same trend was observed for muscle PCBs; PCBs (101, 118, 153, 138) displaying concentrations varying from 69 to $167 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ in the Seine population, and were undetected in the Douarnenez population (Table 2).

Table 2: PAH and PCB concentrations in liver (L) and muscle (M) in Seine estuary (S) and Douarnenez bay (D). (one sample: a pool of five fish tissues).

ng.g⁻¹ DW	LS	LD	MS	MD
naphthalene	97.26	-	-	-
PCB 101	91.32	-	70.12	-
PCB 118	57.56	24.96	69.85	-
PCB 153	255.20	-	164.93	-
PCB 138	290.65	45.49	167.34	-
PCB 180	26.20	-	-	-

Fish biometry, condition index, hepato-somatic index, muscle protein concentration

The sex ratio was unbalanced in the two populations and showed a majority of females in Seine (10 males / 26 females) vs a majority of males in Douarnenez (31 males / 5 females). Average fish lengths ($\pm$ SD) were not significantly different in Seine ($31.93 \pm 1.87 \text{ cm}$) vs Douarnenez ($33.10 \pm 4.45 \text{ cm}$). The condition factor K (mean $\pm$ SD) was significantly lower in Seine (0.74 ± 0.07) vs Douarnenez (0.95 ± 0.11) (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$); the Hepato-Somatic Index HSI, being not significantly different in Seine (1.37 ± 0.26) vs Douarnenez (1.45 ± 0.53).

The muscle protein level (mean $\pm$ SD), assessed by the Bradford method, was significantly lower in Seine ($34.15 \pm 8.36 \text{ mg.ml}^{-1}$) vs Douarnenez ($42.21 \pm 7.33 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Kruskal-Wallis, p-value < 0.001).

G6PDH, CCO, AChE and EROD activities

The liver G6PDH activity was significantly reduced in Seine vs Douarnenez (Fig 3a). The liver CCO activities were not different between Seine and Douarnenez, while the muscle CCO activities showed a higher level in Seine vs Douarnenez (Fig. 3b, 3c). The brain AChE activity was significantly reduced in Douarnenez vs Seine (Fig 3d).

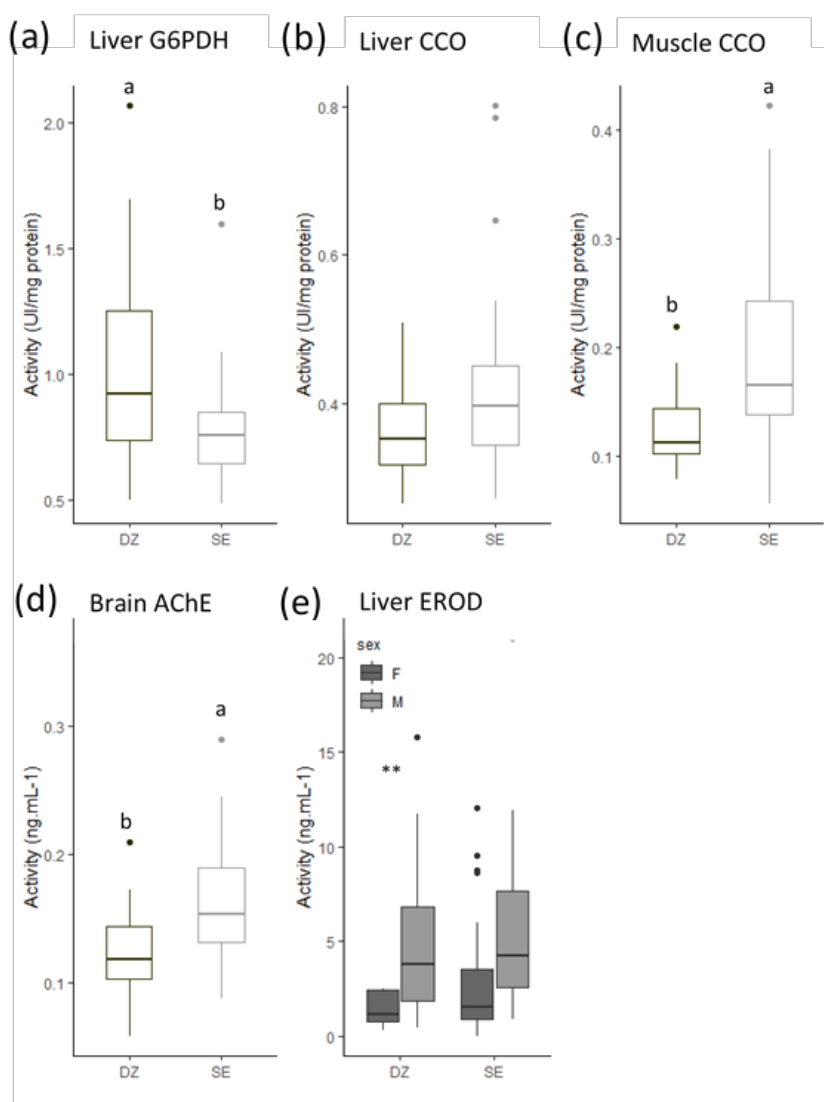


Fig. 3 : Enzymatic activities in liver (G6PDH, CCO, EROD), muscle (CCO), brain (AChE) in the Douarnenez bay (DZ) and in the Seine estuary (SE). Letters indicate that the means are significantly different between populations (Kruskal-Wallis test: p-value < 0.001). Two stars ** indicate a significant difference within the Douarnenez population (Kruskal-Wallis test: p-value < 0.01).

The liver EROD activities were measured considering sexes separately, a general decrease of the activity being observed in females vs males over the two populations. No

significant difference was detected between the EROD activities in the two populations whatever the sex (Fig 3e).

Muscle lipids

The level of total lipids was significantly reduced in Seine (9.88 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) vs Douarnenez (12.21 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) (Table 3). The triacylglycerol (TG) and the group (phosphatidylcholine PC, phosphatidylinositol PI, phosphatidylethanolamine PE) were respectively the major reserve lipid and membrane lipids in the two populations.

Table 3 : Muscle lipid content (storage lipids and membrane lipids). STEST: sterol esters, GLETH: glyceride ethers, TG: triacylglycerol, FFA: free fatty acid, ALC: fatty alcohols, FST: free sterols, SPG: sphingolipids, LPC: lysophosphatidylcholine, PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol, CL: cardiolipins, PE: phosphatidylethanolamine. Sum of storage lipids (SUM SL), membrane lipids (SUM ML) and total lipids (TOT LIP).

Location	Storage lipids						Membrane lipids										
	STEST	GLETH	TG	FFA	ALC	FST	SPG	LPC	PC	PS	PI	CL	PE	SUM SL	SUM ML	TOT LIP	
DZ	$\bar{x}$ 0.02	0.01	1.96	0.05	0.04	0.4	0.2	0.19	5.4	0.27	0.87	0.33	2.47	2.08	10.14	12.21	
	$\pm sd$ ± 0.03	± 0.02	± 1.82	± 0.05	± 0.12	± 0.09	± 0.12	± 0.08	± 0.71	± 0.05	± 0.15	± 0.15	± 0.39				
	sign. ***	NS	**	NS	NS	**	***	***	***	**	***	NS	***	**	**	**	
SE	$\bar{x}$ 0.06	0.02	1.01	0.04	0.02	0.45	0.35	0.1	4.42	0.32	0.64	0.27	2.17	1.15	8.73	9.88	
	$\pm sd$ ± 0.05	± 0.03	± 1.21	± 0.03	± 0.03	± 0.10	± 0.10	± 0.08	± 0.68	± 0.10	± 0.12	± 0.12	± 0.31				

$\bar{x}$ = lipids means, $\pm sd$ = standard deviation, *: $p\text{-value} < 0.05$, **: $p\text{-value} < 0.01$, ***: $p\text{-value} < 0.001$, NS : no significant

The lipid storage index based on the ratio of the quantity of reserve lipid (TG) to the quantity of structural lipid (free sterols: FST), classically considered in fish population studies (Amara *et al.*, 2007), was assessed. A significant decrease of this TG/FST ratio was observed in Seine (2.38 ± 3.15) vs Douarnenez (5.06 ± 4.65) (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} < 0.01$).

The majority of membrane lipids displayed higher levels in Douarnenez vs Seine; an opposite trend being detected for the group (FST, SPG, PS: free sterols, sphingolipids, phosphatidylserine) which showed higher concentrations in Seine vs Douarnenez (Table 3).

The distribution of membrane lipids and individuals was analysed in the two estuaries by a Principal Component Analysis (PCA); the main factorial plan (axes 1 and 2) explaining 76.98% of the total variance of the data set (Fig 4). The Seine fish were mainly segregated from those of Douarnenez by higher concentrations of FST-PS-SPG, lower concentrations of PC and less variable levels of PE (Fig 4).

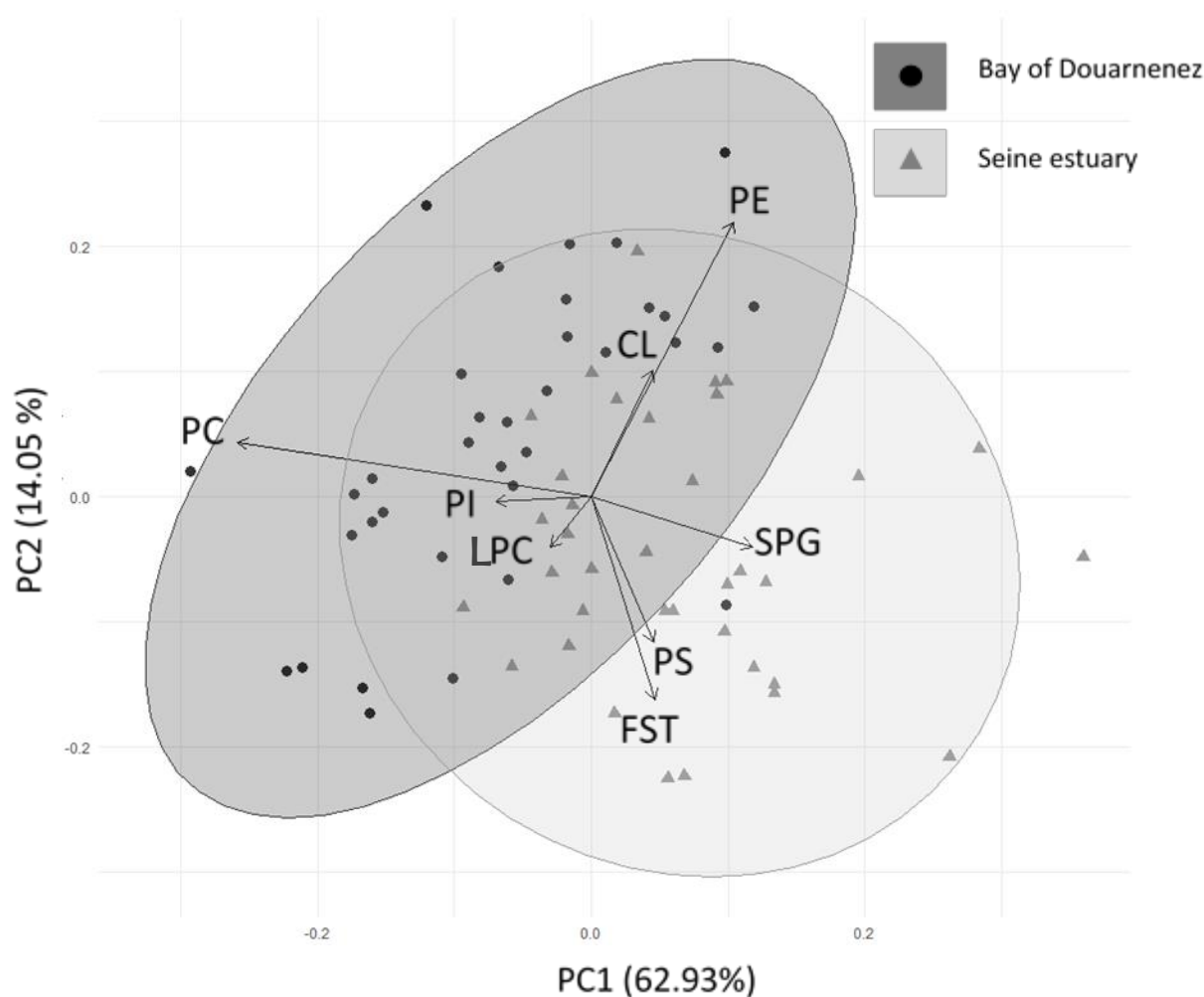


Fig.4 : Principal component analysis (axes 1 and 2). Distribution of membrane phospholipids on the correlation circle, and individuals on the factorial plan, in the Douarnenez and Seine populations. SPG: sphingolipids, LPC: lysophosphatidylcholine, PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol, CL: cardiolipins, PE: phosphatidylethanolamine, FST: free sterols.

Integration of the phenotypic responses

Two Principal Component analyses were realized successively for the two flounder populations, to integrate condition factor (K), muscle protein, enzymatic activities (liver G6PDH, muscle CCO, brain AChE, liver EROD) and the membrane lipids displaying higher concentrations in the heavily polluted Seine system (SPG, FST, PS).

The PCA (axes 1 and 2) explained 44.75% and 49.26% of the total variance of the data set, respectively for Douarnenez and Seine populations (Fig 5). In the Douarnenez sample, a group of positively correlated variables (K - muscle protein - G6PDH - AChE - PS) was negatively

correlated with CCO on the first axis; the second axis showing a negative correlation between EROD - SPG and FST (Fig 5).

In the second PCA on the Seine sample, a group of positively correlated variables (K - AChE) was negatively correlated with the group (PS - FST) on the first axis; the second axis displaying a group of positively correlated variables (G6PDH - CCO - SPG) which was negatively correlated with muscle protein (Fig 5).

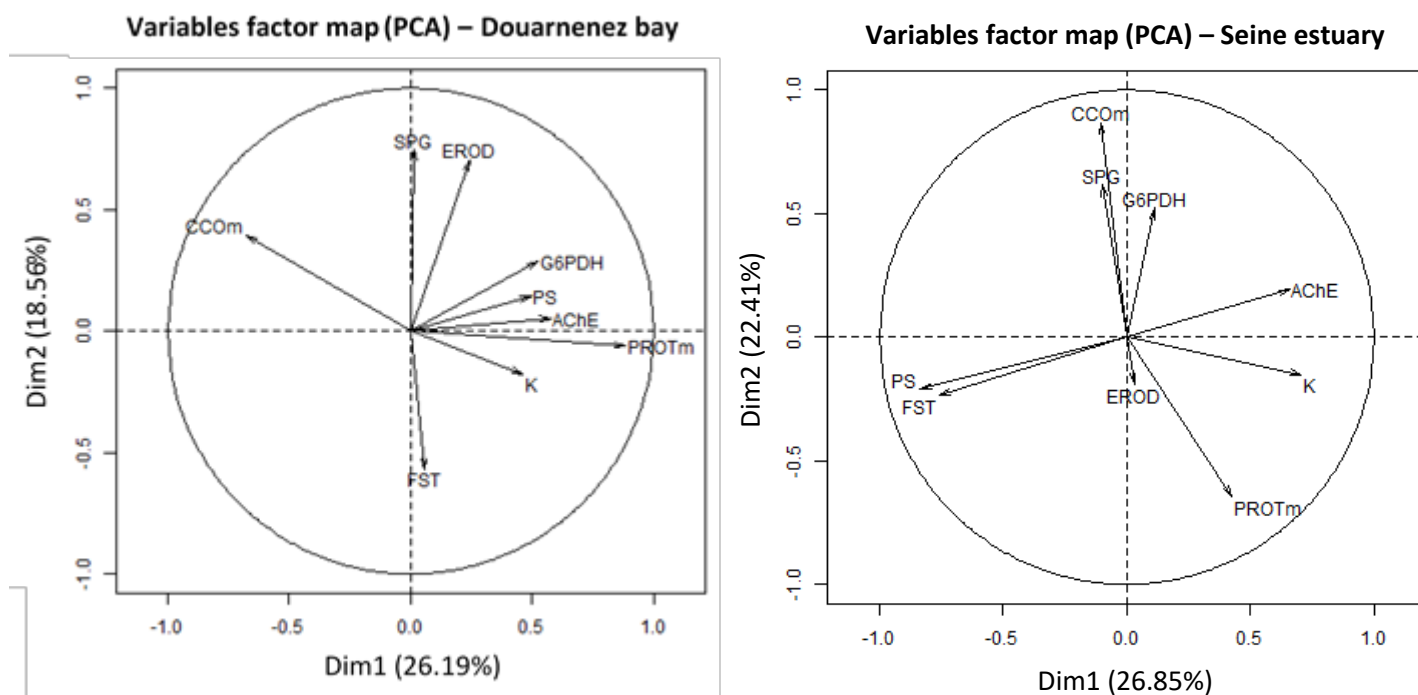


Fig.5 : Principal component analysis (axes 1 and 2). Distribution of 9 markers on the correlation circle, in the Douarnenez and Seine populations. G6PDH: liver glucose-6-phosphate deshydrogenase, CCOm: muscle Cytochrome C Oxydase, EROD: liver *ethoxyresorufine-O-dééthylase*, AChE: brain acetylcholine esterase, PROTm: muscle protein concentration, SPG: sphingolipids, FST: free sterols, PS: phosphatidylserine, K: condition factor.

Genetic variability

The microsatellite variability of *P. flesus* appeared to be heterogeneous, with the total number of alleles per locus ranging from 3 to 21, and the mean observed heterozygosity per locus varying between 0.166 and 0.971 (Table 4).

Table 4 : Genetic diversity : allelic diversity (N_a : Number of alleles), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) in the Douarnenez bay and the Seine estuary.

Locus	Panels	Douarnenez			Seine		
		N_a	H_o	H_e	N_a	H_o	H_e
Nplaf_8	1	4	0.444	0.448	4	0.300	0.339
Nplaf_14	3	3	0.378	0.413	4	0.352	0.342
Nplaf_15	2	5	0.272	0.338	5	0.718	0.569
Nplaf_23	2	5	0.500	0.637	6	0.419	0.580
Nplaf_24	3	6	0.588	0.645	6	0.656	0.664
Nplaf_25	3	6	0.756	0.673	4	0.685	0.658
Nplaf_28	3	7	0.620	0.728	6	0.650	0.710
Nplaf_30	3	4	0.166	0.205	4	0.437	0.371
Nplaf_35	1	17	0.971	0.917	19	0.903	0.915
PFUSC3	1	6	0.529	0.478	3	0.382	0.349
PFUSC4	3	3	0.527	0.526	6	0.666	0.568
PFUSC7	2	10	0.617	0.742	7	0.709	0.721
PFUSC8	1	4	0.450	0.502	3	0.428	0.438
PL142	2	14	0.896	0.878	11	0.619	0.833
StPfl001	1	21	0.742	0.832	18	0.774	0.868
StPfl002	3	10	0.638	0.649	6	0.558	0.626
StPfl003	2	5	0.756	0.679	4	0.454	0.543
StPfl005	2	3	0.457	0.452	4	0.457	0.530
StPfl015	1	9	0.432	0.747	9	0.363	0.604
StPfl025	2	7	0.500	0.551	7	0.687	0.617
Multilocus		7.45	0.562	0.602	6.8	0.561	0.592

Considering the multilocus statistics, the mean allelic diversity was not statistically different in Douarnenez vs Seine (respectively 7.45 and 6.8 alleles per locus). The mean observed heterozygosity was also similar in the two populations ($H_o = 0.56$) (Table 4). No significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium (HWE) was detected, regardless of the considered population (multilocus $F_{is} = 0$). The software MICRO-CHECKER did not detect a significant departure from HWE linked to null alleles.

No significant genetic differentiation was detected between the two populations (multilocus $F_{st} = 0.003$, $p > 0.05$).

Discussion

Chemical contamination & hypothesis on the flounder use of habitat in Seine Estuary and Douarnenez Bay

The following concentrations of flounder muscle metals ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt.) were detected for Douarnenez vs Seine respectively (Cd: 0.001 / 0.001; Cu: 1.086 / 0.872; Pb: 0.056 / 0.008; Zn: 12.78 / 16.11; Cr: 0.204 / 0.075; As: 14.64 / 80.67). The Cd concentrations were moderate comparatively to the heavily polluted Gulf of Gdansk in southern Baltic Sea (Dabrowska *et al.*, 2017) (flounder muscle: Cd $\cong$ 0.004), the levels of Pb and Zn being rather similar in Baltic Sea (flounder muscle: Pb $\cong$ 0.04; Zn $\cong$ 20).

The fish liver is often recommended as a target tissue when monitoring metal concentrations in aquatic environments (Henry *et al.*, 2004). Thus, in the present study, higher flounder liver concentrations were classically detected for the majority of metals, the ratio liver vs muscle concentrations being comprised between 3 to 99. Two exceptions were detected for Cr and As which displayed similar concentrations in liver and muscle. The liver levels of Cd, Ni, V and Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt.) were significantly higher in Seine vs Douarnenez (respectively: 1.48 / 0.099; 0.91 / 0.08; 1.63/0.23; 71.41/38.92). The levels of Cd and Cu in Seine were similar to those observed in flounder liver coming from large industrial estuaries in France (Gironde and Loire; Evrard *et al.*, 2010); the Seine level of Ni being similar to those observed in polluted estuaries in England (Tyne and Mersey; Williams *et al.*, 2011).

An inverse trend was detected in the present study, for the Pb and Zn concentrations in liver flounder ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) which showed higher values in Douarnenez vs Seine (respectively: 0.52 / 0.34; 132 / 85). The Douarnenez liver Pb level could be considered as a high concentration for a moderately polluted system of the French Atlantic coast ; coastal zones and small estuaries along the Eastern English Channel and in the Bay of Biscay generally displaying reduced Pb flounder liver levels (0.04 to 0.26; Henry *et al.*, 2004; Evrard et al. 2010).

The levels of organic pollutants detected in flounder liver and muscle highlighted a clear differentiation between the moderately contaminated Bay of Douarnenez and the heavily polluted Seine estuary. Thus, a significant level of a particular PAH (naphthalene) was measured in the Seine flounder liver (97 ng g⁻¹ dry wt.), no signal being detected in the Douarnenez sample. The naphthalene level detected in the Seine estuary could be associated

to a relatively high pollution by PAHs, the concentration of total PAHs in the flounder liver along the French Atlantic coast varying from 10 to 100 ng g⁻¹ dry wt. (Mazéas, 2004).

The level of liver PCBs was considerably higher in Seine vs Douarnenez, the sum of the seven major PCB (CB-28, -52, -101, -118, -138, -153, -180) being respectively for these two samples : $\sum_7\text{PCB} = 720 / 70 \text{ ng g}^{-1} \text{ dry wt.}$ These levels of PCBs in the Seine estuary can be considered as high values, similar to those observed in England polluted estuaries like Tyne and Mersey ($\sum_7\text{PCB}$ in liver flounder varying from 400 to 1600 ng g⁻¹ dry wt.; Williams *et al.*, 2011). Furthermore, the sum of the major PCB detected in Seine flounder muscle (472 ng g⁻¹ dry wt) was considerably higher than those observed in Baltic Sea polluted sites ($15 < \sum_7\text{PCB} < 34 \text{ ng g}^{-1} \text{ dry wt.}$; Dabrowska *et al.*, 2017).

Finally, considering the whole results on the flounder contamination data in the present study, we confirmed that despite a general improvement of the Seine water quality since 1990 (Poisson, 2011), the Seine estuary is still highly contaminated by metals and organic pollutants (PAHs & PCBs). The flounder *Platichthys flesus* is realizing the major part of his life cycle (from juvenile stage to adult) in the Seine estuary (Poisson, 2011); all the major habitats for fish development being available in this large system (nursery areas, feeding habitats, spawning areas). Thus we suggest that this fish is a pertinent sentinel species for monitoring the water quality of the Seine system.

In the Bay of Douarnenez, the flounder contamination appeared relatively limited considering organic pollutants and metals, with a notable exception for two metals; Pb and Zn liver concentrations being higher in Douarnenez vs Seine. On the other hand, the levels of PAHs, PCBs and metals (including Pb and Zn) in sediment and mussels from the Douarnenez bay were clearly below the median concentrations detected over the French Atlantic Coasts (Chiffolleau, 2017); thus we suggest that the difference between environmental and flounder contaminations could be linked to the particular status of the Bay of Douarnenez. First mature flounders are arriving in the Bay of Douarnenez, at the beginning of the spawning season in January; the spawning peak is observed in February, then fish disappear in March (Déniel, 1981). No significant estuarine systems are available in the Bay of Douarnenez (FDPPMA29, 2012), thus the flounder must realize the major part of his life (recruitment and growth of juveniles in estuaries, come back of the adults to the estuary after the spawning period at sea) outside the Bay. Déniel (1981) has suggested that the flounder population could migrate between two main habitats, the Aulne estuary in the Bay of Brest (outside the reproduction

period) and the Bay of Douarnenez (spawning period) (Fig. 1). In the present study, we suggest that the Pb and Zn signatures detected in Douarnenez flounders could be linked to the fish contamination in the Aulne estuary; this last system was characterized by (1) very high loads of Pb, Zn and Ag in sediments and oysters linked to ancient mining activities, and (2) limited levels of organic pollutants (Chiffolleau, 2017).

Fish reserves and bioenergetics

The spawning peak was observed in february for *Platichthys flesus* in the the Eastern English Channel (Gallien-Landriau, 2003); thus the adult fish collected in Douarnenez and Seine in march 2016 were at the post-spawning stage characterized by a general decrease of the fish reserves linked to the cost of reproduction (Kopko and Dabrowska, 2018).

In the present study, a significant reduction of condition index (- 23%) and muscle protein content (- 20%) was clearly detected in the heavily polluted Seine vs the moderately contaminated Bay of Douarnenez; this trend suggesting that the post-spawning stage could increase the sensitivity of populations to chemical stress.

The liver is an essential metabolic organ (Rui 2014) and shows high potential for reactive oxygen species (ROS: by-products of oxygen metabolism) that should be counterbalanced by powerful protective mechanisms to detoxify and repair damaged lipids and proteins (Lushchak and Bagnyukova, 2006). G6PDH is supplying NADPH for the response to oxidative stress and for fatty acid synthesis (Grasset et al. 2014). Prolonged challenges of the flounder liver by pollutants in highly polluted estuaries in the North Sea inhibit the G6PDH activity; the lower availability of NADPH needed for detoxification reactions conducting to liver pathology (Van Noorden *et al.*, 1997; Koehler, 2004). Pollution induces oxidative stress in aquatic organisms because many pollutants are redox cycling compounds and can induce lipid peroxidation and protein oxidation (carbonylation); G6PDH activities correlated inversely with protein carbonyl levels suggesting possible inactivation of the enzymes due to their carbonylation (Lushchak and Bagnyukova, 2006; Bagnyukova *et al.*, 2006). In the present study, the reduced flounder liver G6PDH activity in Seine vs Douarnenez could be associated to a reduced capacity of the highly contaminated flounder population to respond to oxidative stress, and thus could be associated to a fitness loss.

Animals use oxygen primarily for energy generation via oxidative phosphorylation, the reduction of oxygen molecules to water by cytochrome oxidase using 90% of oxygen

consumed by an organism; the muscle Cytochrome C Oxidase (CCO) activity was considered as a proxy of fish maximum metabolic rate (Salin et al. 2016). Previous studies conducted on juvenile flounders underlined the pertinence of the CCO muscle activity to detect a higher energetic metabolism in polluted vs pristine populations (Dupuy *et al.*, 2015) or to identify contrasted patterns of energy metabolism in northern vs southern populations (Pédrón *et al.*, 2017b). A significant increase of the muscle CCO activity in Seine vs Douarnenez was detected in the present work. This enhanced metabolism was also observed in a pollutant resistant *Fundulus heteroclitus* population in a North American estuary and could be heritable (Du *et al.*, 2016). Thus, we suggest that the higher energetic metabolism in polluted fish population could be an adaptation to cope with the elevated costs of basal metabolism and activation of mechanism for protection and damage repair.

Biomarkers

The acetylcholinesterase (AChE) activity was commonly applied as a biomarker of neurotoxicity; its inhibition was studied during exposure to organophosphorus and carbamate used as active agents in pesticides (Escartin and Porte, 1997). This biomarker is also sensitive to others compounds including metals, detergents, hydrocarbons, ... (Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998; Kopecka *et al.*, 2006).

In the present study, the brain AChE activity was significantly lower in Douarnenez vs Seine (respectively 130 vs 160 nmol/min/mg protein); these activities being close to those observed in flounders collected in the Minho estuary (Portugal) in November (130 to 174 nmol/min/mg protein; Capela *et al.*, 2016). We suggest that the reduced flounder AChE activity observed in Douarnenez vs Seine could be linked to a metal contamination; heavy metals in the field (de la Torre *et al.*, 2002) and experimental contaminations of zinc and lead inhibiting fish acetylcholinesterase activity (Suresh *et al.*, 1992; Labrot *et al.*, 1996).

Induction of cytochrome P450 1A is a widely used biomarker for the study of pollution in aquatic ecosystems; the activity of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) being a common method to assess the activity of the CYP1A isoenzyme, playing a role in the metabolism of a large number of compounds such as PCB and PAH (van der Oost *et al.*, 2003). In the present work, a higher EROD activity was classically observed for males vs females in the two populations (average EROD activity expressed in pmol/min/mg protein: M/F in Douarnenez = 4.88 / 1.43 and Seine = 6.44 / 3.07); this difference being linked to the suppressive effect of

the hormone 17 β -estradiol produced by female fish during the gonadal maturation process (Arukwe and Goksoyr, 1997). Furthermore no significant differentiation was detected between the EROD activities in Seine vs Douarnenez, whatever the sex. The levels of EROD activity detected in Douarnenez and Seine appeared very close to those observed in juvenile flounders sampled in the Minho estuary in the North of Portugal ($1.6 < \text{EROD} < 5.82$ pmol/min/mg protein) lowly impacted by organic contaminants (Capela *et al.*, 2016). The low Seine flounder EROD values detected in the present study as in a recent past (EROD in 2009 = 4.2 pmol/min/mg protein; Burgeot *et al.*, 2017) are surprising, this estuary being characterized by high levels of organic pollutants. We suggest that in the polluted Seine estuary, the flounder population has developed a resistance to organic pollutants and thus a reduced inducibility of the biomarker enzyme cytochrome P450 1A; this resistance could be a plastic response and/or a genetic adaptation as observed for fishes inhabiting chronically contaminated rivers (Brammell *et al.*, 2013). On the other hand, we suggest that in polluted but open coastal zones in the southern Baltic Sea, the possibility to develop a local adaptation to organic pollutants is more limited for flounder populations which consequently displayed very high levels of EROD activity (from 231 to 279 pmol/min/mg protein; Dabrowska *et al.*, 2017).

Storage lipids and membrane lipids in muscle

The triacylglycerol (TG) is the main form of stored energy for fish, free sterols (FS) and phospholipids playing a structural role in cell membranes; thus, the lipid storage index based on ratio (TG/FS) was developed to study the nutritional status of fish and was generally seriously depleted in polluted conditions (Amara *et al.*, 2007; Kerambrun *et al.*, 2013). This ratio (TG/FS) diminished by 50% in the Seine estuary relative to moderately polluted Douarnenez fish, and confirmed that the flounder nutritional status is poor in the heavily contaminated system.

The analysis of the relative proportions of membrane lipids underlined a significant increase of particular elements in Seine vs Douarnenez fish: free sterols (FS), sphingolipids (SPG) and phosphatidylserine (PS) and consequently a significant decrease of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidyl inositol (PI). Furthermore, the interindividual variability of the levels of cardiolipins (CL) and phosphatidylethanolamine (PE) was higher in Douarnenez vs Seine.

Numerous studies showed that aging and decrease lifespan are associated with high reactive oxygen species production by mitochondria, increased mitochondrial DNA and protein damage, and with changes in the fatty acid composition of mitochondrial membrane (Valencak and Azzu, 2014). For example, CL phospholipids of unusual structure, localized almost exclusively within the inner mitochondrial membrane, are particularly rich in unsaturated fatty acids and thus very susceptible to attack by oxygen radicals and other organic radicals (Hulbert *et al.*, 2007); lipid peroxidation should not be perceived solely in a “damage to lipids” scenario, but should be also considered as an endogenous source of damage to proteins and DNA. On the other hand, the long saturated fatty acid chains of SPG mainly located in the endoplasmic reticulum membrane, facilitate their association with cholesterol to form heterogeneities in the membrane that are called lipid microdomains or rafts (Brignac-Huber *et al.*, 2016); important proportion of Cytochrome P450s are localized in lipid rafts which display high levels of sphingolipids and sterol and lower levels of PC and PI. Thus in the present study, the relative increase of FST and SPG and decrease of PC and PI in Seine vs Douarnenez could be linked to an increase of the levels of lipid rafts in the endoplasmic reticulum, to improve the liver cell capacity for xenobiotic metabolism.

The reticulum endoplasmic is a dynamic organelle that can proliferate in response to xenobiotic exposure; the specific lipid composition of rafts allowing for more xenobiotics and endogenous substrate metabolism by increased binding efficiency between CYP1A2 and CPR (NADPH-cytochrome P450 reductase) (Brignac-Hubert *et al.* 2016). Membrane phospholipid appeared to accelerate the enzymatic activity of cytochrome P4501A by changing its structural conformation and thus controlling the detoxification of xenobiotics (Ghosh and Ray, 2013). Complex sphingolipids associate with sterols are essential for maintaining endoplasmic reticulum homeostasis and suggest that perturbation in sphingolipid levels activates an endoplasmic reticulum stress-mediated to propagate apoptotic signals to the mitochondria (Kajiwara *et al.*, 2012).

Relationships between membrane phospholipids, oxidative stress and xenobiotic metabolism in a moderately contaminated bay vs a highly polluted estuary

The flounder post-spawning stage showed the lowest condition index and muscle reserve (Kopko and Dabrowska, 2018) characterizing exhausted fish. Thus, in the present study, also conducted on post-spawning fish, the negative correlation between the muscle

CCO activity and the muscle protein concentration in the two systems (Seine and Douarnenez) could indicate two contrasted physiologies; fish displaying a higher metabolism and reduced reserves vs fish showing a reduced metabolism but maintaining higher reserves. These opposite bioenergetics patterns were also described in natural fish populations (Crawford and Oleksiak, 2007; Pédrón *et al.*, 2017b), confirming that the phenotypic diversity in key metabolic traits can create differential plasticity towards environmental change (Norin *et al.*, 2016).

The Douarnenez fish were moderately contaminated by metals and displayed a positive correlation between liver G6PDH and brain AChE activities, condition index, muscle protein and phosphatidyl serine (PS); this group of markers being negatively correlated with muscle CCO activity. We suggest that individuals displaying the better capacity to manage the oxidative stress are coping with the metallic stress, maintaining a reduced neurotoxicity and higher muscle reserves. The PS is an anionic phospholipid that provide negatively charged environment that should facilitate protein insertion in membrane, and thus should play a key role in regulation of cellular functions of the plasma membrane as well as intracellular organelles (Brignac-Huber *et al.*, 2016). The Douarnenez fish also displayed a positive correlation between SPG and liver EROD activity. In the context of a moderate pollution by organic pollutants, it seems that the increase of sphingolipids mainly located in endoplasmic reticulum could increase the catalytic activity of CYT P4501A, as seen previously (Gosh and Ray, 2013; Brignac-Huber *et al.*, 2016).

The Seine fish were exposed to a complex mixture of organic and metallic pollutants, in a heavily contaminated estuary; they displayed very contrasted relationships between markers relatively to Douarnenez results. In the Seine population, the AChE activity was negatively correlated with PS and FST (free sterol), two membrane lipids displaying higher levels in Seine vs Douarnenez; thus the potential relationship between neurotoxicity and membrane lipids could be dependant of the nature of the chemical stress. Furthermore in the Seine population, a positive correlation was detected between three markers: G6PDH and CCO activities, SPG.

In highly polluted systems, we suggest that some membrane lipids such as sphingolipids displaying long saturated fatty acid chains could be moderately affected by the major oxidative stress induced by pollutants. Thus in this microenvironment, CCO could be less impacted via peroxidation of cellular membranes; mitochondrial-mediated ROS generation

affecting the activity of complex I, III and IV by phospholipids peroxidation (Hulbert et al. 2007). This microenvironment could also induce a reduced carbonylation of proteins and thus could limit the inactivation of the G6PDH enzyme. The previous suggested “mechanistic approach” on the relationships between membrane phospholipids – oxidative stress – xenobiotic metabolism must indeed be considered cautiously because our hypothesis is just based on correlations between markers.

Genetic variability in the two populations

Considering neutral genetic markers (microsatellites), the within population genetic variability was similar in the Seine and Douarnenez populations. Thus, the present study showed no loss in genetic diversity in the heavily polluted Seine population vs the moderately contaminated Douarnenez population. Thus we suggest that the current maintenance of the genetic diversity in the Seine could be linked to the absence of frequent demographic bottlenecks in this population, and thus to a limited possibility of genetic drift or inbreeding leading to a loss of genetic diversity. On the other hand, severe inbreeding and small effective number can impact seriously the genetic variability of the winter flounder populations collected in chronically contaminated bays and estuaries over Long Island, New York (O’Leary and al., 2013).

In the present study, no genetic divergence was observed between the two populations, suggesting that the Douarnenez population is genetically very close to other flounder populations located in the West and East Channel (including the Seine population), and thus should be significantly different from the Bay of Biscay populations (Calvès et al. 2013). We suggest that a gene flow between flounder populations is probably maintained over the Channel, explaining the reduced genetic structure in this area, considering neutral genetic markers. On the other hand, the selective pressure of the contaminants is acting on the Seine flounder population which is clearly differentiated from less polluted populations, considering the polymorphism of genes involved in energetic metabolism, apoptosis and detoxification (Marchand *et al.*, 2010; Calvès *et al.*, 2013).

Conclusion

This study confirmed the pertinence of the European flounder (*Platichthus flesus*) to assess the environmental status of coastal zones and estuaries. Lipid reserves were seriously depleted in heavily contaminated fish of the Seine estuary vs those from the moderately contaminated bay of Douarnenez. Furthermore the highly polluted fish displayed a possible inhibition of the G6PDH enzyme reducing their capacity to manage the oxidative stress, and a general increase of their energetic metabolism to cope with the chemical stress. A particular inhibition of the AChE in the moderately contaminated fish could be linked to the metallic contamination of their habitat outside the reproduction period. The integration of the main markers in heavily vs moderately contaminated fish allowed to hypothesize a relationship between the levels of shingolipids - phosphatidylserine - free sterols, and the fish capacity to manage the oxidative stress and to metabolize xenobiotics. Finally we suggest that phospholipid metabolism changes could be relevant markers in ecotoxicology (Fonovich *et al.*, 2016; Chan and Wang, 2018); their combination with biomarkers of energetic metabolism and oxidative stress could elucidate the pathways and mechanisms in xenobiotic acclimation and resilience.

References

- AFNOR XP T90-336-2, XP ISO/TS 23893-2 (12/2007). Water quality - Biochemical and physiological measurements on fish - Part 2 : determination of ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD).
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., C., Hermel, G., & Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices in juvenile sole (*Solea solea* L.) measured to assess the quality of essential fish habitat. Mar. Ecol. Prog. Ser. 351, 209-220.
- Arukwe, A., Goksoyr, A., 1997. Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). J. Exp. Zool. 277, 313-325.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of golfish antioxidant defenses to environmental stress. Aquat. Tox. 78, 325-331.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F., 2001. GENETIX, software under Windows™ for the genetic of populations. Montpellier, France: Laboratory Genome, Populations, Interactions CNRS UMR, 5000.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J., 2016. Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. JoX. 6(2).
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2), 248-254.
- Brammell, B.F., Price, D.J., Birge, W.J., Elskus, A.A., 2013. Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: two varieties of resistance? Comp. Biochem. Physiol. C. 157, 212-219.
- Brignac-Huber, L.M., Park, J.W., Reed, J.R., Backes, W.L., 2016. Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity. Drug Metab. Dispos. 44, 1859-1856.
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Concepción, M., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., Hylland, K., 2017. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. Mar. Environ. Res. 124, 92-105.
- Burke, M. D., Mayer, R. T., 1974. Ethoxoresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab. Dispos. 2(6), 583-588.
- Calves, I., Lavergne, E., Meistertzheim, A. L., Charrier, G., Cabral, H., Guinand, B., Quiniou, L., & Laroche, J., 2013. Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. Mar. Ecol. Prog. Ser., 472, 257-273.
- Capela, R., Raimundo, J., Santos, M.M., Caetano, C., Vale, C., Guimaraes, L., Reis-Henriques, M.A., 2016. The use of biomarkers as integrative tools for transitional water bodies monitoring in the Water Framework Directive context – A holistic approach in Minho river transitional waters. Sci. Total Environ. 539, 85-96.
- Casas, L., Martinez, P., & Sanchez, L., 2005. Characterization of microsatellite markers derived from sequence databases for the European flounder (*Platichthys flesus*). Mol. Ecol. Notes. 5(3), 664-665.
- Chan, C.Y., Wang, W.X., 2018. A lipidomic approach to understand copper resilience in oyster *Crassostrea hongkongensis*. Aquat. Toxicol. 204, 160-170.

- Chiffolleau, J.F., 2017. La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. Ifremer. Département Ressources Biologiques et Environnement, Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie. Octobre 2017 - RST.RBE-BE/2017.02, 1-72.
- Coombs J. A., Letcher B. H., & Nislow K. H., 2008. CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Mol. Ecol. Res.* 8(3), 578-580.
- Dabrowska, H., Kopko, O., Lehtonen, K.K., Lang, T., Waszak, I., Balode, M., Strode, E., 2017. An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 3626-3639.
- Dando, P. R., 2011. Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 430, 183-196.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase in two fish species. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 131(3), 271-280.
- Déniel, C., 1981. Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez : reproduction, croissance et migration des *Bothidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* et *Soleidae*. Ecologie, Environnement. Ph.D. thesis - Université de Bretagne occidentale.
- Dixon, T.J., 2003. Molecular genetic studies of pollutant response in the European flounder, *Platichthys flesus*. Ph.D. thesis - University of Stirling.
- Du, X., Crawford, D.L., Nacci, D.E., Oleksiak, M.F., 2016. Heritable oxidative phosphorylation differences in a pollutant resistant *Fundulus heteroclitus* population. *Aquat. Toxicol.* 177, 44-50.
- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., & Laroche, J., 2015. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar. Pollut. Bull.* 95(2), 634-645.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, Jr, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7(2), 88-95.
- Escartin, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10), 2090-2095.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., & Laroche, J., 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers.* 15(2), 111-127.
- Falciani, F., Diab, A.M., Sabine, V., Williams, T.D., Ortega, F., George, S.G., Chipman, J.K., 2008. Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants. *Aquat. Toxicol.* 90, 92-101.
- FDPPMA29, 2012. Evaluation de l'état de la population d'anguille européenne sur le bassin versant de la baie de Douarnenez (Finistère) en 2012. Contrat de Projet Etat-Région Bretagne 2007-2013. Fédération Départementale du Finistère pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique, 1-37.
- Fichou Y., Génin E., Le Maréchal C., Audrézet M. P., Scotet V., & Férec C., 2008. Estimating the age of CFTR mutations predominantly found in Brittany (Western France). *J. Cyst. Fib.* 7(2), 168-173.
- Florin A. B. & Höglund J., 2008. Population structure of flounder (*Platichthys flesus*) in the Baltic Sea: differences among demersal and pelagic spawners. *Heredity.* 101(1), 27.

- Fonovich, T.M., Perez-Coll, C.S., Fridman, O., D'Eramo, J.L., Herkovits, J., 2016. Phospholipid changes in *Rhinella arenarum* embryos under different acclimation conditions to copper. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 189, 10-16.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V., 2013. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J. Sea Res.* 75, 135-141.
- Gallien-Landriau, I., 2003. Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine. Doctorat de l'Université du Havre. 151 pp.
- Gauthier, C., Campbell, P. G., & Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Phys. A*. 151(4), 526-532.
- Gosh, M.C., Ray, A.K., 2013. Membrane phospholipid augments cytochrome P4501a enzymatic activity by modulating structural conformation during detoxification of xenobiotics. *PLOS ONE*. 8(2), e57919.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2014. Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1635-1641.
- Guilhermino, L., Barros, B., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned ? *Biomarkers*. 3, 157-163.
- Gunderson, A. R., King, E. E., Boyer, K., Tsukimura, B., & Stillman, J. H., 2017. Species as stressors: heterospecific interactions and the cellular stress response under global change. *Integr. Comp. Biol.* 57(1), 90-102.
- Haberkorn H., Lambert C., Le Goïc N., Guéguen M., Moal J., Palacios E., Lassus P., & Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 97(2), 96-108.
- Hallett, C.S., Hobday, A.J., Tweedley, J.R., Thompson, P.A., McMahon, K., Valesini, F.J., 2017. Observed and predicted impacts of climate change on the estuaries of southwestern Australia, a Mediterranean climate region. *Reg. Environ. Change*.
- Hamilton. P.B., Cowx. I.G., Oleksiak. M.F., Griffiths, A.M., Grahn. M., Stevens, J.R., Carvalho, G.R., Nicol, E., Tyler, C.R., 2016. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals – a critical review. *Fish Fish.* 17, 545-566.
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E. E., Grønkjær, P., & Loeschcke, V., 2007. Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Mol. Ecol.* 16(15), 3104-3118.
- Henry, F., Amara, R., Courcot, L., Lacouture, D., Bertho, M.L., 2004. Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environ. Int.* 30, 675-683.
- Hylland, K., Robinson, C.D., Burgeot, T., Martínez-Gómez, C., Lang, T., Svavarsson, J., Thain, J.E., Vethaak, A.D., Gubbins, M.J., 2017. Integrated chemical and biological assessment of contaminant impacts in selected European coastal and offshore marine areas. *Mar. Environ. Res.* 124, 130-138.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttember, W.A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87, 1175-1213.

- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., Amara, R., 2013. A combined measurement of bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounders, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*. 91, 498-505.
- Kajiwara, K., Muneoka, T., Watanabe, Y., Karashima, T., Kitagaki, H., Funato, K., 2012. Perturbation of shingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 86(5), 1246-1261.
- Koehler, A., 2004. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquat. Toxicol.* 70, 257-276.
- Kopecka, J., Lethtonen, K.K., Barsiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Gerken, J., Pempkowiak, J., 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic). *Mar. Poll. Bull.* 53, 406-421.
- Kopko, O., Dabrowska, H., 2018. Variability of biological indices, biomarkers, and organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) in the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. *Chemosphere*. 194, 701-713.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. 1(1): 21-28.
- Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and green stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J.Chromatogr. A* 1349, 1–10.
- Lambert Y. & Dutil J. D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54(S1), 104-112.
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M.H., & Budzinski, H., 2013. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(2), 738-748.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C., Laroche, J., 2015. Does the chronical chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Poll. Bull.* 95, 658-664.
- Lê S., Josse J., & Husson F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25(1), 1-18.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 144, 283-289.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70(4), 327-343.
- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., & Laroche, J., 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Mar. Environ. Res.*, 70(2), 201-209.

- Marchand, J., Quiniou, L., & Laroche, J., 2013. Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *JoX*. 3(1S), 14.
- Mazéas, O., 2004. Evaluation de l'exposition des organismes aux HAP dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP – Cas de la marée noire ERIKA. Thèse d'Université, Université de Bordeaux I, n°2945.
- MSFD 2008. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and the Council of 17 June 2008 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Marine Environmental Policy. (http://ec.europa.eu/environment/water/marine/index_en.htm.)
- O'Leary, S.J., Hice, L.A., Feldheim, K.A., Fisk, M.G., McElroy, A.E., Fast, M.D., Chapman, D.D., 2013. Severe inbreeding and small effective number of breeders in a formerly abundant marine fish. *PLOS ONE*. 8-6, e66126.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L. (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future ? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in newfoundland. *Mar. Poll. Bull.* 32(2), 225-231.
- Pédrón, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J., 2017a. Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: Differential sensitivities of populations. *Sci. Total Environ.* 586, 890-899.
- Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J. L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V.F., Le Grand, F., & Laroche, J., 2017b. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 129, 258-267.
- Pédrón, N., Morvezen, R., Le Moan, A., Guinand, B., Zambonino-Infante, J. L., Laroche, J., & Charrier, G., 2015. New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to anthropogenic stress and contrasted environments. *Conserv. Genet. Resour.* 7(4), 823-826.
- Peig J. & Green A. J., 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct. Ecol.* 24(6), 1323-1332.
- Poisson, E., 2011. Effets de la contamination chimique: des organismes en danger ? Fascicule Seine-Aval 2, Groupement d'Intérêt Publique Seine-Aval. 1-69.
- Robins, P.E., Skov, M.W., Lewis, M.J., Giménez, L., Davies, A.G., Malham, S.K., Neill, S.P., McDonald, J.E., Whitton, T.A., Jackson, S.E., Jago, C.F., 2016. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 169, 119-135.
- Rui, L., 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 4(1), 177-197.
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Metcalfe, N.B., 2016. Variation in metabolic rate among individuals is related to tissue-specific differences in mitochondrial leak respiration. *Physiol. Biochem. Zool.* 89(6): 511-523.
- Schuelke M., 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18(2), 233.
- Shrivastava, A. and Gupta, V. B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chron. of Young Sci.* 2 (1), 21–25.
- Sinha, E., Michalak, A. M., & Balaji, V., 2017. Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes. *Science*, 357(6349), 405-408.

- Suresh, A., Sivaramakrishna, B., Victoriamma, P.C., Radhakrishnaiah, K., 1992. Comparative study of inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. *Biochem. Int.* 26(2): 367-375.
- Valencak, T.G., Azzu, V., 2014. Making heads or tails of mitochondrial membranes in longevity and aging: a role for comparative studies. *Longevity and Healthspan.* 3,3.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Noorden, C.J.F., Bahns, S., Köhler, A., 1997. Adapational changes in kinetic parameters of G6PDH but not PGDH during contamination-induced carcinogenesis in livers of North Sea flatfish. *Biochim. Biophys. Acta.* 1342, 141-148.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P., & Shipley P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4(3), 535-538.
- Vethaak, A.D., Davies, I.M., Thain, J.E., Gubbins, M.J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C.D., Moffat, C.F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., La, T., Hylland, K., 2017. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* 124, 11-20.
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Geronto.* 36, 1349-1359.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38(6), 1358-1370.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc. Biol. Soc. Biol. Sci.* 271, S360-S363.
- Williams, T.D., Turan, N., Diab, A.M., Wu, H., Mackenzie, C., Barie, K.L., Hrydziusko, O., Lyons, B., Stentiford, G.D., Herbert, J.M., Abraham, J.K., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, K.J., Falciani, F., 2011. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *Plos Comput. Biol.* 7(8), e1002126.
- Wolanski, E., & Elliott, M., 2015. *Estuarine ecohydrology: an introduction.* Elsevier.
- Zacchino, V., Minghetti, M., Centoducati, G., Leaver, M., 2012. Diablo/SMAC: A novel biomarker of pollutant exposure in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotox. Environ. Safety.* 79, 176-183.

CHAPITRE V : Réponses de poissons
encagés, analysées par la protéomique :
caractérisation de l'état écologique à
micro-échelle

Introduction & Méthodologie

Le chapitre précédent nous a permis d'évaluer le statut écologique d'un estuaire très pollué (la Seine), relativement à celui d'une Baie considérée comme peu contaminée (Douarnenez), en comparant la physiologie de flets prélevés dans ces 2 sites. Cette approche basée sur des marqueurs spécifiques développés chez le poisson paraît a priori efficace pour estimer la qualité des écosystèmes côtiers (Galland *et al.*, 2013 ; Dupuy *et al.*, 2014). Néanmoins, cette approche multi-systèmes pose un certain nombre de questions. En effet, si la fitness des poissons est censée refléter la qualité du milieu, elle est aussi dépendante de facteurs confondants liés : (1) à des divergences génétiques possibles entre les populations, (2) à des paramètres physico-chimiques (autres que les polluants) propres à chaque environnement, (3) à la diversité en terme de micro-habitats propre à chaque environnement. Ces micro-habitats au sein d'un même écosystème côtier, peuvent être en effet plus ou moins stressants pour les poissons, particulièrement pour les juvéniles moins mobiles dans l'estuaire relativement aux sub-adultes et adultes. Les expériences en microcosmes visent généralement à réduire l'impact des facteurs confondants, mais ne peuvent malheureusement pas rendre compte de la complexité des systèmes naturels. Dans ce contexte, l'encagement de poissons maintenus dans le milieu naturel peut, au moins en théorie, permettre de réduire l'impact d'un certain nombre de facteurs confondants, tout en conservant la complexité du milieu naturel.

En conséquence, nous avons exploré les réponses de poissons issus d'un milieu a priori « de référence » (estuaire de la Canche), dans un milieu fortement contaminé (estuaire de Seine). Notre protocole a été le suivant : nous avons encagé des poissons capturés en Canche dans leur propre estuaire (considéré comme « contrôle ») et dans deux parties contrastées de l'estuaire de la Seine, le long d'un gradient de pollution. Un site en amont (Rouen) caractérisé par une forte pollution métallique et organique, et un site en aval (Fosse Nord) présentant une contamination chimique plus limitée liée à la dilution du flux polluant par les eaux marines. Dans l'optique de réduire la variabilité interindividuelle au niveau génétique et phénotypique, tous les poissons encagés provenaient du même site, ie de la Canche. L'objectif était de déterminer l'impact d'un mois d'encagement, sur la physiologie et le métabolisme hépatique des poissons, par une approche sans a priori en protéomique. Enfin, afin de déterminer si le caging en lui-même pouvait constituer un stress sur les poissons, nous avons

de plus comparé les protéomes de foies de flets encagés et non encagés, dans l'estuaire de Canche.

Synthèse des résultats et discussion sur les sites encagés

Le niveau de chaque protéine détecté dans les cages de Seine (Rouen & Fosse Nord : pollués) a été comparé à celui observé dans les cages de Canche (milieu de « référence »). La mise en évidence d'une dérégulation du métabolisme des xénobiotiques à Rouen, confirme la forte pollution qui caractérise ce site. Plusieurs protéines impliquées dans la phase I et la phase II du processus de détoxification ont été détectées à Rouen. Les réactions de phase I permettent d'hydrolyser, de réduire ou d'oxyder une molécule chimique, de façon à la rendre plus « réactive » et hydrophile. Dans notre étude, nous retrouvons plusieurs protéines liées à cette phase. La NADPH- Cytochrome P450 reductase ainsi que 4 isoformes du Cytochrome P450, véritablement impliquées dans des processus de métabolisation des xénobiotiques, sont accumulées. La dimethylaniline monooxygénase qui permet l'oxydation des molécules chimiques est aussi régulée positivement. De plus, trois glutathion-S-transférases (GST), impliquées dans les réactions de la phase II ont aussi été induites sur ce même site de Rouen. La phase II permet de conjuguer les xénobiotiques à une molécule endogène (exemple de la GST) afin qu'elle soit plus soluble et finalement excrétable. Toujours concernant cette phase II, 4 isoformes de l'UDP-glucuronosyl transférase ont été régulées positivement dans ce site. En revanche, au niveau de la Fosse Nord et pour la phase II, une seule GST était accumulée, tandis qu'une UDP-glucuronosyl transférase se trouvait réduite. Une 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase (PAPS) responsable de l'activation des sulfates dans les processus de sulfatation, également impliquée dans les réactions de phase II, a aussi été retrouvée négativement régulée à Fosse Nord. Pour les deux sites, nous retrouvons une enzyme fortement induite, précurseur de glutathion, et donc potentiellement impliquée dans la phase II, la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT). Deux autres isoformes de la BHMT étaient régulées négativement à Fosse Nord. D'autres enzymes, impliquées dans la même voie (cycle de la méthionine) étaient également retrouvées dans ces deux sites. Toutes ces protéines révèlent la présence d'un stress chimique dans ces deux sites. La plus forte expression des protéines liées au métabolisme des xénobiotiques à Rouen confirme bien sa forte contamination. Enfin, il est possible que la modulation de l'expression de certaines protéines liées aux stress environnementaux génère à terme les symptômes d'une

perturbation endocrinienne ; c'est notamment le cas pour les nombreuses protéines impliquées dans les systèmes de transduction du signal intracellulaire, dérégulées dans les deux sites pollués.

D'autres modifications protéomiques majeures ont été mises en évidence dans les deux sites pollués, comme la dégradation du glycogène, des altérations du cycle de Krebs, de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et de la synthèse des acides gras. Enfin les poissons encagés en Seine montrent une diminution de plusieurs sous-unités de l'ATPase de type V. Dans des conditions normales, cette pompe ATPase est impliquée dans la régulation du pH dans les organites. Les nombreuses protéines dérégulées négativement dans les deux milieux pollués, qui sont liées au fonctionnement de l'appareil de Golgi (principalement impliqué dans le trafic et les modifications intracellulaires des protéines), suggèrent une perturbation importante de cet organite. Enfin, dans les poissons encagés sur le site de Fosse Nord, nous avons observé une diminution générale de protéines liées au système de traduction.

Conclusion sur les sites encagés

Finalement, cette étude a permis à micro-échelle de déterminer le statut écologique de deux sites le long d'un gradient de pollution en estuaire de Seine. Rouen, qui est le site le plus pollué, est caractérisé par une surexpression d'une diversité d'enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques. La production d'énergie semble augmentée dans ce site. Le site Fosse Nord, quant à lui, est caractérisé par une moindre contamination, confirmée par la faible surexpression des enzymes liées au métabolisme des xénobiotiques, et par une perturbation de son système traductionnel. Grâce aux outils de la protéomique, il est possible de comprendre les processus de détoxification impliqués selon un gradient de contamination ainsi que les principaux dysfonctionnements cellulaires. Le caging permet de discriminer l'effet de chacun des sites sur notre espèce sentinelle, le flet. Néanmoins, cette technique de caging pourrait en elle-même impacter la physiologie des poissons, comme cela sera abordé dans le chapitre suivant.

Résultats complémentaires sur l'impact de la technique d'encagement sur la physiologie des poissons

L'analyse protéomique précédente a montré une dérégulation protéique très importante pour les poissons encagés dans deux sites pollués de l'estuaire de la Seine vs dans l'estuaire de Canche. Nous avons notamment montré une dérégulation positive de nombreuses protéines associées aux mécanismes de détoxification des xénobiotiques dans les poissons encagés à Rouen. Néanmoins, nous avons remarqué que malgré le stress chimique imposé par les xénobiotiques, quelques marqueurs de stress restaient dérégulés négativement, quel que soit le site (Rouen ou Fosse Nord). C'est le cas par exemple de l'HSP 70, de protéines de stress oxydatif (péroxyrédoxine, thiorédoxine), ou encore du système protéasome-dépendant de recyclage des protéines. Ce résultat suggère que dans la condition utilisée comme « contrôle », c'est-à-dire l'encagement dans l'estuaire de Canche, les poissons aient été soumis à un (ou des) contrainte(s) environnementale(s) (chaleur, salinité, hypoxie...) d'une intensité supérieure à ceux encagés dans l'estuaire de la Seine. Cette observation nous a également incités à questionner l'impact de l'encagement par lui-même sur le phénotype protéomique des poissons.

Dans ce contexte, nous avons décidé de comparer les protéomes hépatiques de poissons encagés dans notre estuaire de référence vs des poissons restés libres dans la Canche pour la même période.

Impact de l'encagement sur le protéome hépatique du flet

Les flets étaient issus de la même population, et partageaient le même écosystème naturel, *ie* l'estuaire de la Canche, à la fois avant et pendant l'expérience d'encagement. Nous aurions donc pu nous attendre à des différences minimales entre les deux conditions (encagés, non-encagés dans le même estuaire). Les résultats que nous avons obtenus montrent une dérégulation d'environ 600 protéines entre les deux conditions, soit 16% du protéome total observé (3774 protéines identifiées). Parmi ces protéines, 367 sont accumulées, et 238 voient leur abondance réduite, dans les foies des poissons en situation d'encagement vs *in natura*. La physiologie du poisson semble donc perturbée dans cette situation d'encagement.

En examinant plus précisément les résultats obtenus, il apparaît clairement que le métabolisme carboné et la production d'énergie sont fortement perturbés. On voit ainsi la régulation négative de nombreuses protéines impliquées dans la dégradation du glycogène,

la glycolyse, le cycle de Krebs, mais également la chaîne mitochondriale de transport d'électron. La synthèse des lipides se trouve également réduite, tant l'élongation des acides gras que le métabolisme des stérols. L'encagement semble donc entraîner un ralentissement du métabolisme énergétique, ralentissement probablement en partie à l'origine de la baisse de fitness suggérée par la diminution de 8.5 % du facteur de condition des flets encagés, relativement aux flets *in natura*.

Un grand nombre de protéines ont été dérégulées. La catégorie COG dominant le pool de protéines accumulées en situation d'encagement est « RNA processing and modification » (56 protéines), auxquelles nous pourrions ajouter 22 protéines impliquées dans le processus de traduction. Il est difficile de savoir comment ces changements impactent précisément le métabolisme du flet ; les nombreuses protéines impliquées dans la transduction des signaux (38 accumulées et 17 réduites) et dans les modifications post-traductionnelles (41 induites et 12 réduites) participent à la régulation alternative du fonctionnement cellulaire qui s'effectuerait donc principalement au niveau post-transcriptionnel, dans les conditions de caging.

Concernant le métabolisme des xénobiotiques, nous avons observé une diminution générale des nombreuses protéines potentiellement impliquées dans les réactions de phase I comme de phase II. Ainsi, pas moins de 9 Cytochromes P450, la NADPH cytochrome P450 réductase, la diméthylaniline monooxygénase, l'époxyde hydrolase, 5 glutathion-S-transférases et 3 UDP-glucuronosyl transférases voient leur abondance réduite en situation d'encagement. C'est aussi le cas de la bétaine homocystéine méthyl transférase et de la sérine hydroxyméthyl transférase, deux protéines impliquées dans le cycle de la méthionine que nous avons trouvées reliées à l'adaptation aux xénobiotiques dans de précédentes études d'écotoxicoprotéomique s'intéressant à la pollution dans l'estuaire de la Seine (Galland *et al.*, 2014 ; 2015).

Concernant les marqueurs de stress évoqués précédemment, nous observons en revanche pour les flets encagés une accumulation des protéines chaperonnes (2 HSP 70, 2 DnaJ), des protéines de stress oxydatif (2 thiorédoxines, peroxyrédoxine), des systèmes de recyclage des protéines liés à la réponse au stress cellulaire (nombreuses composantes du protéasome, 4 ubiquitine carboxy-terminal hydrolases), ou encore une protéine connue pour être régulée positivement en situation d'hypoxie (Hypoxia upregulated protein). Cette observation suggère que, conformément à notre hypothèse émise précédemment, l'encagement ait créé une de

situation de stress pour les poissons. La faible profondeur des cages immergées en Canche de par la bathymétrie réduite de ce petit système estuarien, et la proximité de ces cages relativement au port de plaisance, pourraient constituer des sources de stress pour les poissons encagés dans cet estuaire.

Conclusion : le caging comme outil de diagnostic de la qualité de l'environnement

En produisant des signatures biologiques fines sur une large gamme de perturbations physiologiques, chez les poissons encagés en Seine (Rouen et Fosse Nord) vs en Canche, cette approche protéomique nous a permis de mieux définir l'état éco-(toxico-)logique de la Seine à micro-échelle. Cette notion de micro-échelle est particulièrement importante pour mieux comprendre la fonctionnalité des micro-habitats du système estuarien, en tant que zones de nourricerie pour les poissons juvéniles. L'approche caging permet donc d'apporter une vision spatialisée de la réponse du poisson aux stress environnementaux.

Si il est a priori difficile d'utiliser l'approche caging pour faire du monitoring environnemental, on peut penser que l'abondance et la précision des résultats obtenus par un couplage caging-protéomique exploratoire devrait conduire à l'identification de nouveaux biomarqueurs dans les populations soumises au multistress dans les milieux estuariens. La validation de certains biomarqueurs protéiques d'intérêt, révélés dans notre travail, nécessitera un gros travail de confirmation dans différents contextes environnementaux voire expérimentaux, avant qu'ils puissent devenir de nouveaux marqueurs ciblés et efficaces pour l'évaluation écotoxicologique de l'environnement. Notons que le couplage caging-protéomique sur le modèle flet pourrait conduire à terme à la production de descripteurs de la qualité/dysfonctionnement des micro-habitats, pouvant devenir des outils pour la gestion et/ou la restauration environnementale. On remarque par ailleurs que le flet est une espèce particulièrement intéressante pour le caging en milieux présentant des salinités contrastées ; en effet, il présente apparemment un coût physiologique réduit de son osmorégulation, permettant ainsi de comparer la réponse du poisson aux stressseurs dans les milieux poly, méso et oligohalins du même système estuarien.

L'encagement peut cependant conduire à un stress pour les poissons. Nous avons ainsi détecté dans les poissons encagés dans la Canche des marqueurs protéiques de stress

thermique, oxydatif et hypoxique. L'encagement des poissons implique un confinement, qui peut provoquer des problèmes d'accès aux ressources du milieu (oxygène, nourriture) comme contraindre l'environnement thermique ; ce confinement étant peu représentatif de la diversité des conditions environnementales d'un milieu estuarien. Des précautions doivent donc être prises pour analyser les résultats du caging en termes de qualité des milieux.

The pertinence of the coupling caging – proteomics on the flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro-scale

Elodie BORCIER¹, Jean-Charles GAILLARD², Jean ARMENGAUD², Sébastien ARTIGAUD¹, Grégory CHARRIER¹, Jérôme COUTEAU³, Justine RECEVEUR⁴, Baghdad OUDDANE⁵, Rachid AMARA⁶, Jean LAROCHE¹, Vianney PICHEREAU¹

(1) Univ Brest, LEMAR UMR 6539 UBO-CNRS-IRD-Ifremer - Plouzané, (2) Li2D CEA - Marcoule, (3) TOXEM - Le Havre, (4) CEDRE - Brest, (5) LASIR UMR 8516 - Lille, (6) LOG UMR 8187 - Wimereux

Introduction

Estuaries are among the most productive ecosystems over the world, giving them a high ecosystemic value (Costanza *et al.*, 1997; Courrat *et al.*, 2009). These coastal ecosystems are considered generally as major nurseries for many marine species (Chapman & Wang, 2001). Nowadays, estuaries are heavily impacted by anthropogenic activities, such as resource overexploitation, pollution, or habitat fragmentation (Aubry & Elliott, 2006; Lotze *et al.*, 2006). Monitoring the overall quality of estuarine habitats, especially those acting as fish nurseries, is therefore of particular importance to preserve marine resources (Beck *et al.*, 2001).

The Seine estuary is one of the most anthropogenically polluted estuary in Europe (Carpentier *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006; Burgeot *et al.*, 2017). Its basin covers more than a quarter of the French population and includes major harbours, industrial and agricultural areas (Mouny & Dauvin, 2002; Dévier *et al.*, 2013; Erraud *et al.*, 2018). Thus, the Seine estuary is subjected to eutrophication, organic and metallic contaminations (Blanchet *et al.*, 2008; Dauvin, 2018). Furthermore, this estuary is concerned particularly by degradation and loss of flatfish nursery habitats, thus displaying a reduced capacity for the recruitment and growth of juvenile fish (Riou *et al.*, 2001, Le Pape *et al.* 2007; Rochette *et al.*, 2010; Archambault *et al.*, 2015; Tecchio *et al.*, 2016).

The quality of nursery can be measured by density, survival and growth of juveniles, and by the possibility for fish to move towards subadult habitats (Beck *et al.*, 2001; Schloesser & Fabrizio, 2018). The growth and survival of fish depend directly of prey availability and predation, but also of hydrological conditions and anthropogenic factors (Amara *et al.*, 2007, 2009). A large panel of pollutants (PAHs, PCBs, metals) are monitored in Seine, and numerous studies underlined the resident wild life facing to xenobiotics *in natura* (Claxton *et al.*, 1998; Ohe *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2004; Galland *et al.*, 2013, 2015; Borcier *et al.*, 2016; Vincent-Hubert *et al.*, 2017; Erraud *et al.*, 2018). In order to monitor the health status of

nurseries and fish, many studies are assessing biomarker signals (Erraud *et al.*, 2018) as integrative tools giving a variety of informations on the chemical and ecological status of the ecosystem (Lacaze *et al.*, 2011). Thus, different biomarkers were developed to detect oxidative stress damages (DNA damages by comet assay, lipid peroxidation), antioxidant responses (glutathione, GSH) (Burgeot *et al.*, 2017; Erraud *et al.*, 2018), neurotoxicity (AChE assay, Burgeot *et al.*, 2017), endocrine disruptions (VTG levels, Geraudie *et al.*, 2017), and detoxication processes (EROD).

High throughput shotgun proteomics offers the unique possibility to examine, in a single experiment, the thousands of proteins enabling the cells, organs and organisms, to adapt to abnormal situations. In the particular case of ecotoxicoproteomics, we can gather information on both the overall physiology of organisms subjected to xenobiotics, but also obtain a global, quantifiable biochemical, physiological, and/or “organismal-level” view reflecting the pollution status in the environment (Gouveia *et al.*, 2018).

Thus, we have developed in this paper a caging experiment where juvenile flounders collected in a “reference estuary” (the Canche) were encaged in the Canche, and in two polluted sites in the Seine estuary. The fish were exposed during one month to these environments, and their liver proteins were extracted and analysed by shotgun proteomics. The major aim of this study was to assess the relevance of a proteomic approach, for the discovery of key proteins produced by a sentinel fish species, over an upstream-downstream gradient in a heavily polluted estuarine system. Our second objective was to explore the ecological status of nursery areas in the Seine estuary at micro-scale.

Materials & Methods

Study sites

The study area was located along the French coast of the eastern English Channel. Two estuaries were investigated, i.e. the Canche and the Seine estuaries. Canche is a small estuary with low freshwater input of ca. $7 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. The Canche estuary is located near a protected area, so as it does not appear to be impacted by any important human activity and is often considered as a “pristine estuary” (Amara *et al.*, 2009). The Seine estuary is the largest estuary along the English Channel, concentrating the quarter of the French population, one third of the French industry and intensive agriculture (Mouny & Dauvin, 2002). The freshwater input varies from around $100\text{-}200 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ in summer, to the maximum recorded in winter: 2,000

$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Mouny, 1998). In spite of significant efforts to restore the environmental quality of the Seine estuary during the past few decades, it remains one of the most chemically polluted estuaries in western northern Europe (Dauvin *et al.* 2007).

Sampling and caging experiment

In September 2017, 150 0-group juvenile flounders *Platichthys flesus* (7–9 cm total length, TL) were collected in the Canche estuary, by using a small beam trawl. After the capture, the fish were acclimatized for 1 week in a 500-L aquarium supplied with an open seawater circuit and were fed daily with frozen Mysidacea and brine shrimps (*Artemia* sp.). One day before the caging experiment, flounders were anesthetized (eugenol 35 mg/L), weighed (to the nearest 1 mg), measured for total length (within 0.1 mm), and individually marked (visual implant tag, 1.2 mm × 2.7 mm, Northwest Marine Technology).

Cage settlement was carried out on the 12th and 13th of September 2017 at three different sites. Two sites were chosen in the Seine estuary: Rouen (49° 22.995' N; 01° 00.676' E), which is located near of a wastewater treatment plant (Emeraude), and “Fosse Nord” (49° 27.328' N; 00° 07. 493' E), which is located in the main channel of the estuary (Fig. 1). The last caging site was located in the Canche estuary (50° 30.982' N; 01° 37.852' E). Three cages were settled by site; the fish number per cage was between 15 and 20.

The cages were made of plastic. Their length was 1 m, whereas their width and height were 0.6 m. Their mesh size was 15 mm, enabling water circulation and enough space for fish to feed. The cages were fixed to the bottom with a screw anchor secured by scuba divers, the average depth being of 8 m and 3 m, respectively in Seine and Canche. Following the 1-month caging exposure, all fish were quickly transferred to the laboratory, identified (tag), weighed and measured. In order to evaluate the potential effect of contaminants on juvenile fish, we calculated the Fulton's K condition index as an indicator of the fish general well-being. Fulton's condition index (K) was assessed with the formula : $k = 100 \cdot (W/L^3)$ where W= gutted body weight (i.e. carcass without internal organs) (g) and L = total length (cm) (Peig & Green, 2010).

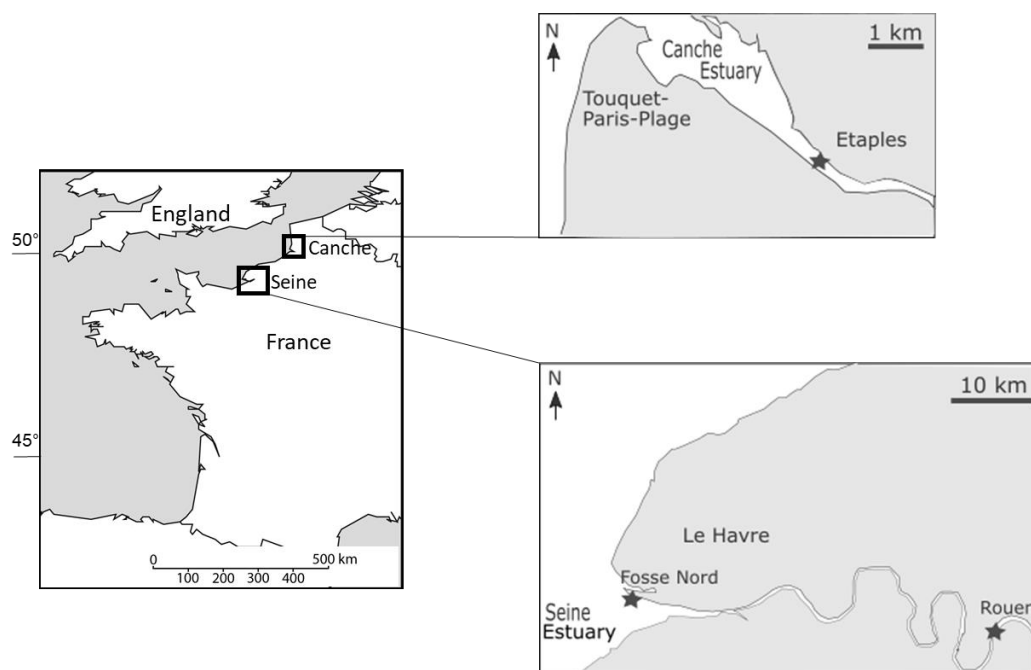


Fig.1 : Sampling and caging sites of juveniles flounders in Canche and Seine estuaries.

Pollutants analysis

Metals in sediment

After weighting 200 mg of dried and powdered material, digestions were done at 105°C for 4h in closed 15-mL Teflon screw-cap vials (Savillex, Minnetonka, USA) with 4 mL suprapur 65 % nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 mL suprapur 30% hydrogen peroxide (Merck). Measurements were then conducted on diluted mixtures (2.5% HNO₃) using an ICP-quadrupole mass spectrometer (X-series II, Thermo Scientific) operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest). The various concentrations presented in this study were well above the detection limits and digestion blanks were below detection limits.

Organic pollutant in sediment

The concentration of 24 HAPs, 26 PCBs, and 7 PBDEs were studied in sediment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) using a method adapted from Lacroix et al. (2014). Briefly, for each sample, 100 mg wet weight of sediment were digested by saponification and analytes were extracted for 16 hours at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). Bars were subsequently analysed using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System

(Gerstel). The GC column is a Restek Rxi-5ms (30m, 0.25 mm, 0.25 μ m). Thermodesorption and GC-MS/MS conditions were as previously described. Analytes were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar. A mean sediment water percentage of 81% was measured by drying samples at 50°C until the mass remained constant. Results are expressed as ng analytes/g dry weight (d.w.). Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava *et al*, 2011) and limit of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by 3. Analytical quality control was made using the Standard Reference Materials 1974c "Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)" provided by the National Institute of Standards (SRM) and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

Genotoxicity

Blood samples diluted in cryopreservative buffer (1/100; 250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5 % dimethyl sulfoxide, pH 7.6, adjusted with 1 M citric acid) were rapidly thawed before the Comet assay, cell density was adjusted to 2.10^4 cells/ μ l of cold phosphate-buffered saline. Cell viability was checked by the Trypan blue exclusion method and was found to be >90 %. The Comet assay was performed on flounder erythrocytes according to the protocol described by Singh *et al.* (1988) with slight modifications. Resulting DNA was stained with Vista Green® Dye (OxySelect™ Comet Assay, Cliniscience), and analyzed with the CellInsight CX5 HCS® (Thermo). 150 random cells on each slide were analyzed. % DNA Tail were measured for each cell.

Shotgun proteomics

Proteomic samples preparation

Individual liver were obtained from 5 fish per site, and immediately flash-frozen in liquid nitrogen. Frozen livers were then homogenized in 1 ml of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare), using a Precellys 24 system (Bertin Technologies). The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and then incubated at ambient temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using DC protein assay kit (biorad) in triplicate.

Before trypsin digestion, proteins were reduced by 2.5 mM dithiothreitol (1 h, 60 °C) and then diluted with 20 mM ammonium bicarbonate to a volume of 18 μ L. Samples were alkylated with a 10 mM iodoacetamide solution (10 min in darkness at 37 °C). Proteolytic

digestion was done by sequencing grade modified trypsin (Promega) (16 h, 37 °C). The digestion reaction was stopped by adding 10% formic acid to a 1% final concentration, and dried in Speed-Vac. Samples were reconstituted in 15 µL 0.1% formic acid. Peptides were desalted and purified by solid phase extraction using µC-18 ZipTip (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Peptide concentration in the serum samples was determined using a NanoDrop at 280 nm (NanoDrop2000, Thermo Scientific, USA).

Q exactive HF analysis

The cleaved peptides (5 µL injection contained 2 µg peptide lysate) were separated on Ultimate 3000 RSLC nano system (Thermo Scientific) over a 100-min linear gradient from 4% B to 55% B (A: 0.1% formic acid in MS-grade water; B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid in MS-grade water) and eluted peptides were online analyzed by a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) run at TopN = 20 cycle, with full scans at a resolution of 60,000 and most intense peaks (charge state 2–7) being selected for fragmentation (normalized collision energy at 28%) and subsequent MS/MS (resolution 15,000) measurements. Dynamic exclusion of previously measured precursor ion m/z values was set to 30 s.

The recorded MS/MS spectra were searched with MASCOT against the *Paralichthys olivaceus* full proteome database (Shao *et al.*, 2017), with the following parameters: tryptic peptides with a maximum of 2 miscleavages during proteolytic digestion, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.02 Da on the MS/MS, fixed modification for carbamidomethylated Cys (+57.0215) and variable modification for oxidized Met (+15.9949). All peptide matches with a peptide score above its query threshold set at $p \leq 0.05$ with the database and rank 1 were parsed using the IRMa 1.31.1c software (Dupierris *et al.*, 2009). A protein was considered validated when at least two different peptides were detected. False-positive identification of proteins was estimated using a reverse decoy database as below 0.1% with these parameters. The mass spectrometry proteomics data have been deposited in a public repository at the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository (Martens *et al.*, 2004).

The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts) was determined for the five animals and the two technical replicates of each of the three sites. The protein

abundances were compared for each Seine estuary site to the Canche one. For each of these comparisons, the list of non-redundant proteins detected among the three corresponding datasets was established. The total spectral count of each polypeptide was used to rank the proteins from the highest to the lowest detection intensities. The statistical protein variation among the replicate samples of the two one-to-one comparisons was calculated using the T-Fold option of the PatternLab 2.0 software (Carvalho *et al.*, 2008). This module allows normalizing the spectral count datasets, calculating the average fold changes with statistics (t-test), and estimating the resulting theoretical false discovery rate. MS/MS data were compiled in Excel (Microsoft) and converted for PatternLab with an Excel home-designed macro. Normalization was done taking into account the total number of spectral count for each sample, taking at least two readings per protein. Parameters for the comparisons were as follows: minimum fold change of 1.5, minimum p-value of 0.05 and BH-FDR Alfa of 0.15.

For functional analyses, the sequences of the deregulated proteins were retrieved by using the Batch Entrez module available at www.ncbi.nlm.nih.gov. The four different subsets of proteins, corresponding to proteins up-and down-accumulated in fish encaged in the Rouen and Fosse Nord sites, were then submitted to EggNOG 4.5.1 (Szklarczyk *et al.*, 2016) and Blast2GO basic (Götz *et al.*, 2008) for functional re-annotation, Gene Ontology (GO) and Cluster of Orthologous Group (COG) analyses. All results were carefully manually examined and corrected when necessary.

Results and discussion

Pollutants analysis

The Seine estuary is located downstream from some of the French largest urban areas, and is known as one of the most polluted estuaries in France. By contrast, the Canche estuary is located downstream of a protected natural reserve, and is most often considered a pristine ecosystem. Our first objective was to determine the actual pollution status of these ecosystems, by assessing the concentrations of many metals and organic pollutants in the three caging sites, two located in the Seine estuary, i.e. Rouen and Fosse Nord, and one located in the Canche estuary.

Analysis of the sediments collected in each of the three estuaries (Table 1) showed higher concentrations in Rouen for all of the measured metals (Ag, Cd, Hg, Hg, Mo, Co, Cu, Ni, Pb, V, Cr, Zn, Ba, Mn). The highest concentrations were observed for Manganese (533.1 ng.g⁻¹

¹), Zinc (331.5 ng.g⁻¹), and Barium (264.2 ng.g⁻¹). Copper and Lead were also present in high concentrations at the Rouen site (100.1 ng.g⁻¹ and 93.0 ng.g⁻¹, respectively).

Table 1 : Metal concentrations (in ng.g⁻¹) in sediment, for the three caging sites

	Ag	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	V	Zn
Canche	0.34	142.5	0.37	4.43	27.73	6.77	0.34	169.53	0.34	7.62	11.59	26.88	38.26
Fosse Nord	0.12	127.5	0.38	1.55	6.77	2.34	0.27	83.30	0.23	8.59	9.30	10.68	11.26
Rouen	7.13	264.26	2.76	12.06	79.23	100.14	0.65	533.14	0.99	37.7	93.02	63.67	331.54

Surprisingly, most of the assayed metals were found in greater abundance in Canche sediments than in the Fosse Nord ones (Table 1). Molybdenum, vanadium and manganese have two to three times higher levels of Canche, and metals such as Zinc, Copper, Silver, Chromium and Cobalt displayed three to five times higher concentrations.

Regarding organic pollutants, i.e. PAHs, PCBs and PBDEs, we found the lowest concentrations in the Canche estuary (Fig. 2).

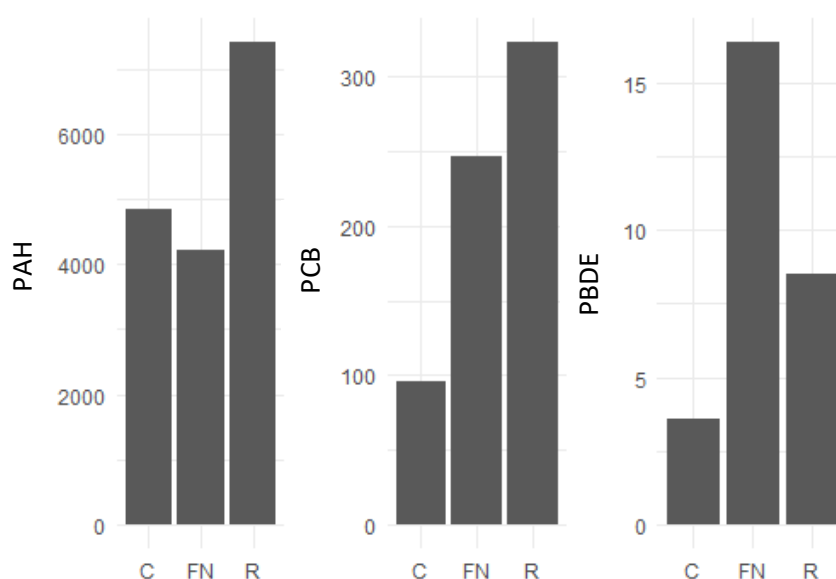


Fig. 2 : PAH, PCB and PBDE (in ng.g⁻¹) concentrations in sediment of Canche (C) , Fosse Nord (FN) and Rouen (R) .

The values measured in the sediments of our control site were 4,844 ng.g⁻¹ for PAHs, 96 ng.g⁻¹ for PCBs, and 3.6 ng.g⁻¹ for PBDEs. Expectedly, the Rouen site showed the highest concentrations (Fig.2) of PCBs (323.3 ng.g⁻¹, i.e. more than 3 times the concentrations measured in Canche) and PAHs (7,418.6 ng.g⁻¹, almost twice those found in Canche). The Fosse Nord sediments also showed a high concentration of PCBs (246.6 ng.g⁻¹), but PAHs levels very close to that measured in the Canche estuary (4,205.4 ng.g⁻¹). We also measured PBDEs in the

three estuaries. For these specific pollutants, we found the higher concentrations in the Fosse Nord site, with concentrations more than 4 times higher than in Canche (16.4 ng.g^{-1} vs 3.6 ng.g^{-1}) (Fig.2), while intermediate concentrations were measured at the Rouen site (8.5 ng.g^{-1}). The organic contamination in the Seine estuary, using the Canche as a reference, therefore leaves no doubt.

Phenotypic indicators

The exposure of organisms to environmental disturbances, including the presence of xenobiotics, generally results in phenotypic consequences, which can be used as indicators of environmental quality when assessed in sentinel species. Among the commonly assayed phenotypes, the condition index aims to represent the impact of environmental conditions on animal fitness. Another indicator, the RNA/DNA ratio, is a good proxy of the cellular activity. Finally, as exposure to xenobiotics affect the integrity of genetic material, genotoxicity tests are also often used as biomarkers to quantify the effects of pollution.

In this context, animals primarily fished in the Canche estuary were subjected to encagement in the three sites studied, i.e. the Canche itself, and the Rouen and Fosse Nord sites of the Seine estuary, and exposed for one month to the specific environmental conditions of the studied sites.

The best condition index (Fulton index, K) was found for fish caged in the Canche estuary (Fig. 3); however the differences with the fish caged in Rouen or Fosse Nord were very small, probably due to the short duration (1 month) of the experiment. Regarding the RNA/DNA ratio, the cell activity seemed to be higher for fish caged in Rouen vs in Canche and Fosse Nord (Fig. 3), a significant difference being only detected between Rouen and Canche.

Genotoxicity can be very efficiently assessed by using the COMET tests (Tice *et al.*, 2000). Unsurprisingly, animals encaged at the Rouen site showed the highest level of DNA damages (Fig. 3). Nevertheless, it should be noted that a very significant level of genotoxicity was also observed in fish maintained in the Canche estuary, while the lowest level, albeit already significant, was observed in the Fosse Nord encaged fish. The loss of genetic integrity in the Canche estuary could come: (1) from the high concentration of PAHs measured at this site and/or (2) from the reduced average depth of the cages in Canche vs Seine (respectively 3 m vs 8 m). We suggest that the limited cage depth in the Canche estuary could expose fish to possible thermal stress during sunny conditions at the end of summer; this stress could

impact fish DNA integrity. We consider that the water temperature during the same season is probably more stable in the deeper cages of the Seine estuary.

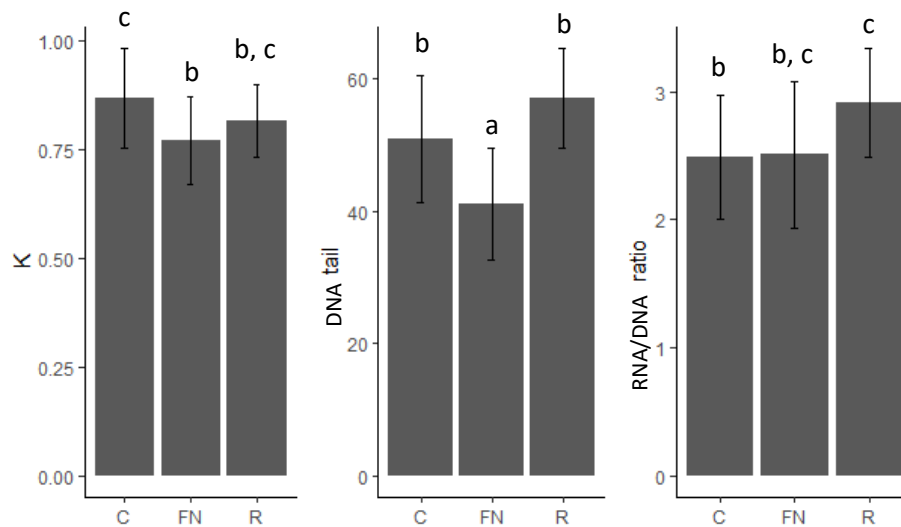


Fig. 3 : Phenotypic indicators results, Fulton Index (K), COMET test with DNA tail, and RNA/DNA ratio in Canche (C), Fosse Nord (FN) and Rouen (R)

Shotgun proteomic approach

One of the most spectacular phenotypes in organisms subjected to adverse environmental conditions is a deep reprogramming of genetic and protein expression, that can be studied by global transcriptomic and proteomic approaches. In particular, proteomics can provide a better understanding of how organisms adapt their metabolism to counter the harmful effects of stress on cellular functions. Conversely, it can be assumed that the proteins expressed by an organism in a given ecosystem do reflect, to some extent, the environmental conditions in which its live. Therefore, we have here developed a global shotgun proteomic approach which aimed at characterizing the proteins differentially expressed in the livers of *P. flesus* caught in the Canche estuary, but having undergone a 1-month encagement in each of the three estuarine sites covered by this study.

In total, almost 3 million MS/MS spectra (2,980,656) were recorded, with an average of 74,516 MS/MS spectra per run. All conditions were in triplicate. We analysed these spectra against the protein database of *Paralichthys olivaceus*, a flatfish species closely related to *P. flesus* with a fully sequenced genome (Shao *et al.*, 2015), and we could assign a total of 853,691 spectra to peptide sequences. The full data are recorded in Table S1 (Supplementary data). On average, about 21,000 MS/MS spectra per run could be interpreted, i.e. an

attribution rate of 28%, which is quite usual for a non-model organism and the use of a heterologous protein database. In total, no less than 3,761 proteins could be identified, including 2,511 certified by at least 2 different peptides (Table S2), on which the comparative statistical analysis was carried out using the PatternLab software. The analyses were carried out in pairs, each time using the fish caged in the Canche estuary as a reference, and applying a p value of 0.05, and an amplification (or reduction) factor of 1.5 as the thresholds of significance.

The comparison showed that the fish encaged in Rouen accumulated 180 proteins, and down-accumulated 311 proteins, as compared to those encaged in the Canche estuary. Regarding the fish encaged in the Fosse Nord site, 82 proteins were found to have increased abundance and 458 were down-accumulated in this condition. Since Rouen and Fosse Nord are two sites in the same estuary, one could have thought that part of the response would be common. In agreement, 31 proteins were found to be increased, and 131 proteins decreased in both sites. Very few proteins showed divergent result between the two sites; indeed, 8 were increased in Rouen and decreased in Fosse Nord, while 2 showed a reverse expression profile (decreased in Rouen and increased in Fosse Nord).

Functional analysis of deregulated proteins

Functional analysis makes it possible to visualize the main modifications and orientations of the metabolism under the different experimental conditions. To this end, the various protein subgroups were re-annotated using Blast2GO and EggNOG (Conesa *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2014) software, followed by a careful manual re-examination. Results presented in the Figure 4 show the number of proteins assigned to the different Cluster of Orthologous Group (COG) categories. They show that the main categories accumulated in fish caged in Rouen were related to the transport and metabolism of lipids (I), amino acids (E) and carbohydrates (G), as well as energy production and conversion (C). Concerning the Fosse Nord site, a single category clearly dominated the subgroup of accumulated proteins, i.e. the category transport and metabolism of amino acids (E). It was followed by the categories I (lipid metabolism and transport) and C (energy production and conversion). For down-accumulated proteins, the result were also very clear in fish encaged in Fosse Nord, with three clearly dominant categories, i. e. translation, ribosomal structure and biogenesis (J), suggesting an

overall depression of translational activity in cells, followed by categories O (PTM, protein turnover and chaperones) and U (intracellular trafficking), both related to protein processes and functioning. In the fish encaged in Rouen, the latter two categories were also affected, but the overall changes appeared more diversified. Indeed, the category RNA processing and modification (A) seemed to be the most reduced, and categories T (signal transduction mechanisms) and Z (cytoskeleton) also appeared to be affected.

These results are particularly interesting. Bearing in mind that the two polluted sites are in the same Seine estuary, but that the Rouen site has more metal and organic contamination (PCBs and PAHs), while the Fosse Nord site mainly contains PBDEs, we can expect common effects and different effects on fish encaged at the two sites. Going deeper into the mechanisms, we can see more precisely how fish manage these different situations.

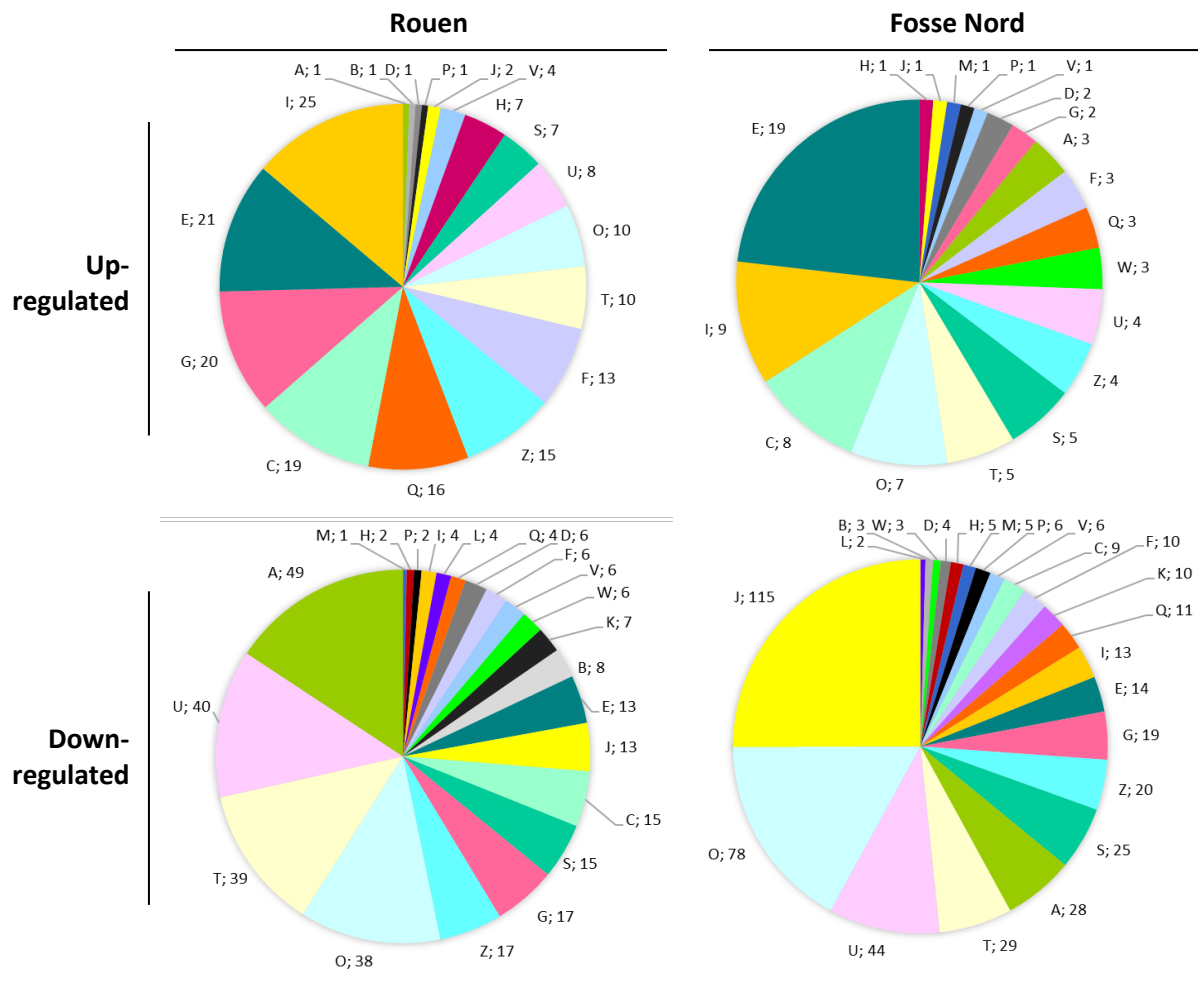


Fig. 4 : Pie charts representing the main Cluster of Orthologous Group categories that are up-regulated and down-regulated in Rouen- (left) and Fosse Nord- (right) encaged fish compared to encaged fish in Canche : metabolism of lipids (I), amino acids (E), carbohydrates (G), energy production and conversion (C), RNA processing and modification (A), intracellular trafficking (U), signal transduction mechanisms (T), PTM, protein turnover and chaperones (O), and translation, ribosomal structure and biogenesis (J)

Table 2: List of deregulated proteins potentially related to xenobiotics metabolism in Rouen and/or Fosse Nord encaged fish.

Accession	Function	COG ¹	GO ²	Mascot score	Rouen vs Canche				Fosse Nord vs Canche		
					coverage	Tfold	p value	PatternLab Class ³	Tfold	p value	PatternLab Class ³
XP_019950625.1	NADPH--cytochrome P450 reductase	C	-	627	15.6	1.85	1.29E-03	Blue	-1.22	2.02E-01	Red
XP_019935791.1	cytochrome P450 1A1	Q	+	391	14.8	4.26	9.53E-04	Blue	1.43	1.57E-01	Red
XP_019957767.1	cytochrome P450 2B4-like isoform X1	Q	-	248	8.0	-1.21	1.18E-01	Red	-2.21	2.33E-04	Blue
XP_019957775.1	cytochrome P450 2F2-like	Q	-	282	7.8	1.38	1.64E-01	Red	-2.43	1.39E-02	Blue
XP_019943823.1	cytochrome P450 2G1-like	Q	+	580	18.0	2.48	1.29E-05	Blue	1.30	1.88E-01	Red
XP_019943606.1	cytochrome P450 2G1-like	Q	+	540	13.1	1.90	1.14E-04	Blue	1.29	7.11E-02	Red
XP_019936551.1	cytochrome P450 2J2-like isoform X1	Q	-	131	7.8	1.00	5.00E-01	Red	-2.00	4.07E-02	Blue
XP_019936553.1	cytochrome P450 2J5-like	Q	-	258	12.9	-1.46	3.21E-02	Orange	-3.17	2.20E-04	Blue
XP_019957326.1	cytochrome P450 2K1-like	Q	-	138	8.5	1.37	4.01E-02	Orange	-1.86	3.21E-02	Blue
XP_019948310.1	cytochrome P450 4B1	Q	+	120	7.8	2.00	3.61E-02	Blue	1.00	5.00E-01	Red
XP_019962049.1	cytochrome P450 4V2	Q	-	398	15.0	2.16	3.63E-03	Blue	1.84	5.27E-03	Blue
XP_019936740.1	dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5-like	Q	+	420	11.9	2.10	5.45E-05	Blue	1.44	2.90E-02	Orange
XP_019947084.1	epoxide hydrolase 1	S	+	163	11.2	2.17	3.96E-03	Blue	1.28	2.55E-01	Red
XP_019965709.1	amine oxidase [flavin-containing]	Q	+	499	19.7	2.11	8.07E-04	Blue	1.14	3.15E-01	Red
XP_019940417.1	alcohol dehydrogenase 1-like	Q	+	807	26.3	1.53	2.84E-04	Blue	1.17	7.44E-02	Red
XP_019957877.1	aldehyde oxidase isoform X1	F	+	1309	21.5	1.86	3.84E-03	Blue	1.16	2.80E-01	Red
XP_019943023.1	mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	S	-	183	15.2	1.15	3.12E-01	Red	1.95	2.32E-03	Blue
XP_019960923.1	quinone oxidoreductase	Q	+	462	28.7	-1.59	3.49E-04	Blue	-1.06	2.64E-01	Red
XP_019947438.1	glutathione S-transferase A4-like	O	+	283	27.3	1.69	2.94E-03	Blue	1.26	7.34E-02	Red
XP_019946255.1	glutathione S-transferase A-like	O	-	157	17.0	5.29	5.01E-04	Blue	2.21	1.29E-01	Green
XP_019950413.1	glutathione S-transferase omega-1	O*	-	83	6.3	1.00	5.00E-01	Red	2.36	1.72E-02	Blue
XP_019969171.1	UDP-glucuronosyltransferase 2A1-like, partial	C, G	+	102	3.2	1.00	5.00E-01	Red	-1.75	2.34E-02	Blue
XP_019954821.1	UDP-glucuronosyltransferase 2A2-like	G*	+	176	8.1	1.77	3.01E-04	Blue	-1.30	9.39E-02	Red
XP_019952519.1	UDP-glucuronosyltransferase 2C1-like isoform X1	G*	+	261	7.5	2.35	8.52E-04	Blue	1.04	4.31E-01	Red
XP_019969103.1	UDP-glucuronosyltransferase-like	G*	+	100	6.2	2.33	4.78E-03	Blue	-1.25	3.00E-01	Red
XP_019956774.1	bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	F	+	148	5.6	-1.82	5.14E-02	Green	-2.00	4.61E-02	Blue

CHAPITRE V :Réponses de poissons encagés, analysées par la protéomique : caractérisation de l'état écologique à micro-échelle

	bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase										
XP_019952229.1	2	F	-	184	8.0	-1.09	3.44E-01	Red	-3.36	1.06E-04	Blue
XP_019953221.1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	F	+	483	31.2	-1.62	1.00E-02	Blue	-1.21	1.39E-01	Red
XP_019934383.1	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase-like	I*	-	353	29.6	2.28	2.81E-03	Blue	1.44	1.89E-01	Red
XP_019953837.1	adenylate kinase 4, mitochondrial	F	+	133	10.6	1.06	4.35E-01	Red	3.00	2.49E-03	Blue
XP_019954768.1	betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	E	-	1248	50.4	-1.10	1.37E-01	Red	-1.52	1.22E-04	Blue
XP_019956435.1	betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like	E	-	508	27.2	5.00	1.78E-05	Blue	2.52	1.75E-03	Blue
XP_019954766.1	betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like	E	-	1608	61.1	1.19	1.10E-01	Red	-1.74	1.89E-03	Blue
XP_019956582.1	S-adenosylmethionine synthase isoform X1	H	+	606	26.3	-3.84	1.68E-04	Blue	-2.11	2.25E-03	Blue
XP_019935095.1	adenosylhomocysteinase 2-like isoform X1	H	-	157	3.3	1.00	5.00E-01	Red	4.20	4.27E-03	Blue
XP_019958954.1	cystathionine beta-synthase-like	E	-	882	31.1	1.01	4.68E-01	Red	1.84	6.23E-06	Blue
XP_019944627.1	choline dehydrogenase, mitochondrial	C	-	580	17.7	2.35	2.61E-03	Blue	1.74	2.75E-02	Blue
XP_019959810.1	hepatocyte nuclear factor 4-alpha isoform X1	K	+	190	11.0	-3.58	6.62E-06	Blue	-2.26	2.31E-04	Blue
XP_019955942.1	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1-like isoform X1	I	+	119	5.3	2.10	3.04E-02	Blue	1.00	5.00E-01	Red
XP_019938496.1	L-xylulose reductase	Q	+	168	13.9	1.54	1.65E-02	Blue	1.18	2.46E-01	Red
XP_019938467.1	PHD finger-like domain-containing protein 5A	K	+	201	33.6	-2.62	1.04E-03	Blue	-1.26	1.30E-01	Red
XP_019962483.1	thromboxane-A synthase-like, partial	Q	+	112	9.7	1.78	3.05E-02	Blue	-1.15	3.11E-01	Red
XP_019961561.1	uncharacterized protein LOC109641517 isoform X2	Q	+	286	26.0	-1.83	3.31E-04	Blue	-1.74	4.90E-03	Blue

¹: COG, Cluster of Orthologous Groups; all assignments were manually checked; asterisked categories were manually changed.

²: GO, Gene Ontology. + and – refer to proteins that were assigned at least one of the GO terms related to xenobiotics metabolism, i.e. GO:0006805 (xenobiotic metabolic process) or GO:0042178 (xenobiotic catabolic process) or GO:0042908 (xenobiotic transport) or GO:0052697 (xenobiotic glucuronidation) or GO:0009410 (response to xenobiotic stimulus) or GO:0071466 (cellular response to xenobiotic stimulus)

³: PatternLab's classes as given by the TFold module; Only the Blue class identifications meet both the fold (≥ 1.5) and statistical criteria (p value ≤ 0.05). Orange, green and red ones were thus disconsidered.

Deregulation of xenobiotic metabolism

As a rule, organisms react to the presence of xenobiotics by setting up excretion systems, and/or by activating metabolic systems, which are often non-specific or with very low specificity, aiming at increasing the water solubility of chemical compounds. The latter metabolic mechanisms are generally classified into Phase I and Phase II detoxification processes (Lee *et al.*, 2015).

The Phase I mechanisms usually involve chemical reactions of hydrolysis, reduction and oxidation, exposing or introducing a functional group (-OH, -NH₂, -SH or -COOH) increasing the reactivity and hydrophilicity of the molecule. One major protein system involved in these reactions is represented by Mixed Function Oxidases (MFO), which require the coordinated action of a cytochrome P450 protein, together with a NADPH-Cytochrome P450 Reductase. These systems are often used to assess the ecotoxicological status of ecosystems, by measuring ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity, which is a recognized biomarker of the presence of pollutants such as PAHs, PCBs and dioxins for example.

It is noteworthy that one NADPH-Cytochrome P450 Reductase is significantly positively deregulated in fish caged in Rouen, as well as 5 different isoforms of Cytochrome P450, which show very important induction factors (from 7.8 to 18 fold; Table 2) In fact, no less than 10 different cytochrome P450 isoforms are deregulated in our study. 4 are specifically, and significantly positively deregulated in Rouen, 1 is positively deregulated in fish from both the Rouen and the Fosse Nord sites, while 4 see their specific expression significantly decreased in the Fosse Nord site. Cytochromes P450 belong to a large family of enzymes, not only related to the metabolism of xenobiotics, but also to some normal cellular metabolisms such as biosynthesis and catabolism of steroid hormones, bile acids, fat-soluble vitamins, fatty acids and eicosanoids. For example, thromboxane A synthase, which is also accumulated in Rouen fish, is a P450 dependent enzyme involved in the metabolism of prostaglandin H₂. Interestingly, only the 4 isoforms significantly positively deregulated in Rouen were assigned the GO term 0006805, "xenobiotic metabolic process". It is likely that only these 4 isoforms are actually related to high concentrations of PAHs and PCBs, while the others, especially those negatively regulated in the Fosse Nord encaged fish, are related to the general metabolism of the European flounder.

Other enzymes induced in fish from Rouen are also clearly associated with phase I reactions. In particular, dimethylaniline monooxygenase is a dependent NADPH flavoprotein involved in the oxidation of many xenobiotics, drugs and pesticides, and epoxide hydrolase, which converts epoxide groups (often generated by MFOs) into diol, are also enzymes typically linked to phase I reactions. Other oxidases such as amine oxidase and aldehyde oxidase that were found accumulated in Rouen could also catalyze Phase I reactions.

We also observed a number of proteins related to Phase II reactions induced in fish encaged in the Seine estuary. For example, three glutathione S-transferases were evidenced in our study, of which two were accumulated in the fish caged in Rouen, while the third one was accumulated in Fosse Nord fish. Like cytochrome P450, GSTs are an important family of proteins that play an essential role in the normal metabolism of cells, more specifically in cell redox homeostasis and adaptation to oxidative stress. Only a few are directly involved in the detoxification of xenobiotics; they act by conjugating a glutathione molecule on xenobiotics, thus increasing their water solubility.

Interestingly, in a relatively recent proteomic study (Galland *et al.*, 2015), we showed that *P. flesus* accumulated GST during an experimental exposure to a mixture of PAHs and PCBs reflecting the Seine contamination. This GST accumulation was related to the concomitant increase in many enzymes involved in the methionine cycle and the synthesis of cysteine, which is a precursor of glutathione. Here again, we found some enzymes belonging to this cycle, such as an isoform of betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) strongly induced in both Rouen and Fosse Nord fish, while two other isoforms of the same enzyme BHMT were down-accumulated in the fish encaged in Fosse Nord. Concomitantly, an S-adenosyl-methionine synthase was down-accumulated under both conditions. Interestingly, two other proteins related to this metabolism, i. e. cystathionine beta synthase, involved in the synthesis of cysteine, which is one of the precursors of glutathione, as well as adenosylhomocysteinase, which is important to feed the homocysteine pool in the cell, were found in the Fosse Nord fish.

Phase II metabolism involves conjugation reactions with glutathione, but also with other molecules such as glucuronic acid or sulfates. The addition of glucuronic acid to a xenobiotic molecule requires the enzyme UDP-glucuronosyl transferase. In our study, no less than 4 isoforms of this enzyme were found deregulated. 3 were accumulated by fish encaged in Rouen, while one was found to be decreased in Fosse Nord. Interestingly, the latter was not

assigned any GO term related to xenobiotics (unlike the others which were all assigned the GO:0006805 term, i.e. xenobiotic metabolic process), and could thus be linked to another metabolism. Regarding sulfatation mechanisms, only one protein was shown deregulated, but negatively, in the Fosse Nord site. This protein is a 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase, responsible for the activation of sulfate necessary for its conjugation. No sulfotransferase was observed. Nevertheless, the sulfotransferases involved in these Phase II reactions are generally known non-inducible proteins (Stanley *et al.*, 2005).

Beyond these Phase I and II reactions, which are relatively well documented, many other proteins could be involved in xenobiotic metabolism. Indeed, xenobiotics are by nature very diversified molecules that have been very recently introduced into natural ecosystems (as a result of industrialization). As a consequence, almost no co-evolution occurred between these compounds and the organisms exposed to them, and very few cellular and molecular mechanisms are actually specific to a particular class of xenobiotics. Thus, the observed deregulation of many proteins associated with amino acids-, secondary metabolites- or lipids-metabolisms could either be a consequence, or an adaptations, to metabolize xenobiotics. For example, 3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase is an enzyme involved in the conversion of cholesterol into bile acids or steroid sex hormones. It is questionable whether the overexpression of this protein in fish encaged in the Rouen site is a consequence of exposure to molecules resembling its substrates, or whether this overexpression could generate endocrine disrupting effects. Specifically regarding endocrine disruption, we have not seen any usual markers such as vitellogenin or related proteins. Nevertheless, our results suggest that the liver cells of fish encaged in polluted sites encounter major changes of intracellular signal transduction systems (Figure 4), especially at the Rouen site, which is likely to generate phenotypes related to endocrine perturbations.

General perturbation of the cell metabolism

A major modification pointed out by our study concerns the deregulation of carbon and energy metabolism in fish encaged in polluted sites. Examining more precisely the proteomic modifications in the fish encaged in Rouen, we observed an accumulation of the enzymes involved in the degradation of glycogen, but also of almost all the enzymes involved in the glycolytic pathway, and many enzymes involved in the tricarboxylic acid cycle, and in

the mitochondrial electron transport chain. A large number of enzymes involved in the biosynthesis of fatty acids were also accumulated.

In the fish encaged at the Fosse Nord site, we did not find such deregulations. The metabolism even seems to go in the opposite direction regarding glycolysis and fatty acid synthesis. For example, the two Fatty Acid Synthase induced in Rouen revealed down-accumulated in Fosse Nord. On the other hand, as in Rouen, we observed a sharp decrease of several subunits of a V-type proton ATPase, a proton pump which is not, to our knowledge, involved in energy metabolism, but in the maintenance of pH homeostasis of organelles. This deregulation could be linked to the strong disturbance of the Golgi apparatus suggested by the many proteins assigned to the COG category "Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport", most of which being related to the functioning of the Golgi apparatus.

The most significant point at Fosse Nord concerned translation, as more than 100 proteins related to translation, ribosomal structure and biogenesis were down-accumulated, thus suggesting a general inhibition of the cell translational system. Similar response has already been described in response to a variety of stressing situations (Brostrom *et al.*, 1996, von Born *et al.*, 2018). In these situations, mRNAs are generally stored in specific structures, the so-called "stress granules", which include both poly(A)+ mRNA, ribosomal proteins (mainly 40S ribosomal subunits), eIF elongation factors, and PABP (polyadenylate binding protein, many elongation factors) (Kedersha *et al*, 1999; 2002; Kimball *et al*, 2003; Mazroui *et al*, 2006; Anderson & Kedersha 2006). Most of these proteins reveal decreased in our study. On the other hand, some stress markers, such as the HSP70 and other protein chaperones, peroxiredoxin, or proteins associated with proteasome function and more generally with stress-induced protein recycling (e. g. ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, proteasome subunits and proteasome regulatory subunits), are also significantly decreased in polluted area. This result is quite difficult to interpret, because the presence of xenobiotics is known to cause stress at the cellular level, and most of these protein markers (HSPs, oxidative stress proteins and proteasome) are generally described as accumulated under such conditions (Kim & Kang, 2016; Wong & Do, 2017). At this time, we wonder if the caging by itself could, for different reasons, induce a situation of significant – and rather unpredictable – stress for fish. We are now working on this hypothesis to determine the specific effect of experimental conditions, on the fish encaged in our reference site of the Canche. As suggested previously, a possible thermal stress linked to the reduced depth of the Canche cages could impact the

fish in this “reference system”, thus explaining possible higher levels of HSPs, oxidative stress proteins and proteasome, in Canche vs Seine.

Finally, a notable point is the impact of the encagement in polluted sites on the defence mechanisms of fish, especially their immunity. Indeed, we observed in both sites a decrease in several complement proteins (1Q, C3, C5), but also in proteins linked to platelet aggregation (coagulation factor X, fibrinogen, fibronectin, antithrombin), which could have a deleterious effect on the ability of fish to defend themselves against possible pathogens.

Concluding remarks

In this study, we collected European flounders from the Canche estuary, an estuary close to a protected area known to be essentially free of pollutants. These fish were encaged for one month in the same estuary, used as the control, and in two different sites in the Seine estuary, showing very contrasted levels of pollution. Determining pollutants in the sediments of the three sites, we showed very high contamination levels of metals, PAHs and PCBs in the Rouen site, whereas the Fosse Nord site was mainly polluted by PBDEs. The proteomic phenotypes of fish encaged in the polluted sites, as compared to those encaged in the Canche estuary, revealed major changes in the general cellular functioning, including e.g. increase in energy metabolism and fatty acid synthesis in Rouen, a general depletion of the translational system, more strongly marked at the Fosse Nord site, and an overall impact on signal transduction processes and intracellular traffic processes, that should be related to a general malfunction of the Golgi apparatus. In order to better interpret these data, we are currently evaluating the impact of caging on the overall physiology of these fish. Beyond these general changes, we have seen an increase in many proteins clearly associated with the detoxification mechanisms of xenobiotics, both Phase I and Phase II mechanisms. The increase in these proteins was mainly observed in the fish encaged in Rouen, in strong agreement with the pollution data we acquired for this site.

References

- Anderson, P., & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol*, 172(6), 803-808.
- Amara, R., Méziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., & Laffargue, P. (2007). Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 351, 201-208.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., & Minier, C. (2009). Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*. 627(1), 87.
- Archambault, B., Rivot, E., Savina, M., & Le Pape, O. (2015). Using a spatially structured life cycle model to assess the influence of multiple stressors on an exploited coastal-nursery-dependent population. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 201, 95-104.
- Aubry, A., & Elliott, M. (2006). The use of environmental integrative indicators to assess seabed disturbance in estuaries and coasts: application to the Humber Estuary, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 53(1-4), 175-185.
- 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., Orth, R. J., Sheridan, P.F., & Weinstein, M.P. (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: a better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and management of these areas. *AIBS Bull.*, 51(8), 633-641.
- Blanchet, H., Lavesque, N., Ruellet, T., Dauvin, J. C., Sauriau, P. G., Desroy, N., Desclaux, C., Leconte, M., Bachelet, G., Janson, A.-L., Bessineton, C., Duhamel, S., Jourde, J., Mayot, S., Simon, S., & de Montaudouin, X. (2008). Use of biotic indices in semi-enclosed coastal ecosystems and transitional waters habitats—implications for the implementation of the European Water Framework Directive. *Ecol. Indic.* 8(4), 360-372.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. *JoX.* 6(2).
- Brostrom, C. O., Prostko, C. R., Kaufman, R. J., & Brostrom, M. A. (1996). Inhibition of Translational Initiation by Activators of the Glucose-regulated Stress Protein and Heat Shock Protein Stress Response Systems. *J. Biol. Chem.* 271(40), 24995-25002
- Burgeot, T., Akcha, F., Menard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martinez-Gomez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., & Hylland, K. (2017). Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Mar. Environ. Res.* 124, 92-105.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., & Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79(3), 257-267.

- Carpentier, S., Moilleron, R., Beltran, C., Herve, D., & Thevenot, D. (2002). Quality of dredged material in the river Seine basin (France). II. Micropollutants. *Sci. Tot. Environ.* 299(1-3), 57-72.
- Carvalho, P. C., Fischer, J. S., Chen, E. I., Yates, J. R., & Barbosa, V. C. (2008). PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. *BMC Bioinformatics.* 9(1), 316.
- Chapman, P. M., & Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol.Chem.* 20(1), 3-22.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Costanza, R., R., d'Arge, R., deGroot, S., Farber, M., Grasso, B., Hannon, K., Limburg, S., Naeem, R.V., Oneill, J., Paruelo, R.G., Raskin, P., Sutton, & M., VandenBelt. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature.* 387:253-260.
- Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., & Le Pape, O. (2009). Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuar. Coast. Shelf S.* 81(2), 179-190.
- Dauvin, J. C., Ruellet, T., Desroy, N., & Janson, A. L. (2007). The ecological quality status of the Bay of Seine and the Seine estuary: use of biotic indices. *Marine Pollution Bulletin*, 55(1-6), 241-257.
- Dauvin, J. C., & Ruellet, T. (2009). The estuarine quality paradox: is it possible to define an ecological quality status for specific modified and naturally stressed estuarine ecosystems ? *Mar. Pollut. Bull.* 59(1-3), 38-47.
- Dauvin, J. C. (2018). Twenty years of application of Polychaete/Amphipod ratios to assess diverse human pressures in estuarine and coastal marine environments: A review. *Ecol. Indic.* 95, 427-435.
- Dévier, M. H., Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., & Budzinski, H. (2013). Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(2), 708-722.
- Dupierris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., & Bruley, C. (2009). A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics*, 25(15), 1980-1981.
- Edgar, G. J., Barrett, N. S., Graddon, D. J., & Last, P. R. (2000). The conservation significance of estuaries: a classification of Tasmanian estuaries using ecological, physical and demographic attributes as a case study. *Biol. Conserv.* 92(3), 383-397.
- Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Chaumot, A., Duflot, A., Geffard, A., Forget-Leray, J., & Xuereb, B. (2018). Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H.) population of the Seine estuary. *Environ. Pollut.* 245, 485-493.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J. Sea Res.* 75, 135-141.

- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2015). Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 95(2), 646-657.
- Geraudie, P., Gerbrun, M., & Minier, C. (2017). Endocrine disruption effects in male and intersex roach (*Rutilus rutilus*, L.) from French rivers: an integrative approach based on subcellular to individual responses. *Comp. Biochem. Phys. B.* 211, 29-36.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chamot, A., Geffard, O., & Armengaud, J. (2018). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *J. Proteomics. In press.*
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J., & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids res.* 36(10), 3420-3435.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., & Geffard, O. (2011). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ. Pollut.* 159(6), 1682-1691.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147(7), 1431-1442.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., & Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNAⁱ Met)-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell.* 13(1), 195-210.
- Kim, J. H., & Kang, J. C. (2016). The toxic effects on the stress and immune responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* exposed to hexavalent chromium. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43, 128-133.
- Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S., & Harding, H. P. (2003). Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol.-Cell. Ph.* 284(2), C273-C284.
- Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J. (2014). Development of an innovative and green stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J. Chromatogr. A.* 1349, 1-10.
- Lee, B. Y., Kim, H. S., Choi, B. S., Hwang, D. S., Choi, A. Y., Han, J., Won, E.J., Choi, I.K., Lee, S.L., Om, A.S., Park, H. G., & Lee, J.S. (2015). RNA-seq based whole transcriptome analysis of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana* focusing on xenobiotics metabolism. *Comp. Biochem. Phys. D.* 15, 12-19.
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., & Désaunay, Y. (2007). Convergent signs of degradation in both the capacity and the quality of an essential fish habitat: state of the Seine estuary (France) flatfish nurseries. *Hydrobiologia.* 588(1), 225-229.
- Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H., & Jackson, J. B. (2006). Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science.* 312(5781), 1806-1809.

- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70(4), 327-343.
- Martens, L., Hermjakob, H., Taylor, C., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., & Apweiler, R. (2004). The PRIDE Database: Giving Researchers Access to Proteomics Data and Providing This Data with a Home. *Mol. Cell. Proteomics.* 3, S257.
- Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M. E., Kaufman, R. J., Northcote, P., Tanaka, J., ... & Pelletier, J. (2006). Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 17(10), 4212-4219.
- Mouny, P., Dauvin, J. C., Bessineton, C., Elkaim, B., & Simon, S. (1998). Biological components from the Seine estuary: first results. In *Oceans, Rivers and Lakes: Energy and Substance Transfers at Interfaces* (pp. 333-347). Springer, Dordrecht.
- Mouny, P., & Dauvin, J. C. (2002). Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine estuary (English Channel). *Oceanol. Acta.* 25(1), 13-22.
- Ohe, T., Watanabe, T., & Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 567(2-3), 109-149.
- Peig, J., & Green, A. J. (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct. Ecol.* 24(6), 1323-1332.
- Powell, S., Forslund, K., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Huerta-Cepas, J., Gabaldon, T., Rattei, T., Creevey, C., Kuhn, M., Jensen, L.J., Von Mering, C., & Bork, P. (2014). eggNOG v4. 0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic acids research*, 42(D1), D231-D239.
- Riou, P., Le Pape, O., & Rogers, S. I. (2001). Relative contributions of different sole and plaice nurseries to the adult population in the Eastern Channel: application of a combined method using generalized linear models and a geographic information system. *Aquat. Living Resour.* 14(2), 125-135.
- Rochette, S., Rivot, E., Morin, J., Mackinson, S., Riou, P., & Le Pape, O. (2010). Effect of nursery habitat degradation on flatfish population: Application to *Solea solea* in the Eastern Channel (Western Europe). *J. Sea Res.* 64(1-2), 34-44.
- Schloesser, R. W., & Fabrizio, M. C. (2018). Nursery Habitat Quality Assessed by the Condition of Juvenile Fishes: Not All Estuarine Areas Are Equal. *Estuar. Coast.* 1-19.
- Shao, C., Niu, Y., Rastas, P., Liu, Y., Xie, Z., Li, H., Wang, L., Jiang, Y., Tai, S., Tian, Y., Sakamoto, T & Chen, S. (2015). Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL mapping of *Vibrio anguillarum* disease resistance and comparative genomic analysis. *DNA Res.* 22(2), 161-170.
- Shao, C., Bao, B., Xie, Z., Chen, X., Li, B., Jia, X., ... & Hamre, K. (2017). The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nat. Genet.* 49(1), 119.
- Shrivastava, A. and Gupta, V. B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chron. of Young Sci.* 2 (1), 21–25.

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175(1), 184-191.
- Stanley, E. L., Hume, R., & Coughtrie, M. W. (2005). Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol. Cell. Endocrinol.* 240(1-2), 32-42.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J., & Von Mering, C. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 45, 362-368.
- Tecchio, S., Chaalali, A., Raoux, A., Rius, A. T., Lequesne, J., Girardin, V., Lassalle, G., Cachera, M., Riou, P., Lobry, J., Dauvin, J.C., & Niquil, N. (2016). Evaluating ecosystem-level anthropogenic impacts in a stressed transitional environment: The case of the Seine estuary. *Ecol. Indic.*, 61, 833-845.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3), 206-221.
- Vincent-Hubert, F., Uher, E., Di Giorgio, C., Michel, C., De Meo, M., & Gourlay-France, C. (2017). Use of low density polyethylene membranes for assessment of genotoxicity of PAHs in the Seine River. *Ecotoxicology*, 26(2), 165-172.
- von Born, P., Bernardo-Faura, M., & Rubio-Somoza, I. (2018). An artificial miRNA system reveals that relative contribution of translational inhibition to miRNA-mediated regulation depends on environmental and developmental factors in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*. 13(2), e0192984
- Wong, L. L., & Do, D. T. (2017). The Role of Heat Shock Proteins in Response to Extracellular Stress in Aquatic Organisms. In *Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences* (pp. 247-274). Springer, Cham.

Discussion générale & Conclusions

1. Cadre général des travaux sur les systèmes estuariens et grandes questions abordées dans cette thèse

Les milieux estuariens présentent de forts enjeux écologiques et économiques. Ils abritent une biodiversité importante et rendent par ailleurs des services écosystémiques considérables à l'espèce humaine (biotransformation des nutriments et des molécules polluantes, régulation des crues, voies de navigation majeures, zones pour la pêche professionnelle et pour les activités de loisir, ...). Néanmoins, ces milieux caractérisés par une forte variabilité hydroclimatique naturelle sont aussi soumis aux changements globaux (réchauffement climatique, altération des débits fluviaux) et aux contraintes locales liées aux activités anthropiques (contamination chimique, dégradation des habitats, surexploitation des espèces, ...). L'étude de ces milieux complexes et de leur faune associée est d'un intérêt majeur pour mettre en place des mesures de gestion appropriées pour assurer la pérennité de leur fonctionnement écologique.

Notre travail vise à explorer la vulnérabilité de populations de poissons estuariennes, soit la capacité de ses populations à se maintenir dans un environnement changeant. Nous nous sommes basés, en démarrant cette étude, sur les travaux menés sur le flet par le Laboratoire LEMAR durant ces 20 dernières années qui ont permis de défricher la plasticité phénotypique et le potentiel adaptatif de cette espèce dans des environnements contrastés.

Dans cette thèse, l'objectif global a été d'explorer *in natura* les capacités des populations de flet à répondre à des facteurs de forçage globaux (réchauffement climatique) mais aussi locaux (contamination chimique) ; le but étant d'estimer le niveau de vulnérabilité des populations, pour tenter de caractériser l'état écologique des systèmes estuariens. Nos différentes approches aboutissent à une exploration de 4 grandes questions sur la réponse du flet aux stress environnementaux :

- Peut-on identifier une perte de fitness individuelle par les marqueurs phénotypiques ?
- Peut-on estimer le niveau de vulnérabilité ou de résilience des populations, par les approches phénotypiques et génétiques ?
- Le monitoring actif de type « caging » permet-il de caractériser l'état écologique d'un estuaire à micro-échelle ?
- Le niveau de vulnérabilité d'une population permet-il d'estimer l'état écologique du système estuarien ?

Peut-on identifier une perte de fitness individuelle par les marqueurs phénotypiques ?

La comparaison des populations de flet *in natura* via une approche en bioénergétique nous a paru être un outil pertinent pour tester la capacité des individus à moduler leur balance énergétique face aux stress environnementaux. L'allocation d'énergie à différentes fonctions peut diverger selon les individus et/ou les conditions environnementales. En situation de stress croissant, la demande énergétique augmente ainsi que le coût de maintenance de l'organisme (Sokolova *et al.*, 2012). La fitness des individus peut alors être affaiblie, par notamment une possible réduction de la croissance et/ou de l'investissement dans l'effort de reproduction. Notons que la perte de fitness mesurée chez des poissons juvéniles se manifestera potentiellement par des altérations de croissance, alors que chez les adultes elle s'exprimera essentiellement par la réduction du potentiel reproducteur.

Ainsi, dans la présente étude, nous avons comparé le **métabolisme énergétique de flets juvéniles** capturés en milieux contrastés (stress thermique vs forte contamination chimique chronique vs milieu peu stressé) **via l'expression différentielle de gènes candidats. Nous avons de plus couplé l'approche en bioénergétique avec d'autres outils (analyse des lipides membranaires, indicateurs de dommage/de défense) pour des flets adultes** en période de post-reproduction, i.e. pour des poissons ayant épuisé une grande partie de leurs réserves corporelles dans l'effort de reproduction.

L'approche en bioénergétique sur les flets juvéniles via l'étude de l'expression de gènes candidats s'est révélée pertinente pour caractériser les capacités d'acclimatation et/ou d'adaptation des individus soumis à des stress différentiels. Cette approche suggère une perte de fitness des individus les plus stressées (faible réserve énergétique sous condition de stress thermique dans le Mondego, et sous stress chimique chronique en Seine) associée à une activité métabolique élevée (ATP F0, COII) pour la population de Seine, et à un métabolisme réduit (COII, 12S) pour la population du Mondego.

L'approche en bioénergétique sur les flets adultes a confirmé la perte de fitness chez les individus soumis à une forte contamination chimique, caractérisés par une réduction importante de leur réserve énergétique et une augmentation très significative de leur métabolisme énergétique.

Peut-on estimer le niveau de vulnérabilité ou de résilience des populations, par les approches phénotypiques et génétiques ?

Vulnérabilité d'une population de poisson sous stress chimique chronique

Dans cette étude nous avons ciblé particulièrement les capacités des populations soumises aux stress à maintenir leurs réserves corporelles et à produire de l'énergie. La population sous stress chimique de Seine présente une faible variabilité interindividuelle dans l'expression de différents gènes majeurs chez les poissons juvéniles (COII, 12S, 18S), relativement aux résultats observés dans la population peu stressée de Vilaine. Nous suggérons que la variabilité phénotypique interindividuelle - intrapopulationnelle au niveau de l'expression de différents gènes candidats puisse devenir un indicateur de l'état de santé des populations (Devin *et al.*, 2014). Cette faible variabilité phénotypique en Seine pourrait être un des facteurs explicatifs de la capacité réduite de cette population à répondre à un stress supplémentaire de nature thermique, relativement au potentiel de la population de Vilaine peu exposée aux stress environnementaux (Lavergne *et al.*, 2015). Nous considérons donc que la population de Seine pourrait être en situation de risque écologique face aux futurs changements environnementaux, relativement à la population de Vilaine présentant un risque écologique faible.

Par ailleurs, dans notre travail sur les poissons adultes (estuaire de Seine vs baie de Douarnenez) nous suggérons que la population de Seine aurait développé une certaine « capacité de résistance » (acclimatation et/ou adaptation) au stress chimique, notamment en modulant la composition lipidique des membranes au niveau des organelles (augmentation de leur teneur en sphingolipides); cette modification permettrait de mieux maintenir la fonctionnalité des membranes et ainsi d'optimiser le fonctionnement du métabolisme énergétique, comme la gestion du stress oxydant. Nous montrons cependant que si cette population de Seine présente manifestement un potentiel de résistance au stress chimique, le coût physiologique de cette « adaptation » est vraisemblablement fort ; il se traduit ainsi par le maintien d'un métabolisme énergétique soutenu et par un niveau de réserve corporelle faible, très probablement liés aux besoins en ATP élevés, nécessaires pour protéger les tissus et réparer les dommages induits par les polluants.

L'étude de la variabilité génétique de marqueurs neutres (microsatellites) n'a pas permis de détecter une perte de diversité génétique dans la population très polluée de Seine vs dans la population peu contaminée de Douarnenez, la diversité génétique étant identique

dans ces deux populations. Nous suggérons donc que la population de Seine n'a pas été affectée par des goulots d'étranglements successifs ; son recrutement en juvéniles serait donc assuré de manière pérenne par de l'autorecrutement, et/ou par des flux de gènes probablement importants entre les populations à l'échelle de la Manche Est.

Vulnérabilité d'une population de poisson sous stress thermique

Pour la population du Mondego située en limite Sud de l'aire de distribution du flet et donc en situation de stress thermique, les poissons juvéniles présentent comme vu précédemment un métabolisme énergétique réduit et maximalisent par ailleurs leur activité métabolique par mitochondrie (COII/12S & ATP F0/12S forts). Cette bioénergétique particulière pourrait avoir une certaine valeur adaptative ; elle pourrait expliquer un meilleur potentiel de cette population du Sud à résister à un stress thermique et hypoxique, contrairement à des populations de flets localisées plus au Nord, comme celles de Vilaine et de Boulogne (Pédron *et al.*, 2017a, b). Cette population du Mondego présente cependant un risque d'extinction non négligeable, comme cela a été analysé dans notre approche en génétique; nous suggérons donc que son déclin démographique actuel n'est pas lié à la capacité réduite des poissons juvéniles à se maintenir dans les zones de nourricerie, mais serait expliqué par une viabilité embryon-larvaire réduite, voire par une altération de la fonction de reproduction chez les poissons adultes, au niveau de la Péninsule Ibérique.

Afin d'explorer le risque écologique encouru par la population du Mondego, nous avons mis en place une approche démo-génétique sur cette population marginale située en limite Sud de l'aire de répartition du flet en Europe. Nous avons pour cela estimé la taille efficace de la population du Mondego, relativement à la population de Vilaine située au cœur de la distribution et considérée comme stable démographiquement ; notre objectif étant d'identifier un possible goulot d'étranglement génétique dans le Mondego. Un travail précédent a mis en évidence une plus faible diversité allélique chez les populations de flet de la Péninsule Ibérique (Lima, Mondego) relativement aux populations plus au Nord, associée à une variation temporelle significative des fréquences alléliques du Mondego (Pédron, 2016) ; cette étude suggérant un dysfonctionnement démographique de la population du Mondego conduisant à une forte dérive génétique. Comme vu en introduction, les goulots d'étranglement peuvent se solder par une perte de variabilité génétique conduisant à deux

situations extrêmes : la restauration ou l'extinction (Harmon & Braude, 2010 ; Steeves *et al.*, 2017).

L'approche génétique développée au cours de nos travaux a ainsi mis en évidence une taille efficace plus réduite dans la population du Mondego vs Vilaine (respectivement de 800 vs ∞), par la méthode du déséquilibre de liaison ; ce qui suggère l'existence d'un dysfonctionnement démographique dans cette population estuarienne pouvant être dû à une forte dérive génétique, et/ou à une histoire phylogéographique particulière. La présence d'un goulot d'étranglement génétique a de plus été testée et montre cependant des résultats plus contrastés, avec une faible diversité allélique mais pas d'excès en hétérozygote dans le Mondego ; elle reflète un goulot d'étranglement trop ancien, trop récent ou pas suffisamment marqué pour être détecté. En revanche, dès lors que la population de flet est de grande taille, il devient difficile de détecter le risque écologique encouru par cette population à travers l'estimation de sa taille efficace, comme cela a été démontré pour la population de Vilaine. Nous avons par ailleurs suggéré qu'une estimation pertinente de la taille efficace nécessite un nombre de marqueurs microsatellites voisin de 20, le nombre d'individus échantillonnés dépendant clairement de la taille efficace présumée de la population (soit 150 pour un N_e de 800, et plus de 250 pour une taille plus grande).

Le monitoring actif de type « caging » permet-il de caractériser l'état écologique d'un estuaire à micro-échelle ?

L'expérience de monitoring actif de type « caging » permet d'analyser les réponses biologiques du poisson dans différents environnements, en plaçant dans les sites expérimentés des individus aussi « homogènes » que possible, ceci devant faciliter la comparaison des réponses inter-sites. Cette approche vise à explorer l'état écologique d'un milieu sur le fonctionnement physiologique du poisson, à l'échelle des micro-habitats. Ainsi, notre étude a mis en évidence le caractère fortement pollué d'un site amont Seine (Rouen) vs un site aval Seine (Fosse Nord), à travers notamment la sur-activation des processus de détoxification suite à un mois d'encagement. Le monitoring actif chez le flet est donc a priori très pertinent pour appréhender la qualité écologique des habitats estuariens à micro-échelle. Notons que l'approche en protéomique haut-débit (dite shotgun), mise en œuvre sur les foies des flets expérimentés en caging, s'est révélée particulièrement efficace pour identifier et quantifier par individu plusieurs centaines de protéines ; elle a ainsi permis d'explorer la

nature du stress lié à chaque site, et les réponses biologiques du poisson aux niveaux de nombreuses voies métaboliques.

Le niveau de vulnérabilité d'une population permet-il d'estimer l'état écologique du système estuarien ?

La détermination du niveau de vulnérabilité des populations naturelles est un enjeu majeur pour cibler les mesures de conservation sur des populations d'intérêt, mais aussi pour tenter de caractériser l'état écologique des systèmes estuariens. Cette approche vise à explorer le potentiel d'une espèce ou de populations à se maintenir dans un environnement changeant. Ce maintien dépend de la plasticité phénotypique de l'espèce, mais aussi de ses capacités adaptatives face aux fluctuations de l'environnement. Ainsi, il apparaît essentiel de déterminer cette vulnérabilité en s'appuyant sur les variations phénotypiques de l'espèce qui permettent une certaine plasticité au niveau populationnel, mais aussi sur des variations génotypiques qui peuvent refléter des processus d'adaptation. Le flet est une espèce sentinelle d'intérêt majeur, de par son cycle de vie résolument estuarien. Comparer les réponses individuelles et populationnelles du flet dans des environnements caractérisés par des niveaux de stress très contrastés (chimique, thermique) permet de déterminer la vulnérabilité des populations. Mais cela est-il suffisant pour caractériser l'état écologique de ces divers systèmes estuariens ? Toutes les approches citées précédemment ont permis de décrire l'effet des stressseurs de l'environnement sur la population. Cette interrelation entre la population et le milieu environnant nous donne des indicateurs indirects de l'état écologique du système.

La réponse des organismes du niveau individuel au niveau populationnel devrait être idéalement couplée avec une bonne connaissance :

- sur le fonctionnement physico-chimique de l'écosystème (variations spatio-temporelles de la salinité et de la température, du bouchon vaseux),
- sur la distribution des différents habitats (oligohalins, méso et polyhalins),
- sur la diversité des substrats,
- enfin sur les apports en nutriments et sur les principaux contaminants des eaux et des sédiments.

C'est donc la confrontation entre les données biologiques sur une espèce sentinelle et les caractéristiques de son environnement estuarien qui doit nous permettre d'aller vers une estimation de l'état écologique d'un estuaire. Nous suggérons que l'approche multi-estuaire

est d'un intérêt majeur pour comparer les réponses du poisson en habitats contrastés ; l'une des difficultés de cette approche est que l'on ne dispose pas forcément d'une typologie fine des différents stressseurs qui peuvent interagir dans les milieux estuariens. Nous suggérons d'intégrer aux approches biologiques ciblées (marqueurs sur l'état des réserves, la bioénergétique, le stress oxydant, la détoxification) des approches biologiques sans a priori de type protéomique et/ou transcriptomique haut débit ; les premiers marqueurs, suivis pour certains depuis des décennies dans les estuaires, permettent un suivi temporel de l'état du système, les seconds permettront d'identifier potentiellement de nouvelles sources de stress et de nouvelles voies métaboliques mise en œuvre par le poisson pour répondre aux stress. Ce type d'approche, notamment dans de petits systèmes estuariens où la nature des stressseurs est souvent mieux cernée, et où la diversité des habitats intra-estuariens disponibles pour le poisson est plus réduite relativement aux grands estuaires, devrait se révéler pertinente pour caractériser l'état écologique de ces différents systèmes.

2. Perspectives

Définir l'état écologique de petits estuaires à une échelle régionale

La difficulté de la détermination de l'état écologique des estuaires provient d'une part du caractère naturel et changeant des estuaires (hydromorphologie, physico-chimie, biologie) mais aussi de la diversité des pressions anthropiques. Dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), il paraît important de déterminer la qualité écologique des estuaires en utilisant divers indicateurs (biologiques, de fonctionnalité etc...) mais aussi en utilisant des espèces sentinelles de ces milieux. Le flet paraît donc adapté et pertinent pour répondre à cette question. Tout au long de cette thèse nous avons montré par les diverses approches employées, que nous sommes à l'interface entre écotoxicologie et écologie du stress. L'étude de la réponse des poissons aux multi-stress en estuaire, du niveau individuel au niveau populationnel, a permis d'identifier des pertes de fitness associées à des modulations de la physiologie (métabolisme énergétique), à des dommages physiologiques (neurotoxicité) ou à des mécanismes de défense (détoxification) mettant en exergue d'une part, les aptitudes des populations à répondre au stress, et d'autre part, la qualité écologique des estuaires. Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant de se positionner à échelle géographique plus fine, soit de mettre en œuvre une approche multi-estuarienne au niveau d'une région comme la

Bretagne. L'objectif principal est ici de considérer des petits systèmes estuariens dont les stress sont connus et où il existe peu de variabilité environnementale dans les habitats disponibles pour le flet juvénile ; ce dernier point est d'un intérêt majeur car il devrait conduire à réduire la variabilité interindividuelle dans la réponse des poissons au niveau intra-estuarien. Les stressseurs qui caractérisent ces estuaires sont principalement liés à l'enrichissement du milieu en nitrates et à des fortes teneurs en pesticides. Les nitrates sont considérés comme de possibles perturbateurs endocriniens chez les poissons ; un excès de nitrate conduisant par ailleurs à une eutrophisation estuarienne souvent caractérisée par des crises hypoxiques estivales. Les pesticides peuvent avoir des effets neurotoxiques, mais aussi néfastes sur la survie, le comportement et le métabolisme des poissons (Campos-Garcia *et al.*, 2015). La stratégie de notre nouveau projet est de prélever des flets juvéniles *in natura* dans 5 à 10 petits estuaires, de conduire des approches sans a priori (couplage RNAseq et protéomique shotgun) sur ces individus, parallèlement à un ancrage phénotypique mesuré chez les mêmes poissons (indices de condition, état des réserves, taux de croissance ...). Ces approches de type « omique » doivent permettre d'identifier sans a priori des milliers de protéines ou de gènes candidats en une analyse pour un individu, face à des indicateurs de fitness. La variabilité phénotypique inter-individuelle, intra et interpopulationnelles, doit permettre d'approfondir nos connaissances sur la réponse des populations de poisson face aux stressseurs. Le couplage réponses moléculaires - indicateurs de fitness devrait donc aboutir à l'évaluation de l'état écologique de ces petits estuaires, peu étudiés jusqu'à présent au niveau national. Ce projet vient d'être financé par l'Agence Française de la Biodiversité pour 2 ans et devrait me permettre de réaliser un post-doctorat au Laboratoire LEMAR.

Développer des approches intégrées couplant génotypes-phénotypes dans de grands systèmes estuariens à l'échelle de l'Europe

Au vu de l'ensemble des approches mentionnées ci-dessus, et de l'importance de l'intégration génotype-phénotype, il semblerait pertinent de développer une investigation en génomique de type « RAD-seq » (Restriction Site Associated DNA markers) sur de grands systèmes estuariens ; cette méthodologie pouvant en effet apporter des informations précieuses quant aux processus écologiques et évolutifs, sur des espèces non-modèles (Andrews *et al.*, 2016). La réponse d'une population au sein d'un estuaire, dépend de sa plasticité et/ou adaptation face à un environnement changeant, mais aussi de son histoire

phylogéographique. L'objectif principal ici, serait de comparer de grands estuaires, du Nord de la France au sud de la Péninsule Ibérique. Le choix d'une macro-échelle fait directement suite aux travaux de Pédrón (2016) qui a montré des capacités différentielles des populations à répondre aux stress, mais aussi une structure génétique marquée entre les populations périphériques Sud et les populations centrales. Le long de ce gradient latitudinal, il serait intéressant de prélever des juvéniles de flet *in natura*, en retenant des écosystèmes contrastés : Vilaine (référence) ; Gironde et Seine (stress chimiques lourds mais différentiels), Lima et Mondego, deux estuaires situés en limite Sud de l'aire de répartition du flet (exposés au stress thermique).

Les marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) permettent de réaliser un gain de temps appréciable lors des manipulations en laboratoire, relativement aux microsatellites. En effet le génotypage des SNP peut être sous-traité, l'extraction seulement étant réalisée au laboratoire. En revanche, c'est l'analyse de données qui sera ici la plus chronophage. La variabilité des approches menées sur ces marqueurs permettrait d'évaluer la vulnérabilité des populations, comme la qualité des milieux estuariens. L'utilisation de plusieurs milliers de SNP permettrait ainsi :

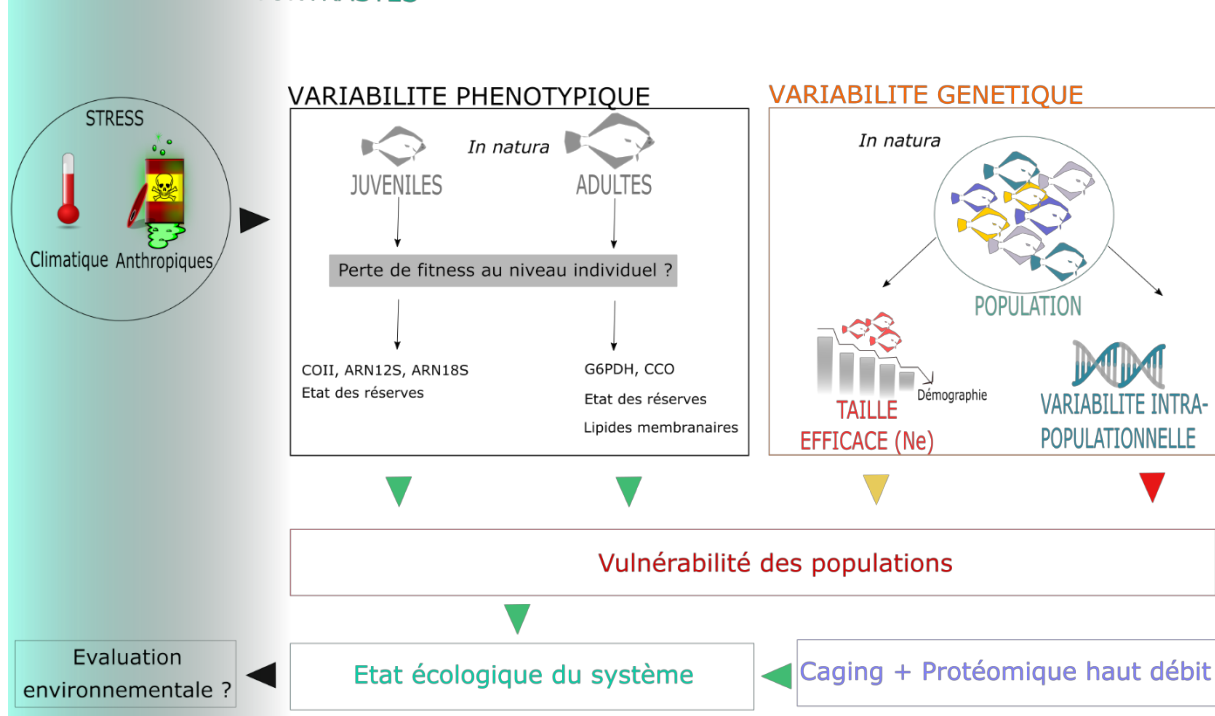
- de prolonger nos explorations sur la taille efficace à un instant t , sur des grands systèmes par des approches de **simulations de coalescence Bayésiennes** de types « ABC » (« Approximate Bayesian computation » ; Beaumont *et al.*, 2002) ou « MCMC » (« Markov Chain Monte Carlo » ; Drummond *et al.*, 2012). **Ces simulations de coalescence sont exigeantes en calculs et demandent une expertise particulière.** Enfin, les SNP pourraient être inclus dans des méthodes de simulation d'inférence démographique de façon à détecter d'éventuels goulots d'étranglement, comme avec le programme $\delta a \delta i$ (McCoy *et al.*, 2014) ;
- d'identifier des gènes d'intérêt et explorer le lien entre variation génétique et variation phénotypique (Kratochwil & Meyer, 2014) ;
- de détecter de possibles **signatures de sélection** sur les populations de flet en fonction de leur distribution et des pressions environnementales locales. Les SNP étant situés sur le génome entier, i.e. dans des régions codantes ou non.

3. Conclusion

L'exploration sur les populations naturelles, doit nous permettre de nous acquitter des biais liés aux expérimentations animales en laboratoire. Seulement, elle pose d'autres questions. Décrire la qualité d'un habitat à partir d'une espèce sentinelle dont on ne maîtrise ni les déplacements, ni la variabilité des paramètres de son environnement, peut s'avérer être un problème insoluble. Pour autant, l'étude menée tout au long de cette thèse a montré qu'en utilisant des approches ciblées sur le métabolisme énergétique, l'état des réserves, la gestion du stress oxydant, les phospholipides membranaires ..., il est possible de détecter des réponses plastiques et/ou adaptatives de populations de flets aux stressseurs ; certaines populations présentant cependant des caractères de vulnérabilité, d'autres manifestant certaines capacités de résilience. Au final, les différents marqueurs phénotypiques et génétiques mis en œuvre dans des contextes environnementaux variés ont permis d'émettre des hypothèses sur l'état écologique de grands systèmes estuariens.

Cette méthodologie pourrait être élargie à des approches « -omiques » et appliquée à des estuaires de petites tailles où la nature des stressseurs est mieux cernée et où la diversité des habitats intra-estuariens est réduite ; elle devrait conduire à une meilleure vision des liens entre la physiologie du poisson et l'état écologique des milieux estuariens.

ENVIRONNEMENTS CONTRASTES



Résumé de la thèse

Les différentes approches menées au cours de cette thèse, sur les variabilités phénotypique et génétique détectées dans des populations de flets vivant en environnements contrastés, visent à explorer le degré de vulnérabilité de ces populations. Notre étude a montré la pertinence de différents marqueurs phénotypiques (cadre noir). En revanche, l'approche démo-génétique se révèle efficace uniquement pour déterminer la vulnérabilité des populations de petite taille (flèche orange), et n'est pas informative pour la plupart des populations de flet à forts effectifs. La variabilité génétique intra-populationnelle ne permet pas de différencier une population fortement contaminée par les polluants d'une population peu polluée (flèche rouge). Enfin le niveau de vulnérabilité établi dans une population doit conduire à une estimation de l'état écologique du système estuarien. Cet état peut être décrit de manière complémentaire à travers une autre approche combinant le caging de poissons en estuaire, puis l'analyse de leur réponse par la protéomique haut-débit. Un projet est présenté dans les perspectives de cette thèse pour développer cette approche à une échelle régionale dans de petits estuaires.

Bibliographie

- Abel, S., zur Wiesch, P. A., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2015). Analysis of bottlenecks in experimental models of infection. *Plos Pathog.* 11(6), e1004823.
- Ackerman, M. W., Hand, B. K., Waples, R. K., Luikart, G., Waples, R. S., Steele, C. A., Garner, B.A., McCane, J., & Campbell, M. R. (2017). Effective number of breeders from sibship reconstruction: Empirical evaluations using hatchery steelhead. *Evol. Appl.* 10(2), 146-160.
- Agence de l'eau Seine-Normandie (2009). Programme interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine. n°ISBN : 978-2-918251-00-2. n°ISSN : 1968-5734. Dépôt légal : Juin 2009.
- Alberti, K. G. (1977). The biochemical consequences of hypoxia. *J. Clin. Pathol.* 3(1), 14-20.
- Allendorf, F. W., England, P. R., Luikart, G., Ritchie, P. A., & Ryman, N. (2008). Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends Ecol. Evol.* 23(6), 327-337.
- Amara, R., Méziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., & Laffargue, P. (2007). Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 351, 201-208.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., & Minier, C. (2009). Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia.* 627(1), 87.
- Amérand, A. (2006). Approche in vitro des interactions métabolisme énergétique-espèces réactives dérivées de l'oxygène dans le muscle de poissons : influence d'un facteur environnemental, la pression hydrostatique (Doctoral dissertation, Brest).
- Anacleto, P., Figueiredo, C., Baptista, M., Maulvault, A. L., Camacho, C., Pousão-Ferreira, P., Valente, L.M.P., Marques, A., & Rosa, R. (2018). Fish energy budget under ocean warming and flame retardant exposure. *Environ. Res.* 164, 186-196.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Gen.* 17(2), 81.
- Ang, C. S., Baker, M. S., & Nice, E. C. (2017). Mass spectrometry-based analysis for the discovery and validation of potential colorectal cancer stool biomarkers. In *Methods in enzymology* (Vol. 586, pp. 247-274). Academic Press.
- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., & Hartmann, E. M. (2014). Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J. Proteomics.* 105, 5-18.
- Assis, J., Coelho, N. C., Alberto, F., Valero, M., Raimondi, P., Reed, D., & Serrão, E. A. (2013). High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE.* 8(7), e68646.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 120(4), 483-495.
- Balick, D. J., Do, R., Cassa, C. A., Reich, D., & Sunyaev, S. R. (2015). Dominance of deleterious alleles controls the response to a population bottleneck. *Plos Genet.* 11(8), e1005436.
- Baptista, J., Martinho, F., Dolbeth, M., Viegas, I., Cabral, H., & Pardal, M. (2010). Effects of freshwater flow on the fish assemblage of the Mondego estuary (Portugal): comparison between drought and non-drought years. *Mar. Freshwater Res.* 61(4), 490-501.

- Bartley, D., Bagley, M., Gall, G., & Bentley, B. (1992). Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conserv. Biol.* 6(3), 365-375.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*. 162(4), 2025-2035.
- Beever, E. A., O'Leary, J., Mengelt, C., West, J. M., Julius, S., Green, N., Magness, D., Petes, L., Stein, B., Nicotra, A.B., Hellmann, J. J., Robertson, A.L., Staudinger, M.D., Rosenberg, A.A., Babij, E., Brennan, J., Schuurman, G.W., & Hofmann, G.E. (2015). Improving conservation outcomes with a new paradigm for understanding species' fundamental and realized adaptive capacity. *Conserv. Lett.* 9(2), 131-137.
- Belfiore, N. M., & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.* 489(2-3), 97-122.
- Bigg, G. R., Cunningham, C. W., Ottersen, G., Pogson, G. H., Wadley, M. R., & Williamson, P. (2007). Ice-age survival of Atlantic cod: agreement between palaeoecology models and genetics. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 275(1631), 163-173.
- Birch, G. F., Gunns, T. J., & Olmos, M. (2015). Sediment-bound metals as indicators of anthropogenic change in estuarine environments. *Mar. Pollut. Bull.* 101(1), 243-257.
- Bjørnstad, A., Larsen, B. K., Skadsheim, A., Jones, M. B., & Andersen, O. K. (2006). The potential of ecotoxicoproteomics in environmental monitoring: biomarker profiling in mussel plasma using protein chip array technology. *J. Tox. Env. Health. Part A*, 69(1-2), 77-96.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. *JoX*. 6(2).
- Brammell, B.F., Price, D.J., Birge, W.J., Elskus, A.A. (2013). Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: two varieties of resistance? *Comp. Biochem. Physiol. C*. 157, 212-219.
- Buckley, L. B., & Huey, R. B. (2016). Temperature extremes: geographic patterns, recent changes, and implications for organismal vulnerabilities. *Glob. Change Biol.* 22(12), 3829-3842.
- Cabral, H. N., Costa, M. J., & Salgado, J. P. (2001). Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes?. *Clim. Res.* 18(1-2), 119-126.
- Cabral, H. N., Vasconcelos, R., Vinagre, C., França, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., Freitas, V., Santos, P.T., & Costa, M.J. (2007). Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *J. Sea Res.* 57(2-3), 209-217.
- Calves, I., Lavergne, E., Meistertzheim, A. L., Charrier, G., Cabral, H., Guinand, B., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 472, 257-273.
- Cambier, S., Benard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brethes, D., & Bourdineaud, J. P. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell. B.* 41(4), 791-799.
- Campos-Garcia, J., Martinez, D. S. T., Alves, O. L., Leonardo, A. F. G., & Barbieri, E. (2015). Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish *Nile tilapia*: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 131-137.
- Capmourteres, V., & Anand, M. (2016). Assessing ecological integrity: A multi-scale structural and functional approach using Structural Equation Modeling. *Ecol. Indic.* 71, 258-269.

- Cardoso, P. G., Pardal, M. A., Lillebø, A. I., Ferreira, S. M., Raffaelli, D., & Marques, J. C. (2004). Dynamic changes in seagrass assemblages under eutrophication and implications for recovery. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302(2), 233-248.
- Carson, H. L. (1990). Increased genetic variance after a population bottleneck. *Trends Ecol. Evol.* 5(7), 228-230.
- Carvalho, G. R., & Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Review. *Fish Biol. Fish.* 4(3), 326-350.
- Carvalho, P. C., Yates III, J. R., & Barbosa, V. C. (2012). Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics*, 28(12), 1652-1654.
- Chaalali, A., Beaugrand, G., Boët, P., & Sautour, B. (2013). Climate-caused abrupt shifts in a European macrotidal estuary. *Estuar. Coast.* 36(6), 1193-1205.
- Chevolot, M., Ellis, J. R., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2008). Temporal changes in allele frequencies but stable genetic diversity over the past 40 years in the Irish Sea population of thornback ray, *Raja clavata*. *Heredity*. 101(2), 120.
- Chiantia, S., & London, E. (2013). Sphingolipids and membrane domains: recent advances. In *Sphingolipids: Basic Science and Drug Development* (pp. 33-55). Springer, Vienna.
- Chick, J. M., Kolippakkam, D., Nusinow, D. P., Zhai, B., Rad, R., Huttlin, E. L., & Gygi, S. P. (2015). An ultra-tolerant database search reveals that a myriad of modified peptides contributes to unassigned spectra in shotgun proteomics. *Nat. Biotechnol.* 33(7), 743.
- Chiffolleau, J.F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. Ifremer. Département Ressources Biologiques et Environnement, Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie. Octobre 2017 - RST.RBE-BE/2017.02, 1-72.
- Chin, A., Kyne P. M., Walker, T. I., McAuley, R. B. (2010). An integrated risk assessment for climate change: analyzing the vulnerability of sharks and rays on Australia's Great Barrier Reef. *Glob. Change Biol.* 16(7):1936-1953.
- Cohen, A., Gagnon, M. M., & Nuggetoda, D. (2005). Alterations of metabolic enzymes in Australian bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Con. Tox.* 49(2), 200-205.
- Conley, K. E., Kushmerick, M. J., & Jubrias, S. A. (1998). Glycolysis is independent of oxygenation state in stimulated human skeletal muscle in vivo. *J. Physiol.* 511(3), 935-945.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144(4), 2001-2014.
- Costa, S., Pardal, M., & Azeiteiro, U. (2013). The use of an estuarine system (Mondego estuary, Portugal) as didactic tool to incorporate education for sustainable development into school curricula. *JICZM*. 13, 243-251.
- Dando, P. R. (2011). Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 430, 183-196.
- Dawson, T. P., Jackson, S. T., House, J. I., Prentice, I. C., & Mace, G. M. (2011). Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. *Science*. 332(6025), 53-58.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase in two fish species. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131(3), 271-280.
- De Meeûs, T. (2012). Initiation à la génétique des populations naturelles: Applications aux parasites et à leurs vecteurs. IRD éditions.

- Déniel, C. (1981). Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez: reproduction, croissance et migration des *Bothidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* et *Soleidae*. Ecolofie, Environnement. Thèse - Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Desquirit, V. (2008). Mitochondrie et stress énergétique : voies de signalisation et adaptations cellulaires. Thèse - Université d'Angers.
- Devin, S., Giamberini, L., & Pain-Devin, S. (2014). Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environ. Int.* 73, 282-287.
- De Tonnac, A., Labussière, E., Vincent, A., & Mourot, J. (2016). Effect of α -linolenic acid and DHA intake on lipogenesis and gene expression involved in fatty acid metabolism in growing-finishing pigs. *Brit. J. Nutr.* 116(1), 7-18.
- Dhillon, R. S., & Schulte, P. M. (2011). Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *J. Exp. Biol.* 214(21), 3639-3648.
- Di Pardo, A., & Maglione, V. (2018). Sphingolipid metabolism: a new therapeutic opportunity for brain degenerative disorders. *Front. Neurosci.* 12, 249.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14(1), 209-214.
- Dolbeth, M., Pardal, M. A., Lillebø, A. I., Azeiteiro, U., & Marques, J. C. (2003). Short-and long-term effects of eutrophication on the secondary production of an intertidal macrobenthic community. *Mar. Biol.* 143(6), 1229-1238.
- Dolbeth, M., Martinho, F., Freitas, V., Costa-Dias, S., Campos, J., & Pardal, M. Â. (2011). Multi-year comparisons of fish recruitment, growth and production in two drought-affected Iberian estuaries. *Mar. Freshwater Res.* 61(12), 1399-1415.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29(8), 1969-1973.
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., Krück, N.C., Morgan, J.A.T., Tillett, B.J., & Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *J. Fish Biol.* 80(5), 1789-1843.
- Duhamel, S., Feunteun, E., Cerisier, S., Bacq, N., De Roton, G., Mayot, S., Gouneau, N., Lefrançois, T., Berno, A., Balay, P. (2012). *Projet ICHTYO : Structuration spatio-temporelle des assemblages d'espèces de poissons dans l'estuaire de la Seine. État actuel et incidences du paysage aquatique sur la fonctionnalité des habitats. Projet Seine-Aval 4, 30p. et annexes.*
- Dulvy, N. K., Sadovy, Y., & Reynolds, J. D. (2003). Extinction vulnerability in marine populations. *Fish Fish.* 4(1), 25-64.
- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., & Laroche, J. (2015). Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar. Pollut. Bull.* 95(2), 634-645.
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Lougheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17(5), 1170-1188.
- Elliott, M., & Whitfield, A. K. (2011). Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 94(4), 306-314.

- Ellis, J. I., Hewitt, J. E., Clark, D., Taiapa, C., Patterson, M., Sinner, J., D., Hardy & Thrush, S. F. (2015). Assessing ecological community health in coastal estuarine systems impacted by multiple stressors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 473, 176-187.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2006). Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comp. Biochem. Phys. A.* 145(1), 73-81.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J. M., Adriamanga, M., & Guyomard, R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.* 7(3), 339-353.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., & Laroche, J. (2010). Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers.* 15(2), 111-127.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Cachot, J., Charrier, G., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environ. Science Pollut. Res.* 20(2), 676-689.
- Falconer, DC. (1989). Introduction to quantitative genetics. 3rd ed. New York: Longman Scientific & Technical with Wiley & Sons, Inc.
- Fangue, N. A., Richards, J. G., & Schulte, P. M. (2009). Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *J. Exp. Biol.* 212(4), 514-522.
- Fonslow, B. R., Moresco, J. J., Tu, P. G., Aalto, A. P., Pasquinelli, A. E., & Dillin, A. G. (2014). Mass spectrometry-based shotgun proteomic analysis of *C. elegans* protein complexes. *WormBook: the online review of C. elegans biology.* 1-18.
- Fornecker, L. M. (2016). Développements méthodologiques en analyse protéomique pour la découverte et la validation de biomarqueurs dans les hémopathies lymphoïdes B de l'adulte – Thèse - Strasbourg.
- França, S., Costa, M. J., & Cabral, H. N. (2009). Assessing habitat specific fish assemblages in estuaries along the Portuguese coast. *Estuar. Coast. Shelf S.* 83(1), 1-12.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol. Conserv.* 170, 56-63.
- Franklin, I. R. (1980). Evolutionary change in small populations. P. 135-150 in M.E. Soulé, B.A. Wilcox, editors. *Conservation Biology : An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.
- Freitas, V., Costa-Dias, S., Campos, J., Bio, A., Santos, P., & Antunes, C. (2009). Patterns in abundance and distribution of juvenile flounder, *Platichthys flesus*, in Minho estuary (NW Iberian Peninsula). *Aquat. Ecol.* 43(4), 1143.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J. Sea Res.* 75, 135-141.
- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2015). Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 95(2), 646-657.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse - Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

- Gauthier, C., Campbell, P. G., & Couture, P. (2008). Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Phys. A*. 151(4), 526-532.
- Gauthier, C., Campbell, P. G., & Couture, P. (2011). Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30(9), 2148-2156.
- Gilbert, K. J., & Whitlock, M. C. (2015). Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. *Evolution*. 69(8), 2154-2166.
- Glick, P., Stein, B. A., Edelson, N. A. editors. (2011). *Scanning the Conservation Horizon: A Guide to Climate Change Vulnerability Assessment*. National Wildlife federation, Washington DC. 168 pp.
- Gomes, T., Albergamo, A., Costa, R., Mondello, L., & Dugo, G. (2017). Potential use of proteomics in shellfish aquaculture : from assessment of environmental toxicity to evaluation of seafood quality and safety. *Curr. Org. Chem.* 21(5), 402-425.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chamot, A., Geffard, O., & Armengaud, J. (2018). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *J. Proteomics*. *In press*.
- Grant, W. S., & Waples, R. S. (2000). Spatial and temporal scales of genetic variability in marine and anadromous species: implications for fisheries oceanography. *Fisheries oceanography: an integrative approach to fisheries ecology and management*. 63-93.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P. G., Bernatchez, L., & Couture, P. (2014). Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71(11), 1635-1641.
- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P. G., Bernatchez, L., & Couture, P. (2016). Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324-332.
- Grilo, T. F., Cardoso, P. G., Dolbeth, M., Bordalo, M. D., & Pardal, M. A. (2011). Effects of extreme climate events on the macrobenthic communities' structure and functioning of a temperate estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 62(2), 303-311.
- Gunderson, A. R., Armstrong, E. J., & Stillman, J. H. (2016). Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 8, 357-378.
- Gunderson, A. R., King, E. E., Boyer, K., Tsukimura, B., & Stillman, J. H. (2017). Species as stressors: heterospecific interactions and the cellular stress response under global change. *Integr. Comp. Biol.* 57(1), 90-102.
- Gutstein, H. B., & Morris, J. S. (2007). Laser capture sampling and analytical issues in proteomics. *Expert Rev. Proteomic.* 4(5), 627-637.
- Hallett, C.S., Hobday, A.J., Tweedley, J.R., Thompson, P.A., McMahon, K., Valesini, F.J., (2017). Observed and predicted impacts of climate change on the estuaries of southwestern Australia, a Mediterranean climate region. *Reg. Environ. Change*. 18(5), 1357-1373.
- Halpern, B. S., Selkoe, K. A., Micheli, F., & Kappel, C. V. (2007). Evaluating and ranking the vulnerability of global marine ecosystems to anthropogenic threats. *Conserv. Biol.* 21(5), 1301-1315.
- Hampe, A., & Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol. Lett.* 8(5), 461-467.

- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(2), 139.
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281-296
- Hare, M. P., Nunney, L., Schwartz, M. K., Ruzzante, D. E., Burford, M., Waples, R. S., Ruegg, K., & Palstra, F. (2011). Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. *Conserv. Biol.* 25(3), 438-449.
- Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Thornber, C. S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* 9(2), 228-241.
- Harmon, L. J., & Braude, S. (2010). Conservation of small populations: effective population sizes, inbreeding, and the 50/500 rule. *An Introduction to Methods and Models. Ecol. Conserv. Biol.* 125-138.
- Hauser, L., & Carvalho, G. R. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish Fish.* 9(4), 333-362.
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E. E., Grønkjær, P., & Loeschcke, V. (2007). Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Mol. Ecol.* 16(15), 3104-3118.
- Hermant, M., Lobry, J., Bonhommeau, S., Poulard, J. C., & Le Pape, O. (2010). Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *J. Sea Res.* 64(1-2), 45-53.
- Hicks, D. A., Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2012). Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front. Physiol.* 3, 189.
- Hill, W. G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* 38(3), 209-216.
- Hoffmann, A. A., Merilä, J., & Kristensen, T. N. (2016). Heritability and evolvability of fitness and non fitness traits: lessons from livestock. *Evolution.* 70(8), 1770-1779.
- Hoffmann, A. A., Sgrò, C. M., & Kristensen, T. N. (2017). Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 32(7), 506-517.
- Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., & Seegmiller, J. E. (1951). The enzymatic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate. *J. Biol. Chem.* 193(1), 383-396.
- Hrobuchak, H. P., Ardasheva, A. P., Servello, D. P., Nolan, A. P., & Chan, J. P. (2017). The role of the sphingolipid metabolism pathway in healthy aging. *FASEB Journal.* 31(1_supplement), 935-4.
- Huang, Q., Xi, G., Alamdar, A., Zhang, J., & Shen, H. (2017). Comparative proteomic analysis reveals heart toxicity induced by chronic arsenic exposure in rats. *Environ. Pollut.* 229, 210-218.
- Hubert-Vincent, F. (2007). Diversité génétique et adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropisé. *Ifremer.* 39p.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A., Jess, M., & Williams, S. E. (2012). Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367(1596), 1665-1679.
- Hughes, B. B., Levey, M. D., Fountain, M. C., Carlisle, A. B., Chavez, F. P., & Gleason, M. G. (2015). Climate mediates hypoxic stress on fish diversity and nursery function at the land-sea interface. *P. Natl. Acad. Sci.* 201505815.

- Iverson, L. R., Schwartz, M. W., & Prasad, A. M. (2004). How fast and far might tree species migrate in the eastern United States due to climate change? *Global Ecol. Biogeogr.* 13(3), 209-219.
- Jayasundara, N., Fernando, P. W., Osterberg, J. S., Cammen, K. M., Schultz, T. F., & Di Giulio, R. T. (2017). Cost of tolerance: physiological consequences of evolved resistance to inhabit a polluted environment in teleost fish *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Sci. Tech.* 51(15), 8763-8772.
- Jackson, M. C., Loewen, C. J., Vinebrooke, R. D., & Chimimba, C. T. (2016). Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 22(1), 180-189.
- Jickells, T. D., Andrews, J. E., & Parkes, D. J. (2016). Direct and indirect effects of estuarine reclamation on nutrient and metal fluxes in the global coastal zone. *Aquat. Geochem.* 22(4), 337-348.
- Johnson, J. E., & Welch, D. J. (2009). Marine fisheries management in a changing climate: a review of vulnerability and future options. *Rev. Fish. Sci.* 18(1), 106-124.
- Kawecki, T. J. (2008). Adaptation to marginal habitats. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 321-342.
- Kazour, M., Jemaa, S., El Rakwe, M., Duflos, G., Hermabassiere, L., Dehaut, A., Le Bihanic, F., Cachot, J., Cornille, V., Khalef, R., Khalaf, G., & Amara, R. (2018). Juvenile fish caging as a tool for assessing microplastics contamination in estuarine fish nursery grounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-12.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., & Amara, R. (2012). Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquat. Toxicol.* 108, 130-140.
- Kooijman, S., (2010). Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Kopko, O., Dabrowska, H. (2018). Variability of biological indices, biomarkers, and organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) in the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. *Chemosphere.* 194, 701-713.
- Kratochwil, C. F., & Meyer, A. (2015). Closing the genotype–phenotype gap: Emerging technologies for evolutionary genetics in ecological model vertebrate systems. *BioEssays.* 37(2), 213-226.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(3), 236-246.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F. (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers.* 1(1): 21-28.
- Lande, R. (1995). Mutation and conservation. *Conserv. Biol.* 9(4), 782-791.
- Lapointe, D., & Couture, P. (2010). Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotox. Environ. Safe.* 73(4), 572-578.
- Larmuseau, M. H., Van Houdt, J. K., Guelinckx, J., Hellemans, B., & Volckaert, F. A. (2009). Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *J. Biogeogr.* 36(6), 1138-1151.
- Larmuseau, M. H. D., Raeymaekers, J. A. M., Hellemans, B., Van Houdt, J. K. J., & Volckaert, F. A. M. (2010). Mito-nuclear discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. *Heredity.* 105(6), 532.

- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., & Moraga, D. (2002). Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(12), 2705-2712.
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M.H., & Budzinski, H. (2013). Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(2), 738-748.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C., & Laroche, J. (2015). Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Pollut. Bull.* 95(2), 658-664.
- Ledoux, J. B., Aurelle, D., Bensoussan, N., Marschal, C., Féral, J. P., & Garrabou, J. (2015). Potential for adaptive evolution at species range margins: contrasting interactions between red coral populations and their environment in a changing ocean. *Ecol. Evol.* 5(6), 1178-1192.
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., & Désaunay, Y. (2007). Convergent signs of degradation in both the capacity and the quality of an essential fish habitat: state of the Seine estuary (France) flatfish nurseries. *Hydrobiologia.* 588(1), 225-229.
- Li, J., & Xie, X. (2018). Inconsistent responses of liver mitochondria metabolism and standard metabolism in *Silurus meridionalis* when exposed to waterborne cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 214, 17-22.
- Lima, F. P., Ribeiro, P. A., Queiroz, N., Hawkins, S. J., & Santos, A. M. (2007). Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern? *Glob. Change Biol.* 13(12), 2592-2604.
- Lin, H. D., Hsu, L. S., Chien, C. C., & Chen, S. C. (2018). Proteomic analysis of ametryn toxicity in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol.* 33(5), 579-586.
- Liu, S. (2014). Analyse protéomique ciblée à haute résolution: un outil puissant pour le diagnostic clinique à partir de prélèvements de tissus amyloïdes bruts. Thèse - Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12(1), 228-237.
- Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 151(3), 1211-1216.
- Luo, L., Zhang, Q., Kong, X., Huang, H., & Ke, C. (2017). Differential effects of bisphenol A toxicity on oyster (*Crassostrea angulata*) gonads as revealed by label-free quantitative proteomics. *Chemosphere.* 176, 305-314.
- Maes, V. (2014). Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires. Thèse - Reims.
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., & Moraga, D. (2003). Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260, 273-284.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70(4), 327-343.

- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., & Laroche, J. (2010). Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Mar. Environ. Res.* 70(2), 201-209.
- Marchand, J., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *JoX.* 3(1S), 14.
- Marques, J. C., Pardal, M. A., Nielsen, S. N., & Jorgensen, S. E. (1997). Analysis of the properties of exergy and biodiversity along an estuarine gradient of eutrophication. *Ecol. Model.* (102), 155-167.
- Marques, S. C., Azeiteiro, U. M., Martinho, F., & Pardal, M. Â. (2007). Climate variability and planktonic communities: the effect of an extreme event (severe drought) in a southern European estuary. *Estuar. Coast. Shelf S.* 73(3-4), 725-734.
- Martinho, F., Leitão, R., Viegas, I., Dolbeth, M., Neto, J. M., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2007). The influence of an extreme drought event in the fish community of a southern Europe temperate estuary. *Estuar. Coast. Shelf S.* 75(4), 537-546.
- Martinho, F., Dolbeth, M., Viegas, I., Teixeira, C. M., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2009). Environmental effects on the recruitment variability of nursery species. *Estuar. Coast. Shelf S.* 83(4), 460-468.
- Martinho, F., Dolbeth, M., Viegas, I., Baptista, J., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2010). Does the flatfish community of the Mondego estuary (Portugal) reflect environmental changes? *J. Appl. Ichthyol.* 26(6), 843-852.
- Martinho, F., van der Veer, H. W., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2013). Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): a latitudinal approach. *J. Sea Res.* 84, 61-69.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32(8), 595-603.
- McCoy, R. C., Garud, N. R., Kelley, J. L., Boggs, C. L., & Petrov, D. A. (2014). Genomic inference accurately predicts the timing and severity of a recent bottleneck in a non model insect population. *Mol. Ecol.* 23(1), 136-150.
- McKenzie, D. J., Axelsson, M., Chabot, D., Claireaux, G., Cooke, S. J., Corner, R. A., De Boeck, G., Domenici, P., Guerreiro P.M., Hamer, B., Jørgensen, C., Killen S.S., Lefevre, S., Marras, S., Michælidis, B., Nilsson, G.E., Peck, M.A., Perez-Ruzafa, A., Rijnsdorp, A.D., Shiels, H.A., Steffensen, J.F., Svendsen, J.C., Svendsen, M.B.B., Teal, L.R., Van der Meer, J., Wang, T., Wilson, J.M., Wilson, R.W., & Metcalfe, J.D. (2016). Conservation physiology of marine fishes: state of the art and prospects for policy. *Conserv. Physiol.* 4(1).
- Ménesguen, A., Aminot, A., Belin, C., Chapelle, A., Guillaud, J. F., Joanny, M., Lefebvre, A., Merceron, M., Piriou, J.-Y., & Souchu, P. (2001). L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER DEL/EC/01.02 pour la commission Européenne – DG.ENV.B1. Brest, France.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144-148.
- Monsinjon, T., & Knigge, T. (2007). Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics.* 7(16), 2997-3009.

- Moore, J. W., & Olden, J. D. (2017). Response diversity, nonnative species, and disassembly rules buffer freshwater ecosystem processes from anthropogenic change. *Glob. Change Biol.* 23(5), 1871-1880.
- Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., & Antunes, C. (2011). The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (*Pleuronectidae*, *Pisces*) at the southern limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *J. Sea Res.* 65(2), 235-246.
- Morin, J., Le Pape, O., Amara, R., Mahé, K., & Gilliers, C. (2005). Identification des habitats essentiels de nourriceries de poissons à partir d'indicateurs faunistiques: Qualité de ces habitats pour les juvéniles de soles en estuaire de Seine. Rapport final Seine Aval.
- Morrison, W. E., Nelson, M. W., Howard, J. F., Teeters, E. J., Hare, J. A., Griffis, R. B., J.D., Scott, & Alexander, M. A. (2015). Methodology for assessing the vulnerability of marine fish and shellfish species to a changing climate. NOAA Technical Memorandum NMFS-OSF-3. US Department of Commerce, 48p.
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1-10.
- Nyitrai, D., Martinho, F., Dolbeth, M., Baptista, J., & Pardal, M. A. (2012). Trends in estuarine fish assemblages facing different environmental conditions: combining diversity with functional attributes. *Aquat. Ecol.* 46(2), 201-214.
- Pardal, M. A., Marques, J. C., Metelo, I., Lillebø, A. I., & Flindt, M. R. (2000). Impact of eutrophication on the life cycle, population dynamics and production of *Ampithoe valida* (Amphipoda) along an estuarine spatial gradient (Mondego estuary, Portugal). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 196, 207-219.
- Pardal, M. A., Cardoso, P. G., Sousa, J. P., Marques, J. C., & Raffaelli, D. (2004). Assessing environmental quality: a novel approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 267, 1-8.
- Pédrón, N., Morvezen, R., Le Moan, A., Guinand, B., Zambonino-Infante, J. L., Laroche, J., & Charrier, G. (2015). New set of candidate gene SNPs and microsatellites to disentangle selective and neutral processes shaping population responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to anthropogenic stress and contrasted environments. *Conserv. Genet. Res.* 7(4), 823-826.
- Pédrón, N. (2016). Structure génétique, réponses bioénergétiques et traits de vie, de populations de flets (*Platichthys flesus*) soumises au réchauffement climatique, sur un gradient latitudinal. Thèse - Université de Bretagne occidentale, Brest.
- Pédrón, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J. (2017a). Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: Differential sensitivities of populations. *Sci. Total Environ.* 586, 890-899.
- Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J. L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V.F., Le Grand, F., & Laroche, J. (2017b). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 129, 258-267.
- Pelletier, D., Dutil, J. D., Blier, P., & Guderley, H. (1994). Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B.* 164(3), 179-190.
- Pible, O., & Armengaud, J. (2015). Improving the quality of genome, protein sequence, and taxonomy databases: A prerequisite for microbiome meta-omics 2.0. *Proteomics.* 15(20), 3418-3423.
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44(4), 655-667.
- Pike, L. J. (2009). The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50(Supplement), S323-S328.

- Plenty, S. J., Tweedley, J. R., Bird, D. J., Newton, L., Warwick, R. M., Henderson, P. A., Hall, N.G., & Potter, I. C. (2018). Long-term annual and monthly changes in mysids and caridean decapods in a macrotidal estuarine environment in relation to climate change and pollution. *J. Sea Res.* 137, 35-46.
- Poisson, E. (2011). Effets de la contamination chimique: des organismes en danger ? Fascicule Seine-Aval 2, Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval. 1-69.
- Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*. 315(5808), 95-97.
- Pörtner, H. O., Bock, C., Knust, R., Lannig, G., Lucassen, M., Mark, F. C., & Sartoris, F. J. (2008). Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Clim. Res.* 37(2-3), 253-270.
- Pörtner, H. O., & Peck, M. A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J. Fish Biol.* 77(8), 1745-1779.
- Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *P. Nutr. Soc.* 58(4), 1025-1033.
- Pudovkin, A. I., Zaykin, D. V., & Hedgecock, D. (1996). On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*. 144(1), 383-387.
- Pujolar, J. M., Bevacqua, D., Capoccioni, F., Ciccotti, E., De Leo, G. A., & Zane, L. (2011). No apparent genetic bottleneck in the demographically declining European eel using molecular genetics and forward-time simulations. *Conserv. Genet.* 12(3), 813-825.
- Rajotte, J. W., & Couture, P. (2002). Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59(8), 1296-1304.
- Ramos, S., Ré, P., & Bordalo, A. A. (2010). Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *J. Sea Res.* 64(4), 473-486.
- Reed, D. H., & Bryant, E. H. (2000). Experimental test of minimum viable population size. *Anim. Conserv.* 3, 7-14.
- Reis-Santos, P., Tanner, S. E., Aboim, M. A., Vasconcelos, R. P., Laroche, J., Charrier, G., Pérez, M., Presa, P., Gillanders, B.M., & Cabral, H. N. (2018). Reconciling differences in natural tags to infer demographic and genetic connectivity in marine fish populations. *Sci. Rep.- UK.* 8(1), 10343.
- Reusch, T. B. (2013). Climate change in the oceans: evolutionary versus phenotypically plastic responses of marine animals and plants. *Evol. Appl.* 7(1), 104-122.
- Rijnsdorp, A. D., Peck, M. A., Engelhard, G. H., Möllmann, C., & Pinnegar, J. K. (2009). Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES J. Mar. Sci.* 66(7), 1570-1583.
- Robertson, A. (1965). The interpretation of genotypic ratios in domestic animal populations. *Anim. Sci.* 7(3), 319-324.
- Robins, P.E., Skov, M.W., Lewis, M.J., Giménez, L., Davies, A.G., Malham, S.K., Neill, S.P., McDonald, J.E., Whitton, T.A., Jackson, S.E., Jago, C.F., 2016. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 169, 119-135.
- Rosa, R., Marques, A., & Nunes, M. L. (2012). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Review. Aquaculture.* 4(3), 163-177.
- Selleslagh, J., & Amara, R. (2008). Environmental factors structuring fish composition and assemblages in a small macrotidal estuary (eastern English Channel). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 79(3), 507-517.

- Selleslagh, J., & Amara, R. (2015). Are estuarine fish opportunistic feeders? The case of a low anthropized nursery ground (the Canche Estuary, France). *Estuar. Coast.* 38(1), 252-267.
- Simmons, D. B., Benskin, J. P., Cosgrove, J. R., Duncker, B. P., Ekman, D. R., Martyniuk, C. J., & Sherry, J. P. (2015). Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 34(8), 1693-1704.
- Sinha, E., Michalak, A. M., & Balaji, V. (2017). Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes. *Science*. 357(6349), 405-408.
- Sinitcyn, P., Rudolph, J. D., & Cox, J. (2018). Computational methods for understanding mass spectrometry-based shotgun proteomics data. *Ann. Rev. Biomed. Data Sci.* 1, 207-234.
- Slatkin, M. (1996). In defense of founder-flush theories of speciation. *Am. Nat.* 147(4), 493-505.
- Smith, W. L., & Merrill, A. H. (2002). Sphingolipid metabolism and signaling minireview series. *J. Biol. Chem.* 277(29), 25841-25842.
- Smolders, R., Baillieul, M., & Blust, R. (2005). Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 73(2), 155-170.
- Sokolova, I. M., & Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37(2-3), 181-201.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1-15.
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53(4), 597-608.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *J. Exp. Biol.* 213(6), 912-920.
- Sommer, A. M., & Pörtner, H. O. (2002). Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina* : comparison of a North Sea and a White Sea population. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 240, 171-182.
- Spiegel, S., & Merrill Jr, A. H. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10(12), 1388-1397.
- Spincemaille, P., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2014). Sphingolipids and mitochondrial function, lessons learned from yeast. *Microb. Cell.* 1(7), 210.
- Steeves, T. E., Johnson, J. A., & Hale, M. L. (2017). Maximising evolutionary potential in functional proxies for extinct species: a conservation genetic perspective on de-extinction. *Funct. Ecol.* 31(5), 1032-1040.
- Sun, J., Wang, M. H., & Ho, Y. S. (2012). A historical review and bibliometric analysis of research on estuary pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 64(1), 13-21.
- Suresh, A., Sivaramakrishna, B., Victoriamma, P.C., Radhakrishnaiah, K. (1992). Comparative study of inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. *Biochem. Int.* 26(2): 367-375.
- Sylvestre, E. L., Lapointe, D., Dutil, J. D., & Guderley, H. (2007). Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua* L. *J. Comp. Physiol. B.* 177(4), 447-460.
- Teichert, N., Lepage, M., Sagouis, A., Borja, A., Chust, G., Ferreira, M. T., S., Pasquaud, R., Schinegger, P., Segurado, & Argillier, C. (2017). Functional redundancy and sensitivity of fish assemblages in European rivers, lakes and estuarine ecosystems. *Sci. Rep.* 7(1), 17611.

- Teixeira, V., & Costa, V. (2016). Unraveling the role of the Target of Rapamycin signaling in sphingolipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 61, 109-133.
- Thomas, C. D., Bodsworth, E. J., Wilson, R. J., Simmons, A. D., Davies, Z. G., Musche, M., & Conradt, L. (2001). Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature.* 411(6837), 577.
- Todgham, A. E., & Stillman, J. H. (2013). Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integr. Comp. Biol.* 53(4), 539-544.
- Trapp, J., Armengaud, J., Gaillard, J. C., Pible, O., Chaumot, A., & Geffard, O. (2016). High-throughput proteome dynamics for discovery of key proteins in sentinel species: unsuspected vitellogenins diversity in the crustacean *Gammarus fossarum*. *J. Proteomics*, 146, 207-214.
- Travis, J. M. J., & Dytham, C. (2004). A method for simulating patterns of habitat availability at static and dynamic range margins. *Oikos.* 410-416.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., & dos Reis Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci. Tot. Environ.*, 586, 598-609.
- Vitalis, R. (2001). Génétique des populations subdivisées: théorie et applications. Thèse - Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, G. (2001). A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Geronto.* 36, 1349-1359.
- Wang, J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics.* 166(4), 1963-1979.
- Wang, J. (2009). A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Mol. Ecol.* 18(10), 2148-2164.
- Wang, J. (2016). A comparison of single-sample estimators of effective population sizes from genetic marker data. *Mol. Ecol.* 25(19), 4692-4711.
- Waples, R. S. (1991). Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. Report of the International Whaling Commission (special issue). 13, 279-300.
- Waples, R. S. (2016). Making sense of genetic estimates of effective population size. *Mol. Ecol.* 25(19), 4689-4691.
- Wen, B., Jin, S. R., Chen, Z. Z., & Gao, J. Z. (2018). Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. *Sci. Total Environ.* 640, 1372-1381.
- Wepener, V., 2013. Active biomonitoring. In: Féraud, J., Claise, C. (Eds.), *Enc. Aquat. Ecotox.* Springer.
- Whitfield, A. K., & Elliott, M. (2002). Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *J. Fish Biol.* 61, 229-250.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S. (2004). Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc. Biol. Soc. Biol. Sci.* 271, S360-S363.
- Willi, Y., Van Buskirk, J., Schmid, B., & Fischer, M. (2007). Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift and selection. *J. Evolution. Biol.* 20(2), 534-542.
- Williams, S. E., Shoo, L. P., Isaac, J. L., Hoffmann, A. A., & Langham, G. (2008). Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLOS Biol.* 6(12), e325.

Bibliographie

- Willmer, P., Stone, G., & Johnston, I. (2009). *Environmental physiology of animals*. John Wiley & Sons.
- Wolanski, E., & Elliott, M. (2015). *Estuarine ecohydrology: an introduction*. Elsevier.
- Yang, Y., Liu, W., Li, D., Qian, L., Fu, B., & Wang, C. (2017). Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide. *Chemosphere*. 183, 89-96.
- Young, M. M., Kester, M., & Wang, H. G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid Res*. 54(1), 5-19.
- Zhang, Z., Apse, K., Pang, J., & Stanton, R. C. (2000). High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 275(51), 40042-40047.
- Zhang, P., Zhang, L., Li, Y., Zhu, S., Zhao, M., Ding, S., & Li, J. (2017). Quantitative Proteomic Analysis To Identify Differentially Expressed Proteins in Myocardium of Epilepsy Using iTRAQ Coupled with Nano-LC-MS/MS. *J. Proteome Res*. 17(1), 305-314.
- Zhdanova, O. L., & Pudovkin, A. I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. *J. Hered*. 99(6), 694-695.

Titre : Vulnérabilité de populations de poisson (*Platichthys flesus*) face aux multistress en estuaires : une approche intégrative.

Mots clés : multistress, taille efficace, bioénergétique, protéomique, biomarqueurs, estuaires

Résumé : Le niveau de vulnérabilité de populations naturelles de flet a été abordé dans cette étude, par l'intégration des réponses du poisson aux niveaux moléculaire, individuel et populationnel. Une approche multi-estuaire est développée ; les réponses du flet sont ainsi mesurées dans des conditions contrastées (stress thermique : estuaire du Mondego ; stress chimique : estuaire de Seine ; faibles niveaux de stress : Baie de Douarnenez, estuaires de Vilaine et Canche).

Par une approche démo-génétique basée sur la variabilité des marqueurs microsatellites, nous avons mis en évidence une faible taille efficace de la population du Mondego située en limite Sud de l'aire de distribution, et donc caractérisée par un risque écologique élevé.

La population de Seine présente une faible variabilité interindividuelle dans l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (COII, 12S), qui pourrait expliquer son faible potentiel à résister au réchauffement climatique.

Cette population montre des signatures d'adaptation face au stress chimique (métabolisme énergétique élevé, gestion du stress oxydant, modification des phospholipides membranaires), engendrant probablement un coût physiologique fort (réduction des réserves énergétiques au niveau musculaire). La population de Seine présente donc un risque écologique élevé.

Enfin, un encagement de flet a été mené sur un mois en estuaire de Seine; les réponses du poisson analysées par protéomique shot-gun ont mis en évidence un gradient de pollution décroissant amont-aval, soit une estimation de l'état écologique du système à micro-échelle.

Cette thèse a identifié différents outils pertinents pour estimer le niveau de vulnérabilité de populations de flet, et pour explorer l'état écologique des écosystèmes estuariens.

Title : Vulnerability of flounder populations (*Platichthys flesus*) facing to multistress in estuaries: an integrative approach -

Keywords : multi-stress, effective size, bioenergetics, proteomics, biomarkers, estuaries

Abstract : The vulnerability level of natural flounder populations was assessed, integrating responses at the molecular, individual and population levels. A multi-estuary approach was carried out on the fish responses in contrasted environments (thermal stress: Mondego estuary; chemical stress: Seine estuary; moderately stressed systems: Bay of Douarnenez, Vilaine and Canche estuaries).

A demo-genetic approach, considering the variability of microsatellites, underlined a reduced effective size for the southern peripheral population of the Mondego estuary, thus characterized by a high ecological risk.

In the Seine population, a reduced interindividual variability was observed considering the expression levels of genes involved in bioenergetics (COII, 12S); this pattern could explain the reduced ability of this population to cope with another stress (ie thermal stress).

Signatures of adaptation to pollutants (high level of energetic metabolism, management of oxidative stress, modification of membrane phospholipids) were observed in the Seine, but could be very costly (reduced muscle energetic reserve). Thus, we consider that the Seine population is displaying a high ecological risk.

A one month fish caging experiment was conducted in the Seine estuary. Fish responses were analyzed by proteomic; they underlined a decreasing pollution gradient from upstream to downstream, and thus allowed to characterize the ecological status of the estuary at microscale.

This study highlighted pertinent tools for the assessment of flounder population vulnerability and for the exploration of the ecological status of estuarine systems.