

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ANNEXES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Les loups de mer.....	1
1.1.1 Potentiel halieutique et aquacole	3
1.1.2 Isolement reproducteur	6
1.2 Hybridation	10
1.2.1 Impacts de l'hybridation	10
1.3 Métabolisme énergétique.....	13
1.3.1 Généralités	13
1.3.1.1 Stress oxydant.....	17
1.3.1.2 Effet de la température.....	20
1.3.2 Fonctionnalité mitochondriale.....	21
1.4 Contexte et répercussions	24
1.5 Objectifs.....	28
CHAPITRE 2.....	30
A FIRST ASSESSMENT OF THE WOLFFISH HYBRID <i>ANARHICHAS MINOR</i> × <i>A. LUPUS</i> : CONSERVATION AND AQUACULTURE APPLICATIONS	30
2.1. Abstract.....	30
2.2. Introduction.....	30
2.3. Materials and methods.....	33
2.4. Results.....	36
2.5. Discussion.....	43
2.6. Acknowledgements.....	45
CHAPITRE 3.....	46
MTDNA DIVERGENCE AND MITOCHONDRIAL FUNCTIONS: INSIGHTS FROM HYBRIDIZATION OF <i>ANARHICHAS MINOR</i> AND <i>A. LUPUS</i>	46
3.1 Abstract.....	46
3.2 Introduction.....	47

3.3.	Materials and methods	51
3.3.1.	mtDNA sequence analysis	51
3.3.2.	Fish lines and rearing conditions	51
3.3.3.	Tissue preparation	52
3.3.4.	Physiological measurements	53
3.3.5.	Statistical analysis	54
3.4.	Results	55
3.4.1.	mtDNA divergence: ETS coding regions	55
3.4.2.	Protein content	57
3.4.3.	Mitochondrial functions	57
3.4.4.	Relationship between energy metabolism and oxidative stress	63
3.5.	Discussion	64
3.5.1.	Mitochondrial functions	64
3.5.2.	Oxidative stress management	67
3.6.	Acknowledgments	68
CHAPITRE 4		69
CONCLUSION GÉNÉRALE		69
4.1.	Bilan et avancement des connaissances	69
4.2.	Limites de l'étude et perspectives	71
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE		76
ANNEXES		99

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 2.1	37
------------------------	----

Egg diameter (mm), hatching rate (%), length of the incubation period (degree-days), weight (g), length (mm) and condition factor at hatching of pure strain and hybrid crosses of spotted wolffish based on three different families (mean \pm SD).

Table 2.2	40
------------------------	----

General linear model for weight, length, condition factor and survival rate for 2006 families (S1, SH1, SH2) at different age in DPH.

CHAPITRE 3

Table 3.1	54
------------------------	----

Substrates and buffer used for enzyme analysis.

Table 3.2	56
------------------------	----

Differences between the mitochondrial peptide-coding genes of Atlantic and spotted wolffish.

Table 3.3	62
------------------------	----

General linear model for enzymatic activities (CI-III, CIV, CS, LDH) and lipid peroxidation level (TBARS) for the three wolffish families.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1	2
Distribution du loup Atlantique (<i>Anarhichas lupus</i>), du loup tacheté (<i>Anarhichas minor</i>) et du loup à tête large (<i>Anarhichas denticulatus</i>) dans l'océan Atlantique Nord.	
Figure 1.2	14
Les trois étapes de la respiration cellulaire : 1) production d'acétyl-CoA, 2) oxydation de l'acétyl-CoA et 3) transfert d'électrons et phosphorylation oxydative.	
Figure 1.3	16
Système de transport des électrons dans la membrane interne mitochondriale.	
Figure 1.4	18
Contribution totale au statut de stress oxydant : fonctions antagonistes des molécules pro- et anti- oxydatives.	
Figure 1.5	19
Mécanisme de réactions en chaîne de la peroxydation des lipides par les radicaux libres.	

CHAPITRE 2

Figure 2.139

(a) Growth in weight (g) from hatching to 140 DPH of 2006 families. Inset shows their growth rate (GR, % day⁻¹) from 0 to 140 DPH. (b) Growth in weight (g) from hatching to 300 DPH of 2007 families. Inset shows their growth rate (GR, % day⁻¹) from 0 to 300 DPH.

Figure 2.241

Color pattern of (a) spotted wolffish (*A. minor*) (S3, 500 DPH), (b) *A. minor* × *A. lupus* hybrid, (SH3, 492 DPH), (c) *A. lupus* × *A. minor* hybrid, (AH2, 533 DPH) and (d) Atlantic wolffish (*A. lupus*) (A1, 479 DPH).

Figure 2.342

Factorial Correspondence Analysis (FCA) based on microsatellites genotyping.

CHAPITRE 3

Figure 3.159

Mean wet weight (g) of sampled fish of SH1 and SH2 (*A. minor* × *A. lupus*) and S1 (*A. minor*) families from 0 to 90 DPH (mean ± SE).

Figure 3.260

Enzymatic activities of (a) NADH dehydrogenase and cytochrome *bc*₁ combined (*CI-III*), (b) cytochrome *c* oxidase (*CIV*), (c) citrate synthase (*CS*), (d) lactate dehydrogenase (*LDH*), (e) the lipid peroxidation level (*TBARS*) and (f) the *CIV* to *CS* ratio (*CIV:CS*) among

wolffish families (SH1 and SH2, *A. minor* × *A. lupus*; S1, *A. minor*) from 0 to 90 DPH (mean ± SE).

Figure 3.364

Position of the vector-variables in the plan of the first two principal components (variance explained: 51.6 and 20.4 %).

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1	99
-----------------------	----

Représentation schématique d'une des deux unités du système en recirculation conçue par Aquabiotech Inc. (QC, Canada). L'unité est montrée en vue frontale.

Rapport-Gratuit.com

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNm ou *mtDNA*, ADN mitochondrial

ADNn ou *ndNA*, ADN nucléaire

ADP, Adénosine diphosphate

ATP, Adénosine triphosphate

COX, Cytochrome *c* oxydase

CS, Citrate synthase

DPH, Days post-hatching

ETS, Système de transport des électrons « *electron transport system* »

FAD, Flavine adénine dinucléotide

FADH₂, Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide (FAD)

LDH, Lactate déshydrogénase

NAD ou *NAD⁺*, Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH, Forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)

PAG ou *AFP*, Protéines antigels « *antifreeze protein* »

OXPHOS, Phosphorylation oxydative « *oxidative phosphorylation* »

ROS, Espèces réactives de l'oxygène « *reactive oxygen species* »

SNPs, Nucléotides polymorphes « *single nucleotide polymorphisms* »

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Les loups de mer

Les loups de mer (Anarhichadidae) sont des poissons marins démersaux et carnivores habitant les plateaux continentaux rocaillieux des océans nordiques (Scott & Scott, 1988). Le genre *Anarhichas* L. comprend quatre espèces : le loup de Béring (*Anarhichas orientalis* Pallas), le loup à tête large (*Anarhichas denticulatus* Krøyer), le loup Atlantique (*Anarhichas lupus* Linnaeus) et le loup tacheté (*Anarhichas minor* Olafsen). Les trois dernières espèces se retrouvent des deux côtés de l'océan Atlantique-Nord ainsi que dans les eaux arctiques (Scott & Scott, 1988) (Fig. 1.1). *A. lupus* a une répartition plus au sud et est retrouvé plus près des côtes à des profondeurs aussi faibles que 1-2 m (en moyenne entre 101 et 350 m) tandis que *A. minor* est confiné dans les aires nordiques où il fréquente les eaux profondes au-delà de 40 m (moyenne > 450m) (Barsukov, 1959, cité par Barsukov, 1972; Scott & Scott, 1988). Toutefois, malgré ces disparités, leurs aires de distribution se chevauchent à leurs extrêmes (Kulka *et al.*, 2007).

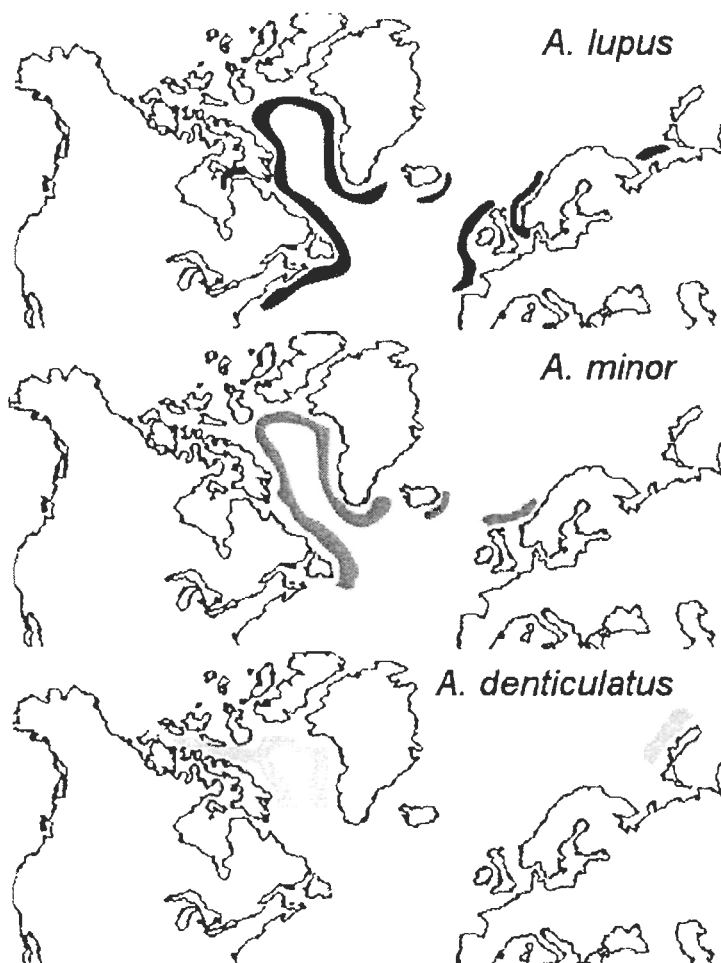


Figure 1.1 Distribution du loup Atlantique (*Anarhichas lupus*), du loup tacheté (*Anarhichas minor*) et du loup à tête large (*Anarhichas denticulatus*) dans l'océan Atlantique Nord (tirée de Johnstone *et al.* 2007)

Les indices d'abondance du loup de mer ont décliné de plus de 90 % dans les eaux atlantiques canadiennes depuis la fin des années 1970 jusqu'au début des années 1990, soit en deux générations. Conséquemment, *A. minor* et *A. denticulatus* sont devenus en 2001 les

premières espèces marines à être classées menacées par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC) (O’Dea & Haedrich 2001a; 2001b). *A. lupus* est toutefois dans la liste des espèces préoccupantes (O’Dea & Haedrich, 2000). Dans l’est du Canada, les trois espèces de loup de mer font d’ailleurs l’objet d’un plan de rétablissement (Kulka *et al.*, 2007) et des efforts de restauration seront potentiellement conduits sur les populations sauvages de l’estuaire du Saint-Laurent (QC, Canada) (Larocque *et al.*, 2008).

1.1.1 Potentiel halieutique et aquacole

L’absence de grandes concentrations de loup de mer qualifie leur pêche dans les eaux canadiennes d’accidentelle (Foss *et al.*, 2004; Johnstone *et al.*, 2007). Le loup à tête large, contrairement aux loups Atlantique et tacheté, n’est pas considéré comme une espèce commerciale (Templeman, 1984). Entre 2000 et 2002, 1 500 tonnes métriques ont été prélevées indirectement par les pêcheurs canadiens de crabes et de flétans. Dans l’Atlantique Nord-Ouest, les principaux acteurs de la pêche commerciale de loup de mer (Atlantique et tacheté) sont l’Islande et la Norvège où l’on a enregistré entre 1980 et 2003 des prises annuelles variant entre 2 100 et 16 300 tonnes (Foss *et al.*, 2004).

Depuis la dernière décennie, les loups de mer ont émergé comme des espèces à fort potentiel pour la diversification de l’aquaculture en eau froide (Moksness, 1994; Moksness & Pavlov, 1996; Falk-Petersen *et al.*, 1999; Le Francois *et al.*, 2002; Foss *et al.*, 2004). Au Québec plus spécifiquement, le développement et l’évaluation d’une technologie rentable visant la production et la culture commerciale d’une espèce de poissons marins est une

priorité pour dynamiser le secteur aquacole québécois. La mariculture au Québec étant basée à 95 % sur la moule bleue (*Mytilus edulis*), cette situation de monoculture représente d'importantes limitations à la croissance de ce secteur économique en présentant un niveau de vulnérabilité élevé (par ex. émergence de maladies dévastatrices, phénomènes climatiques, effondrement des marchés). La diversification a d'ailleurs été identifiée comme un gage de croissance et d'expansion dans l'industrie aquacole (Young *et al.*, 1999; Funge-Smith, 2001). Bien que des efforts soient toujours requis afin d'établir le loup de mer comme espèce commerciale, plusieurs des verrous technologiques identifiés ont été résolus par de récents efforts de recherche : la qualité des œufs (Desrosiers *et al.*, 2008a), la disponibilité en sperme (Le François *et al.*, 2008), l'élevage et la croissance des juvéniles (Imsland *et al.*, 2006; Savoie *et al.*, 2006; Savoie *et al.*, 2008), les technologies d'élevage (Imsland *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2007), la pertinence bioéconomique (Wilson *et al.* : <http://www.aquanet.ca/English/research/as3.php>) et la valorisation des sous-produits incluant l'évaluation du potentiel d'extraction de biomolécules telles que les protéines antigels (PAG) et les enzymes digestives (principalement la trypsine) (Le François *et al.*, 2004a; Desrosiers *et al.*, 2008b).

L'intérêt du loup de mer, en comparaison aux autres espèces marines telles que la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) ou le flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*), repose sur un fort taux de croissance à basse température en captivité, des techniques d'élevage simples, une tolérance aux hautes densités d'élevage, l'absence de

stade larvaire, une grande résistance aux maladies et une chair aux caractéristiques exceptionnelles (Falk-Petersen *et al.*, 1999; Hansen & Falk-Petersen, 2001; Foss *et al.*, 2004; Lamarre *et al.*, 2004; Tremblay-Bourgeois *et al.*, in prep). Comparativement au loup Atlantique, le loup tacheté démontre un meilleur taux de croissance à basse température, un rendement en chair accru, une maturité plus tardive, à plus grande taille et avec plus d'œufs par femelle et un comportement docile plus propice à la domestication (Moksness, 1994; Foss *et al.*, 2004). Par ailleurs, *A. lupus*, une espèce plus côtière, est soupçonné d'être plus robuste et tolérant aux fluctuations de température et de salinité que *A. minor* (Moksness & Pavlov, 1996). Ainsi, *A. lupus* serait adapté à des conditions de température et de salinité plus étendues, tandis que la capacité d'adaptation à ces variations serait plus faible chez *A. minor*, bien que ces espèces soient toutes deux très tolérantes à des salinités faibles et intermédiaires (< 14 ‰) (Foss *et al.*, 2001; Le François *et al.*, 2004b). Le stress engendré par les variations environnementales augmente la vulnérabilité des poissons aux maladies et diminue la performance chez les individus peu tolérants (Bartley *et al.*, 2001). De part leurs adaptations spécifiques, ces deux espèces démontrent par conséquent des préférences thermiques différentes (incubation, croissance, reproduction) de l'ordre de quelques degrés. Chez le loup Atlantique, les préférences thermiques sont plus élevées comparativement à celles du loup tacheté, avoisinant 10-11°C pour *A. lupus* et 7-8 °C pour *A. minor* au plan des performances de croissance dans la phase juvénile (McCarthy *et al.*, 1999; Foss *et al.*, 2004).

Une étude récente sur l'activité des PAG plasmatiques chez les adultes de loup de mer de *A. minor* et *A. lupus*, Desjardins *et al.* (2006), a révélé que *A. minor* avait des niveaux négligeables de PAG comparativement à *A. lupus*. Ces résultats augmentent l'intérêt économique du loup Atlantique tant pour son élevage en bassins qu'en cages marines (voir Desjardins *et al.*, 2007). Toutefois, considérant uniquement les critères de performances, le loup Atlantique est indéniablement surpassé par le loup tacheté (Moksness, 1994; Le François *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'intégration du concept de valorisation des sous-produits marins d'une production aquacole vient redéfinir l'idée de ce qu'est un bon candidat pour l'aquaculture. Les PAG font l'objet de recherches extensives ayant pour but de démontrer leur utilité dans divers champs d'application commerciale (Pham *et al.*, 1999; Amir *et al.*, 2004). Connaissant leur valeur au détail entre 1 000 et 5 000 \$ US par gramme, l'extraction de ces protéines peut donc significativement accroître la rentabilité de la culture du loup de mer (Desjardins *et al.*, 2007).

1.1.2 Isolement reproducteur

L'occurrence des hybrides de loup de mer en nature a été suggérée lors d'études de terrain dans les années 1950 et 1970 (Luhmann, 1954; Barsukov, 1972). Plus tard, Templeman (1986) a décrit des formes intermédiaires de loup de mer dans l'Atlantique Nord alors que récemment, Imsland *et al.*, (2008) ont également envisagé leur présence dans les eaux canadiennes basé sur une caractérisation génétique. Aucune information supplémentaire n'a été retrouvée dans la littérature sur l'hybridation des loups de mer.

L'isolement reproducteur permet de limiter les échanges de gènes entre deux populations ou espèces et dépend de types de mécanismes différents 1) l'isolation prézygotique, laquelle limite l'accouplement entre individus hétérospécifiques (par ex. comportement, écologie, période de reproduction, compatibilité des gamètes (Okamura *et al.*, 2004)) et 2) l'isolation postzygotique, laquelle limite la survie et la reproduction de la progéniture hybride (Edmands, 2002; Rosenfield & Kodric-Brown, 2003).

Peu d'informations sont disponibles sur la compatibilité gamétique des loups tacheté et Atlantique. Les deux sources potentielles d'incompatibilité des gamètes, chez un genre comme *Anarhichas* L. où différentes distributions thermique et latitudinale sont retrouvées, sont la tolérance thermique des gamètes et les facteurs inhibant la fécondation hétérospécifique (McClary & Sewell, 2003). Le sperme des téléostéens, contrairement aux autres taxons de poissons, n'a pas d'acrosome. Ceci est une adaptation fonctionnelle due à la présence d'un ou plusieurs micropyle(s) sur l'œuf qui permet(tent) le passage du spermatozoïde (Coward *et al.*, 2002). Bien que les œufs soient légèrement plus gros chez le loup tacheté, 5-6 mm comparativement à 4-5 mm de diamètre chez le loup Atlantique (Moksness & Pavlov, 1996; Falk-Peterson & Hansen, 2003), le diamètre respectif du puit extérieur de leur micropyle de même que du canal est semblable (10-14 μm pour le puit et 3-3.7 μm pour le canal) (Moksness & Pavlov, 1996; Pavlov & Moksness, 1996; Falk-Petersen & Hansen, 2003). Sachant que le diamètre moyen de la tête ovale des spermatozoïdes des deux espèces est approximativement de $0.7-1.5 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$

(Moksness & Pavlov, 1996; Pavlov *et al.*, 1997), la structure de leurs gamètes semble compatible. Certaines glycoprotéines situées dans la couche externe du chorion ont toutefois démontré chez le médaka (*Oryzias latipes*) (Iwamatsu *et al.*, 1997), les salmonidés et le hareng du Pacifique (*Clupea pallasii*) (Nordeide, 2007) une affinité spécifique pour les spermatozoïdes de l'espèce et sembleraient donc jouer un rôle clé dans le guidage du sperme jusqu'au micropyle (Coward *et al.*, 2002). Un échec dans la liaison du spermatozoïde à l'enveloppe vitelline de l'œuf peut donc prévenir la fécondation (Metz *et al.*, 1994). Cette barrière n'a pas encore été observée chez le loup de mer, mais pourrait possiblement limiter la fécondation lors de l'hybridation si celle-ci est spécifique à l'espèce. Les loups de mer appartiennent aux 2-3 % des téléostéens (environ 500 espèces) dont la fécondation est interne (Nelson, 1994, cité par Falk-Petersen & Hansen, 2003) et qui nécessite une activation du sperme par le liquide ovarien entourant les œufs (Kime & Tveiten, 2002). Il a donc été suggéré que le liquide ovarien puisse agir comme une barrière en affectant la motilité, la vitesse et le mouvement du sperme (Urbach *et al.*, 2005) Bien que la concentration spermatique soit la même chez *A. lupus* et *A. minor*, soit environ $5-70 \times 10^6$ sperme ml^{-1} (Tveiten & Johnsen, 1999), un type de sperme aura ainsi la possibilité de bien performer dans un certain type de liquide ovarien, alors qu'un autre performera faiblement dans le même environnement (Nordeide, 2007). En général, les barrières de fécondation sont plus faibles chez les espèces dont la séparation est récente (McCartney & Lessios, 2002). Chez le loup de mer, le temps de divergence entre les espèces du Nord-Atlantique est estimé à deux millions d'années, ce qui est considéré comme relativement

récent (Johnstone *et al.*, 2007). Ce temps de divergence correspond à peu près à celui estimé pour l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) pour lesquels on observe de fréquentes hybridations (Doiron *et al.*, 2002).

Il a également été démontré qu'il existe une migration sexuelle de faible amplitude vers les côtes chez les deux espèces à l'étude et que celle-ci se produit chez le loup Atlantique entre août et novembre (Keats *et al.*, 1985). La reproduction du loup tacheté en milieu naturel est moins bien connue, toutefois la capture de juvéniles ainsi que les connaissances acquises grâce à la recherche norvégienne orientée vers l'aquaculture confirment qu'elle se produirait au même moment (Falk-Petersen *et al.*, 1999).

La littérature semble donc suggérer que les barrières prézygotiques sont faibles entre *A. minor* et *A. lupus* : 1) les adultes de ces deux espèces sont trouvés dans des habitats similaires, 2) ils compétitionnent pour les mêmes ressources, 3) ont apparemment des aires et périodes de reproduction qui se chevauchent et 4) leur gamètes semblent compatibles. A priori, l'accouplement entre le loup tacheté et le loup Atlantique en captivité ne semblerait pas impossible. En milieu naturel, toutefois, d'autres facteurs contrôlant par exemple le choix du partenaire sexuel pourraient assurer l'isolement reproducteur (Palumbi, 1994; Harper & Hart, 2005), mais aucune information n'est, à ce jour, disponible en ce qui a trait aux loups de mer.

Les conséquences évolutives et biologiques de l'hybridation sont un sujet qui a suscité de nombreux débats et qui est extrêmement d'actualité autant dans un contexte d'optimisation et de diversification maricole, de conservation et protection d'espèces menacées que d'exploration des processus évolutifs.

1.2 Hybridation

Quatre forces évolutives agissent sur les organismes : la sélection naturelle, la dérive génétique, les mutations et le flux génétique. Le flux génétique se produit entre autres lors des échanges de gamètes entre les populations d'une même espèce. Lorsque ces échanges génétiques ont lieu entre des espèces différentes, il se produit alors de l'hybridation (Albert, 2005). Cette dernière constitue généralement une combinaison génétique accidentelle ou provoquée des gènes des deux espèces parentales (Lutz, 2001; Bartley *et al.*, 2001).

1.2.1 Impacts de l'hybridation

L'effet qu'aura l'hybridation est grandement influencé par les aptitudes, appelées *fitness* en anglais, des individus hybrides par rapport aux individus purs. L'hybridation peut donc entraîner la vigueur hybride ou la dépression de croisement selon les avantages ou inconvénients induits dans un environnement spécifique (revue par Edmands, 2002). La vigueur hybride est généralement causée par la dominance exercée par les allèles bénéfiques d'une espèce sur l'autre (surdominance ou l'avantage de l'hétérozygote), mais peut également impliquer une interaction favorable entre les gènes (épistasie positive) créant ainsi un phénotype mieux adapté (Lynch, 1991). À l'opposé, la dépression de

croisement peut résulter par de la sous-dominance (désavantage de l'hétérozygote) ou des interactions épistatiques négatives causées, par exemple, par la rupture de systèmes de gènes co-adaptés (Burke & Arnold, 2001). L'hybridation peut également mener à un bris d'adaptations locales en détruisant les combinaisons d'allèles sélectionnées pour un environnement spécifique (gène \times interactions environnementales) (Turelli & Orr, 2000). En général, le *fitness* de l'hybride pourra augmenter et possiblement surpasser celui des espèces parentales si la sélection assure la combinaison de gènes bénéfiques ou encore diminuer au fur et à mesure que la recombinaison détruira les liens fragiles unissant les gènes coadaptés, ce qui aura pour conséquence d'altérer la survie et le succès reproducteur de ce dernier. Ainsi, ces interactions peuvent évoluer substantiellement au cours des générations suite à la recombinaison (Ellison & Burton, 2008). De plus en plus d'études démontrent une supériorité des hybrides pour un caractère donné. Cependant, plusieurs autres démontrent une réduction du *fitness* chez certains hybrides (Rosenfield *et al.*, 2004; Ward, 2006).

L'augmentation de la diversité génétique et le renforcement de l'isolement reproductif sont quelques unes des conséquences possibles de l'hybridation sur l'évolution et la biologie des espèces (revu par Dowling & Secor, 1997). L'augmentation de la diversité génétique induite par le transfert de matériel génétique d'une espèce vers une autre peut permettre, entre autres, aux individus hybrides d'avoir un phénotype intermédiaire réunissant les caractères des deux parents. Par exemple, les croisements entre les carpes

Catla catla et *Labeo fimbriatus* génèrent des individus dont la tête est relativement petite, caractéristique de *L. fimbriatus*, alors que le corps est plutôt massif, caractéristique de *C. catla* (Basavaraju *et al.*, 1995). Un autre phénomène, appelé ségrégation transgressive, peut mener à la formation d'individus hybrides ayant des caractères phénotypiques extrêmes par rapport à ceux des individus purs (Rieseberg *et al.*, 1999). L'augmentation de la diversité génétique peut également permettre aux individus hybrides d'accéder à une niche écologique différente de celle de la souche parentale. C'est d'ailleurs ce que Lewontin & Birch (1966; cité par Albert, 2005) ont proposé pour expliquer les expansions de l'aire de répartition d'une espèce australienne de diptère (*Bactrocera tryoni*) vers des habitats où la température était normalement trop basse. Ce serait l'échange de gènes avec *B. neohumeralis* (plus tolérante aux basses températures) qui aurait permis à *B. tryoni* d'étendre son aire de répartition vers le sud. L'hybridation peut ainsi accélérer l'évolution en générant des variations adaptatives, de nouveaux complexes fonctionnels de gènes et même de nouvelles espèces (Seehausen, 2004). Le renforcement de l'isolement reproductif résulte d'une sélection contre les hybrides (Servedio, 2004). Ainsi, une bonne proportion d'individus stériles sont souvent engendrés suite à une hybridation. Stoumboudi *et al.* (1992; cité par Lutz, 2001) ont entre autres observé chez les hybrides de barbus *Barbus longiceps* et *Capoeta damascina* du lac Kinneret en Israël un développement incomplet des gonades femelles et mâles provoquant la stérilité chez tous les individus. La divergence entre les espèces parentales dans leur nombre de chromosomes ou leur structure mène à des contraintes d'appariement lors de la méiose et ainsi à une production anormale de gamètes,

ce qui est l'une des causes de la stérilité chez l'hybride (Campbell, 1995). L'incompatibilité génétique entre les deux espèces peut entraîner la non-viabilité de l'embryon. Quelques espèces de grenouilles du genre *Rana* s'hybrident occasionnellement entre elles. Cependant, leurs hybrides atteignent rarement la maturité et, le cas échéant, demeurent frêles (Campbell, 1995). Ceci semble agir de manière à prévenir la reproduction entre espèces divergentes (Servedio, 2004).

Une des explications de cette incompatibilité génétique pouvant affecter la viabilité de l'hybride de même que le transfert d'adaptations spécifiques à des environnements particuliers réside dans la fonctionnalité ou l'efficacité du métabolisme énergétique.

1.3 Métabolisme énergétique

1.3.1 Généralités

La respiration cellulaire est la voie catabolique la plus efficace pour extraire l'énergie emmagasinée dans les divers substrats métaboliques (glucose, acides gras, acides aminés). Elle est divisée en trois grandes étapes chacune composée de nombreuses réactions enzymatiques (Fig. 1.2).

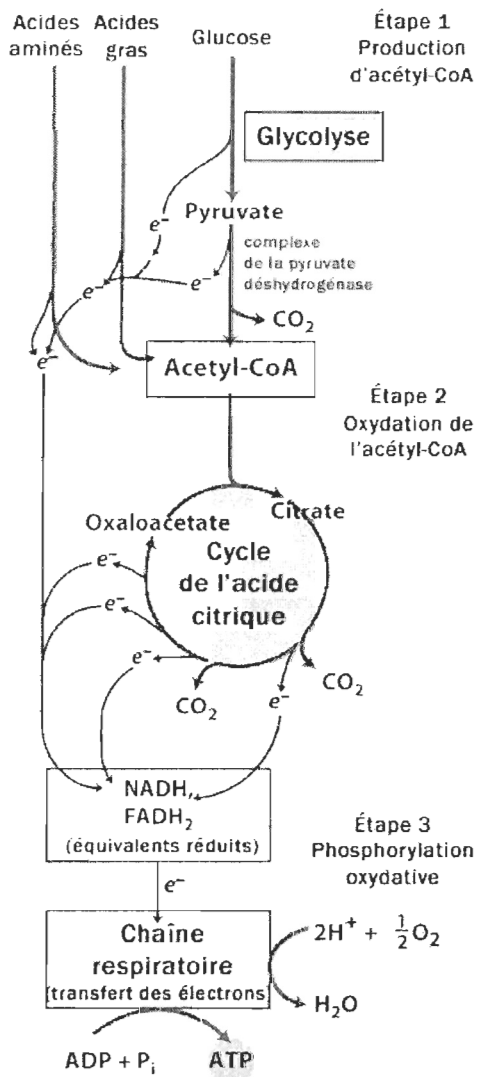


Figure 1.2 Les trois étapes de la respiration cellulaire : 1) production d'acétyl-CoA, 2) oxydation de l'acétyl-CoA et 3) transfert d'électrons et phosphorylation oxydative (traduit de Lehninger *et al.*, 2005).

Il y a d'abord convergence, vers le cycle de l'acide citrique, du produit des diverses voies métaboliques dégradant les substrats énergétiques (glycolyse, β -oxydation des acides gras et oxydation des acides aminés). La poursuite dans le cycle de l'acide citrique engendre une production de dioxyde de carbone et d'équivalents réduits, sous forme de NADH et de FADH₂. Ces équivalents réduits, également produits lors de la première étape, convergent à leur tour vers l'étape ultime de la respiration cellulaire : la phosphorylation oxydative qui a lieu dans la mitochondrie. Il y a alors transfert des électrons des équivalents réduits vers une série d'accepteurs d'électrons contenus dans quatre complexes protéiques situés dans la membrane interne mitochondriale. Ces réactions successives d'oxydoréduction se concluent par la réduction complète d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau. Ces complexes protéiques forment le système de transport des électrons (ETS) : le complexe I (CI, NADH déshydrogénase), le complexe II (CII, succinate déshydrogénase), le complexe III (CIII, cytochrome *bc*₁) et le complexe IV (CIV, cytochrome *c* oxydase) (Fig. 1.3). Le passage des électrons dans les complexes I, III et IV libère de l'énergie qui est utilisée, en grande partie, pour transporter des protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire. Peter Mitchell proposa en 1961 (Mitchell, 1961) que la différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale constituait le réservoir de l'énergie extraite par l'oxydation des substrats énergétiques. C'est l'énergie de ce gradient électrochimique qui permet la synthèse d'ATP lorsque les protons reviennent passivement dans la matrice en passant par un pore associé à l'ATP synthase, un cinquième complexe protéique (CV)

également lié à la membrane interne mitochondriale. Ainsi lors de la phosphorylation oxydative, l'énergie du transfert des électrons est en partie conservée pour générer une force capable de phosphoryler l'ADP en ATP (Lehninger *et al.*, 2005).

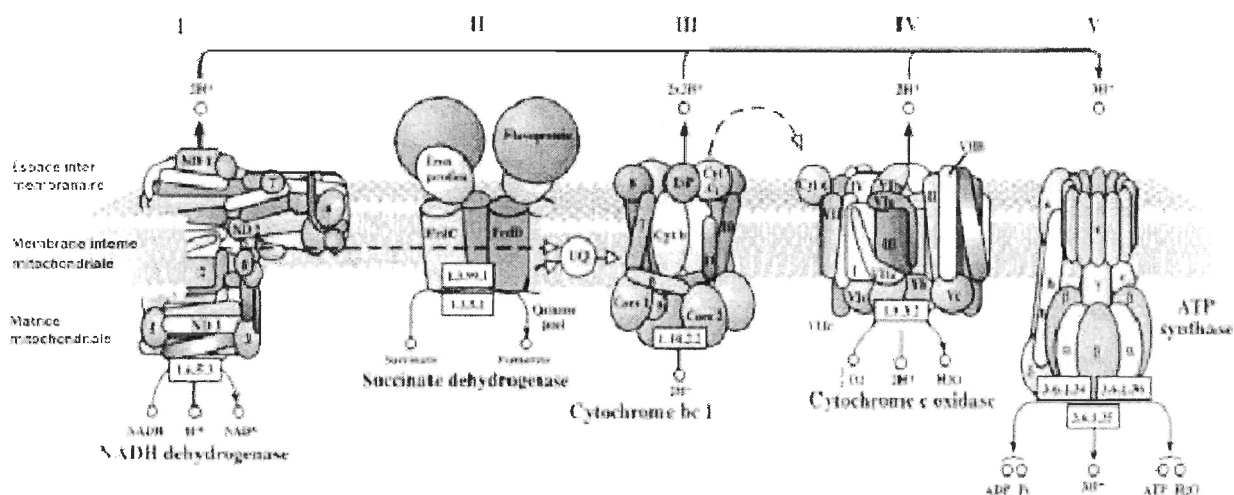


Figure 1.3 Système de transport des électrons dans la membrane interne mitochondriale (traduit de Mandavilli *et al.*, 2002).

Conservée ultimement sous forme d'ATP, l'énergie est transférée aux autres compartiments de la cellule où elle est couplée en travail cellulaire (p.ex. synthèse de biomolécules, transport actif de substances à travers les membranes cellulaires). La croissance est en partie dictée par la synthèse et la déposition de protéines qui nécessitent un apport suffisant en acides aminés provenant des processus de digestion et d'assimilation (Houlihan, *et al.*, 1995). Une limitation dans la capacité aérobie des tissus responsables de la synthèse des enzymes digestives ou de l'absorption des peptides et des acides aminés

(Blier *et al.*, 1997; Lemieux *et al.*, 2003) pourrait ainsi contraindre la croissance d'un organisme. Des études portant sur la morue ont montré de fortes corrélations entre le taux de croissance et l'activité de certaines enzymes mitochondriales dans le système digestif (citrate synthase, cytochrome *c* oxydase) (Pelletier *et al.*, 1993; Pelletier *et al.*, 1994; Couture *et al.*, 1998).

1.3.1.1 Stress oxydant

L'ETS est reconnu comme étant le principal producteur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette production se fait en grande partie au niveau des complexes I et III vers la face matricielle (Chen *et al.*, 2003). Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un ou des électron(s) non apparié(s) sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes (Beckman & Ames, 1998). Les ROS, eux, sont des radicaux libres mais dérivés de l'oxygène moléculaire. La réduction complète de l'oxygène (en tant qu'accepteur final de l'ETS) en deux molécules d'eau nécessite le gain de quatre électrons. Lors du passage des électrons vers l'accepteur final, il peut se produire des pertes et ainsi, des réductions partielles à un, deux ou trois électrons peuvent survenir ailleurs qu'au complexe IV. Les ROS sont considérés comme des sous-produits normaux du métabolisme aérobie. En fait, de 0.1 à 3 % de l'oxygène utilisé par la mitochondrie serait détourné vers la production de ROS (Beckman & Ames, 1998), lesquels sont utilisées dans plusieurs fonctions physiologiques importantes telles que l'apoptose, le développement, la prolifération cellulaire et les signaux de transduction

(Boveris & Cadenas, 2000; Turrens, 2003). Lorsque les conditions physiologiques sont normales, on observe un équilibre entre la formation des ROS et leur élimination. Il existe effectivement un important répertoire de molécules capables de contrer les effets néfastes liés aux ROS, telles que des enzymes et des molécules de faibles poids moléculaires, dérivées, pour la plupart, de l'alimentation. Un débalancement dans cet équilibre en faveur de la production des ROS engendre un état de stress cellulaire appelé le stress oxydant (Fig. 1.4). En excès, ces puissants agents oxydants peuvent donc altérer négativement la structure des divers constituants cellulaires.

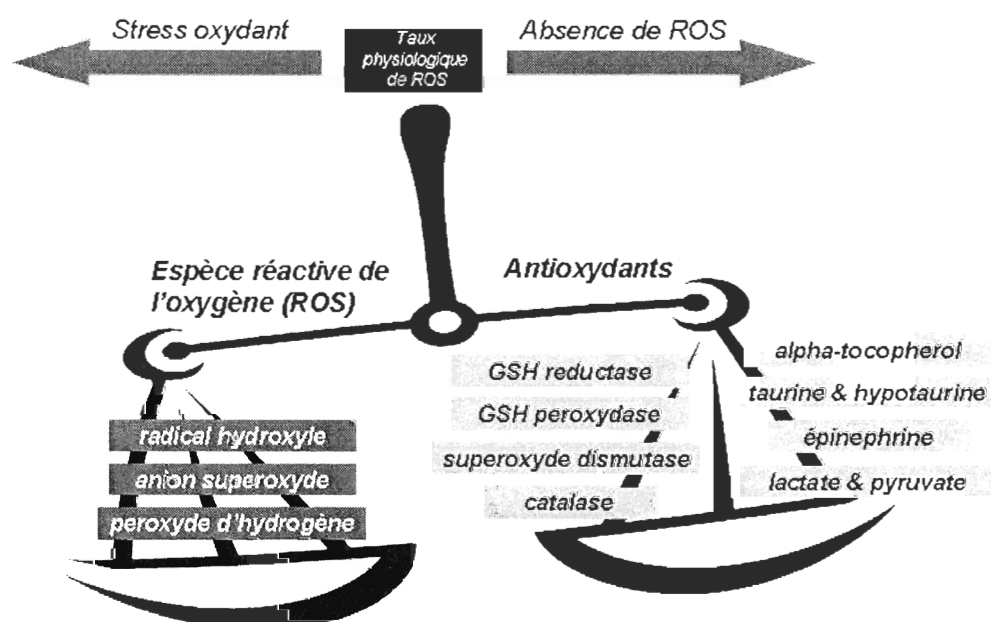


Figure 1.4 Contribution totale au statut de stress oxydant : fonctions antagonistes des molécules pro- et anti-oxydative (adapté et traduit de Garrido *et al.*, 2004).

Trois grandes classes de macromolécules biologiques sont susceptibles de subir des attaques oxydantes : les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Les acides gras polyinsaturés des lipoprotéines membranaires sont particulièrement sensibles à la peroxydation (Bokov *et al.*, 2004). Un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) attire l'électron d'un lipide insaturé voisin et forme ainsi deux radicaux, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et un radical alkyle. Ce dernier a alors la capacité d'interagir avec un autre radical, l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) et commence une autre chaîne de peroxydation lipidique. Ultimement, ces acides gras se retrouvent en aldéhydes insaturés (tels que le malondialdéhyde) qui agissent parfois comme mutagènes et inhibiteurs enzymatiques (Long *et al.*, 2006) (Fig. 1.5).

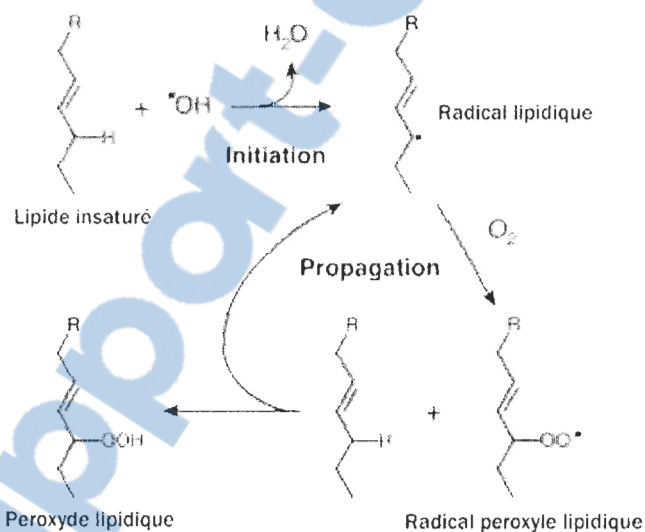


Figure 1.5 Mécanisme de réactions en chaîne de la peroxydation des lipides par les radicaux libres (tiré de Vickers *et al.*, 2001).

Les ROS créent ainsi un cercle vicieux (Beckman & Ames, 1998; Bokov *et al.*, 2004). Que ce soit en altérant les propriétés membranaires, la fonction catalytique des enzymes ou en induisant des mutations dans l'ADNmt, elles affecteront indirectement l'activité du système qui les a produites, a priori la chaîne de transport des électrons, ce qui fera augmenter leur production et ainsi de suite.

1.3.1.2 Effet de la température

La température est un facteur crucial qui affecte les processus physiologiques, particulièrement chez les ectothermes, lesquels ne régulent pas leur température corporelle (Angilletta *et al.*, 2004; Pörtner *et al.*, 2006). Chez les ectothermes, le métabolisme est directement dépendant de la température. Dans la gamme de températures à laquelle une espèce est adaptée, on observe habituellement une augmentation des capacités métaboliques avec une diminution de la température d'acclimatation (Guderley, 2004 ; Lucassen *et al.*, 2006). Dans ces conditions, le métabolisme des ROS est intimement lié au métabolisme aérobie (Abele *et al.*, 2002) et suit la même tendance. Ces ajustements du métabolisme aérobie, reflétés entre autres par la densité en mitochondries et leur capacité catalytique, sont une étape cruciale dans l'acclimatation thermique d'une espèce (Guderley, 2004). Il est d'ailleurs suggéré que ces ajustements diffèrent entre espèces eurythermes et sténothermes, la réponse physiologique étant plus grande chez les espèces plus tolérantes aux variations environnementales (Pörtner *et al.*, 2000; Pörtner, 2002).

Les différenciations génétiques entre les populations ou les espèces sont souvent associées à des variations phénotypiques. Une partie de cette variabilité est attribuable à la flexibilité phénotypique qui est la capacité des individus d'une même espèce à présenter des ajustements de leurs caractéristiques (par ex. morphologiques, physiologiques) en fonction de différentes conditions environnementales. Cette plasticité est reconnue comme un mécanisme adaptatif important à des changements écologiques à court terme. Ces réponses physiologiques pourront se répercuter évidemment sur la croissance et la viabilité d'un organisme. Plusieurs études ont d'ailleurs observé l'impact important de températures sub- et sus- optimales sur le taux de survie (Angilletta *et al.*, 2004). L'habilité d'un organisme à s'ajuster à son environnement peut être critique pour son succès, spécialement lorsque celui-ci est exposé à l'hétérogénéité des conditions environnementales (Pörtner *et al.*, 2006), par exemple lors de modifications marquées du climat ou de la dégradation de son habitat.

Le maintien de l'intégrité des fonctions cellulaires d'un organisme dépend ainsi fortement de l'efficacité de son métabolisme énergétique et cette dernière se retrouve inévitablement liée aux propriétés fonctionnelles et structurales de la mitochondrie.

1.3.2 Fonctionnalité mitochondriale

Il y a, chez la majorité des eucaryotes, deux génomes qui interagissent dans la gestion du métabolisme énergétique : le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Les protéines de la mitochondrie sont codées par ces deux génomes. Plusieurs de ces protéines

sont intégrées aux complexes de l'ETS et à l'ATP synthase. Par exemple, CI est formé de sept unités codées par l'ADNmt et 36 unités codées par l'ADNn; CIII, une et dix unités; CIV, trois et dix unités et l'ATP synthase, deux et 14 unités (Ballard, 2005). Les protéines de ces complexes, codées par chacun des génomes, s'assemblent avec une précision nanoscopique de sorte que ces deux génomes coévoluent de façon à co-adapter chacune des protéines (Blier *et al.*, 2001). Cette coévolution des génomes mitochondrial et nucléaire assure le maintien des propriétés fonctionnelles des différents complexes de l'ETS et celui de l'ATP synthase (Blier *et al.*, 2006).

Dans l'éventualité où l'un des deux génomes évoluerait de façon indépendante, la nature des interactions entre les deux pourrait être significativement perturbée. Ainsi, sachant que le génome nucléaire comprend le bagage génétique des deux parents, mais que le génome mitochondrial comprend uniquement le patrimoine génétique maternel (Griffiths *et al.*, 2002), les protéines mitochondriales de l'ETS et de l'ATP synthase codées par le génome d'un hybride pourraient ne pas être suffisamment co-adaptées (vu la divergence génétique des deux parents) et ainsi réduire l'efficacité métabolique de l'hybride et hypothéquer significativement son potentiel de survie. Dans une étude sur le copépode *Tigriopus californicus*, l'hybridation entre différentes populations allopatriques a induit non seulement une baisse du *fitness*, mais aussi une baisse significative de l'activité du système de transport des électrons (Ellison & Burton, 2006). En fait, seuls les complexes formés de sous-unités codées par les génomes nucléaires et mitochondriaux montraient une telle

diminution de leur activité. Des études précédentes indiquent qu'un bris des interactions entre les deux génomes est apparent seulement lorsqu'un certain degré de divergence est atteint. En créant des lignées cellulaires de xénocybrides mitochondriaux¹ composées d'un éventail de combinaisons d'ADN nucléaire et mitochondrial provenant d'espèces de muridés de plus en plus divergentes, l'étude de McKenzie *et al.* (2003) a démontré une augmentation des altérations des fonctions mitochondriales avec la distance phylogénétique. De plus, la récente étude de Blier *et al.* (2006) sur les fonctions mitochondriales chez un hybride entre l'omble chevalier et l'omble de fontaine (*S. alpinus* × *S. fontinalis*) suggère que le niveau de divergence entre ces espèces (659 SNPs sur des génomes mitochondriaux de 16 659 and 16 624 paires de bases respectivement (4,6 %) menant à 47 substitutions d'acides aminés (Doiron *et al.*, 2002)) est probablement trop modeste pour induire des bris de complexes coadaptés détectables par des pertes de fonctionnalités catalytiques. Les dysfonctions métaboliques peuvent ainsi poser une barrière d'isolation postzygotique intrinsèque pour les populations ou les espèces ayant de fortes divergences génétiques (Ellison & Burton, 2006). Conjointement, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) étant intimement liée à la fonctionnalité mitochondriale (Abele *et al.*, 2002), des altérations dans l'ETS pourraient résulter en une production accrue de ROS dans l'espace matriciel de la mitochondrie poussant l'hybride vers un état de stress oxydant.

¹ Cellule d'une espèce arborant l'ADN mitochondrial d'une autre espèce

La sensibilité thermique des enzymes de l'ETS peut également jouer un rôle important dans l'altération des propriétés fonctionnelles des mitochondries lors de changements de température chez les ectothermes (Blier *et al.*, 2001), ce qui laisse présumer des adaptations spécifiques des mitochondries à des environnements particuliers (Johnston *et al.*, 1994; Blier *et al.*, 2001; Blier *et al.*, 2006). Blier & Lemieux (2001) ont notamment suggéré que les adaptations fonctionnelles des mitochondries peuvent être associées avec les divers génotypes mitochondriaux et que les mitochondries de différentes espèces pourraient avoir des propriétés fonctionnelles différentes selon leur écologie et leur habitat.

1.4 Contexte et répercussions

Suite à des préoccupations liées à l'état de leur population dans les eaux côtières canadiennes, Johnstone *et al.* (2007) ont déterminé les relations phylogénétiques entre les génomes mitochondriaux du genre *Anarhichas*. Leur recherche a indiqué que *A. minor* et *A. lupus* sont les espèces de loup de mer les plus apparentées. Leur génome mitochondrial respectif comprend 16 520 et 16 519 paires de bases parmi lesquelles il n'y a que 283 nucléotides polymorphes (SNPs). Ces substitutions mènent à des remplacements en acides aminés et plusieurs de celles-ci ont été observées dans les gènes codant le système de transport des électrons (ETS) (Johnstone *et al.*, 2007). Considérant un nombre élevé de substitutions d'acides aminés entre les deux espèces et leurs effets possibles sur les propriétés structurales et fonctionnelles des peptides mitochondriaux, l'hybridation du loup

tacheté avec le loup Atlantique pourrait impliquer des dommages significatifs au plan de la fonctionnalité mitochondriale qui risqueraient de compromettre la viabilité des individus.

Toutefois, s'il s'avérait que le niveau de divergence entre *A. minor* et *A. lupus* ne soit pas suffisant pour impliquer des différences détectables au plan des capacités catalytiques ou régulatrices, le succès de l'hybridation de ces deux espèces aurait des conséquences importantes tant pour les populations naturelles que captives.

D'un côté, la communauté scientifique, concernée par le maintien de la diversité génétique et biologique, s'intéresse de plus en plus au phénomène d'hybridation accidentelle en milieu naturel (Rosenfield *et al.*, 2004; Ward, 2006). Plusieurs cas d'hybridation naturelle ont été rapportés (McClary & Sewell, 2003), et parmi ceux-ci, les hybridations de poissons représentent une proportion élevée (Turner, 1999). Les populations d'hybrides persistantes en milieu naturel résultent soit d'une constante migration de lignées parentales dans la zone d'hybridation (Turner, 1999; Rosenfield *et al.*, 2004) ou se maintiennent dans des zones marginales où la compétition des lignées parentales est diminuée ou absente (Rosenfield *et al.*, 2004). Verspoor & Hammar (1991) ont recensé 24 cas d'hybridation naturelle sur la base d'analyses moléculaires. Le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) et la truite brune (*Salmo trutta*) n'étaient pas connus pour s'hybrider jusqu'à récemment (Payne *et al.*, 1972). Une étude a démontré que 23 % de la population du genre *Salmo* dans une rivière de Suède était constituée d'hybrides (Jansson *et*

al., 1991). Au Québec, les distributions de l'omble de fontaine et de l'omble chevalier se chevauchent et des hybrides y sont fréquemment rapportés (Bernatchez *et al.*, 1995). Chez les espèces marines, les sébastes de l'Atlantique (*Sebastes mentella* et *Sebastes fasciatus*) constituent un autre exemple. Desrosiers *et al.* (1999) et Roques *et al.* (2001) ont démontré que ces deux espèces s'hybridaient et affichaient des traces d'introgression dans leur aire de distribution canadienne au niveau du chenal Laurentien (Golfe du Saint-Laurent, QC, Canada). Il est possible que cet échange de gènes avec une autre espèce se produise de façon suffisante pour faire en sorte qu'il n'existe plus d'individus purs. Cette situation a mené à l'extinction génétique de certaines populations de truites fardées (*Oncorhynchus clarki lewisi*) lesquelles s'hybridaient avec *O. mykiss* dans une rivière de Colombie-Britannique (Rubidge & Taylor, 2004). Cette extinction génétique causée par l'hybridation est d'autant plus importante lorsque les espèces impliquées sont rares (Albert, 2005). L'hybridation d'espèces menacées, telles que les loups de mer, est préoccupante et a possiblement d'importantes implications pour la gestion et la conservation des populations, car elle contribue à la modification d'une intégrité génétique unique et potentiellement au bris de phénotypes adaptés à leur environnement et à la diminution des capacités reproductrices.

D'un autre côté, depuis plusieurs décennies, l'industrie aquacole tire profit de la vigueur hybride (Paspatis *et al.*, 1999; Bartley *et al.*, 2001). L'hybridation fait l'objet d'études importantes depuis les années 1970, notamment chez les salmonidés (Refstie &

Gjedrem, 1975; Chevassus, 1979) (p.ex. *S. fontinalis* × *S. alpinus*, *O. mykiss* × *S. fontinalis* / *S. alpinus* / *S. namaycush* (Blanc *et al.*, 2000)). À ce jour, plus de 1000 variétés d'hybrides ont été produites avec succès, majoritairement chez des poissons d'eau douce (Wang & Xia, 2002). Les hybrides constituent d'ailleurs une part importante de la production aquacole de certains pays : par exemple, l'hybride de bar rayé (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) aux États-Unis, l'hybride de poisson-chat (*Clarias gariepus* × *C. macrocephalus*) en Thaïlande, l'hybride de tambaqui (*Colossoma macropomum* × *Piaractus brachypoma*) au Venezuela et l'hybride de tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) en Israël (Bartley *et al.*, 2001; Lutz, 2001). La production de juvéniles démontrant des caractéristiques supérieures à celles des espèces des lignées pures engendre des gains considérables dans les performances et la productivité, générant ainsi des gains notables pour les opérations aquacoles (Basavaraju *et al.*, 1995; Paspatis *et al.*, 1999; Bartley *et al.*, 2001). Plusieurs critères de performance peuvent être ciblés, comme le taux de croissance, la tolérance environnementale, la résistance aux maladies ainsi que la qualité de la chair (Basavaraju *et al.*, 1995; Paspatis *et al.*, 1999; Bartley *et al.*, 2001; Edmands, 2002). Le potentiel de pouvoir combiner les caractères désirables de chaque espèce est également un objectif courant (Lutz, 2001). Dans un contexte aquacole, l'inhibition partielle ou complète de la maturation sexuelle conférerait à l'hybride un potentiel de croissance plus grand en empêchant la canalisation de son énergie vers la reproduction (Bartley *et al.*, 2001). Cette caractéristique pourrait potentiellement limiter leur développement sexuel en leur conférant le statut d'individus stériles, ce qui offre, dans un contexte d'élevage terrestre, un meilleur

contrôle de la qualité des poissons produits et, pour un élevage en cages marines, une mesure de confinement sexuel en produisant des individus inaptes à la reproduction lors de possibles échappées accidentelles dans l'environnement naturel (Lutz, 2001).

En plus de ces avantages, le succès de l'hybridation du loup de mer en captivité pourrait permettre l'expression chez les hybrides de préférences thermiques plus proches de celles du loup Atlantique et de sa capacité accrue de synthèse des protéines antigels (PAG), ce qui permettrait respectivement une réduction des coûts de refroidissement durant l'été pour les installations d'élevage terrestres en région boréale ou nordique et une production à l'année dans les environnements où la température de l'eau peut descendre sous le point de congélation, caractéristiques des eaux côtières de l'est du Canada, de même qu'une possible valorisation de ce co-produit (voir Desjardins *et al.*, 2006; 2007). Le succès de l'hybridation du loup de mer en captivité s'inscrirait donc dans une optique d'optimisation des performances de croissance et de diversification maricole au Québec assurant l'atteinte du stade de commercialisation du loup de mer et l'émergence d'une activité économique rentable.

1.5 Objectifs

L'approche proposée par ce projet consiste en une étude préliminaire de l'impact de l'hybridation entre le loup tacheté et le loup Atlantique sur les performances et les fonctions mitochondriales des jeunes stades élevés aux températures optimales de croissance de chacune des deux espèces. La première partie de l'étude (Chapitre 2) : « A

first assessment of the wolffish hybrid *Anarhichas minor* × *A. lupus*: conservation and aquaculture applications » identifie génétiquement ces hybrides à l'aide de marqueurs microsatellites et examine leur développement au plan de leur morphologie, de leur croissance et de leur survie. Il est à noter que dans le cadre de ce chapitre, les résultats comparatifs concernant la température et la majorité de ceux sur le croisement hybride *A. lupus* × *A. minor* ont été omis, ces derniers n'étant pas assez puissants et robustes pour être présentés. Cette étude offre un aperçu du potentiel des hybrides de loup de mer dans une perspective d'élevage commercial et permet d'obtenir des informations de base essentielles pour la conservation et la protection des populations naturelles, lesquelles bonifient indéniablement le récent plan de rétablissement du loup de mer (voir Kulka *et al.*, 2007). La deuxième partie de l'étude (Chapitre 3): « mtDNA divergence and mitochondrial functions: insights from hybridization between *Anarhichas minor* and *A. lupus* » vise à quantifier les dommages physiologiques potentiels induits par l'hybridation de ces deux espèces et à interpréter ces résultats en terme d'évolution des mécanismes d'isolement reproducteur et de coévolution cyto-nucléaire.

CHAPITRE 2

A FIRST ASSESSMENT OF THE WOLFFISH HYBRID *ANARHICHAS MINOR* × *A. LUPUS*: CONSERVATION AND AQUACULTURE APPLICATIONS

2.1. Abstract

This is the first report of early-life developmental characteristics and genetic identification of the wolffish interspecific hybrid between *Anarhichas minor* and *A. lupus*, both endangered species in Canadian coastal water and of interest for cold-water aquaculture diversification.

2.2. Introduction

The Atlantic and spotted wolffish (*Anarhichas lupus* Linnaeus and *Anarhichas minor* Olafsen) are arctic-boreal bottom-dwelling species distributed in the North Atlantic Ocean. Due to severe declines in their abundance and biomass, they have been identified as threatened (*A. minor*) or of special concern (*A. lupus*) in Canadian coastal waters (O’Dea & Haedrich, 2000, 2001; Kulka *et al.*, 2002). Habitat degradation and by-catches are possible factors involved in wolffish population status (Collie *et al.*, 2000), as well as elevated temperatures during egg incubation or ovarian maturation (Tveiten *et al.*, 2001; Lamarre *et al.*, 2004) possibly caused by climatic changes occurring in the nordic environments and affecting marine fish species in the Northwest Atlantic (Guelpen *et al.*, 2005). Both species

are included in the recovery strategy recently proposed by Kulka *et al.* (2007) for the reestablishment of wolffishes in the east coast waters of Canada. They are also the focus of aquaculture research as they present an excellent potential for the diversification of cold-water aquaculture of northern Norway, eastern Canada (QC and NL) and Iceland (Le François *et al.*, 2002; Foss *et al.*, 2004).

Distributions of the spotted and the Atlantic wolffishes strongly overlap (Kulka *et al.*, 2007) suggesting some degree of competition for the same resources (i.e. feeding and habitat) (Scott & Scott, 1988). They also appear to share the same reproduction area and timing (Keats *et al.*, 1985; Falk-Petersen *et al.*, 1999). The available information, as well as the recent work of Le François *et al.* (2008), suggests a fair level of heterospecific gamete compatibility between these two species. In addition, Johnstone *et al.* (2007) determined phylogenetic relationships among mitochondrial genome of *Anarhichas* species and indicated that *A. minor* and *A. lupus* are each other's closest relative. As a consequence, a weak prezygotic isolation among those wolffish species is foreseeable and heterospecific mating in nature is in all probability occurring and could very well contribute to the observed decline of their natural populations. Based on morphological observations, the occurrence of wolffish hybrids in the wild has been suggested by Luhmann (1954). Later, Templeman (1986) described intermediate forms of wolffish (possibly *A. minor* × *Anarhichas denticulatus* Krøyer) in the North Atlantic Ocean, whereas Imsland *et al.*

(2008), based on population genetic structure investigations, suggest their possible presence in Canadian waters.

Hybridization can affect the fitness of inter-population and inter-specific hybrids (McClelland & Naish, 2007; Ellison & Burton, 2008) and in the case of small effective populations and endangered species, the evolutionary and biological consequences of hybridization e.g. increase in genetic diversity, reinforcement of reproductive isolation and genetic extinction (reviewed by Dowling & Secor, 1997) requires baseline information. This information might also be useful in an aquaculture context in which hybrids could considerably improve the economics of wolffish cultivation (see Desjardins *et al.*, 2007; see Gaudreau, 2008). Furthermore, in the eventuality of efforts for the restoration of the wild populations of the Saint-Lawrence estuary (QC, Canada) (see Larocque *et al.*, 2008), the assessment of available methods for identification of purebred wild fish specimens from the hybridized population is a valuable contribution (Meraner *et al.*, 2008).

Since not much more information can be found in the literature on wolffish hybridization, this paper proposes a first assessment of early-life developmental characteristics (i.e. color pattern, growth and survival) of *A. minor* × *A. lupus* hybrids produced under controlled conditions and their genotypic identification. Considering that phenotypic identification of hybrids can be difficult and unreliable (Kingston & Gwilliam, 2007), wolffish microsatellite markers could confirm their advantages in the detection of

wolffish hybrids, as suggested by McCusker *et al.* (2008), since genetic markers have been used in several studies for hybrid identification (Kingston & Gwilliam, 2007). This is the first report of wolffish hybrid production in captivity supported by genetic characterization.

2.3. Materials and methods

During two spawning seasons, 2005-2006 and 2006-2007, three ♀ *A. minor* × ♂ *A. lupus* hybrid families (SH1, SH2, SH3) and three pure *A. minor* families (S1, S2, S3) were produced by artificial fertilization (Moksness & Pavlov, 1996) by mating one or two male(s) per female. All families originated from wild captive broodstock of spotted and Atlantic wolffish (9-13 years old) held at the facilities of the Centre Aquacole Marin (QC, Canada). S3 and SH3 are conspecific and heterospecific crosses from the same female; other families are not related in any way. Fertilized eggs were incubated for approximately 1000 degree-days in modified Heath tray incubators at 6.0 ± 0.2 °C. Hatching occurred in January 2006 for S1, SH1 and SH2, and in January-February 2007 for S2, S3 and SH3. Hatching rate and the time (in degree-days) between fertilization and 50 % of hatched fry, was recorded for each family (i.e. length of the incubation period, LIP). Two ♀ *A. lupus* × ♂ *A. minor* hybrid families (AH1, AH2) and one *A. lupus* family (A1) were also produced (A1 and AH2 are half siblings), but were only briefly morphologically characterized.

Immediately after hatching, small-scale growth trials were conducted. Triplicates of 2006 families S1, SH2 and SH3 were reared in low water level units in a recirculating rearing system (Aquabiotech Inc., QC, Canada) at 8 °C for a period of 140 days post-hatch

(DPH) ($150 \times 3 = 450$ fish; temperature 8.1 ± 0.3 °C; salinity 30.0 ± 0.3 ; oxygen saturation 102.3 ± 6.8 %; pH 7.9 ± 0.2 ; nitrate level 0.187 ± 0.166 mg L⁻¹). Twenty fish per unit were weighed (wet weight, g) and measured (total length, cm) at 0, 10, 20, 35, 50, 70, 90, 120 and 140 DPH. In 2007, families S2, S3 and SH3 were reared without replication in flow-through low water level raceways (temperature 8.1 ± 1.2 °C; oxygen saturation 89.7 ± 4.4 %; salinity 29.8 ± 1.3) and their growth was monitored from 0 to 300 DPH. Fishes were fed enriched *Artemia* nauplii for the first two weeks post-hatching and weaned onto a marine fish feed formulae (Gemma Skretting Canada, N.-B., Canada). Condition factor (CF) was calculated using: $CF = 100 \cdot (W/L_T^3)$, where W is weight of the fish (g) and L_T is the total length (cm). Growth rates (GR) were calculated as follow: $GR (\% \text{ day}^{-1}) = (\ln W_{if} - \ln W_{ih}) / \text{experimental time in days} \cdot 100$, where W_{ih} is mean weight (g) of the fish at hatching and W_{if} is mean final weight of the fish.

Forty fish of the 2006 families (S1, SH1, SH2) at 140 DPH and 2007 families (S3, SH3, AH2, A1) at 479-533 DPH inclusively were subjected to a gross morphological characterization (i.e. color pattern, caudal and pectoral fins shape) from high-quality photographs taken using a DSC H50 digital camera (Sony Canada Ltd., ON, Canada).

Genotyping at seven microsatellite markers (*Alu7*, *Alu10*, *Alu23*, *Alu25*, *Alu26*, *Alu29* and *Alu31*) (McCusker *et al.*, 2008) was performed to confirm hybrid status of fish from SH1 and SH2 and to evaluate genetic differentiation between pure or hybrid fish.

DNA was extracted from adipose fins from parental species (*A. lupus*, n=10; *A. minor*, n=58) and from five newly-hatched fish from each family S1, SH1 and SH2 using the DNeasy DNA extraction kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Primers (5') were end labelled with HEX, FAM or TET dye. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were run on a TouchGene® Gradient thermal cycler (Techne, UK) in 15 µl reactions containing 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 8.3), 25 mM MgCl₂, 10 mM each dNTPs, 10 µM of each primer, 4 µl genomic DNA and 1 unit *Taq* Polymerase. Amplification conditions were the following: 3 min of denaturation at 94 °C; 20 cycles of the following: denaturing at 94 °C for 45 s, 55 °C (- 1 °C every 4 cycles) for *Alu10*, 23, 25, 26, and 29, 60 °C (- 1 °C every 4 cycles) for *Alu7* and 31 for 45 s and extension at 72 °C for 45 s; then 25 cycles of the following: 94 °C for 45 s, 50 °C for *Alu10*, 23, 25, 26, and 29, 55 °C for *Alu7* and 31 for 45 s and 72 °C for 45 s; followed by a final extension at 72 °C for 15 min. PCR products were electrophoresed on 6 % polyacrylamide gels and scanned with a FMBio III scanner (Hitachi Software Engineering America Ltd, CA, USA). Allele sizes in base pair (bp) were assigned using a CRX fluorescent ladder (Promega Corp., WI, USA). A factorial correspondence (AFC) analysis was performed using microsatellites genotypes using GENETIX software (Belkhir *et al.*, 1996). AFC graphically projects the individuals on the factor space defined by the similarity of their genotypes.

Statistical analyses were performed with SYSTAT (version 11.0, SPSS, 2004, Chicago, IL, USA). Independent sample T-Tests were used to test for possible differences

in egg diameter, hatching rate, LIP, weight, length and CF at hatching between purebred and hybrid crosses of spotted wolffish. Normality of data was tested using Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and homogeneities of variance determined with F-tests. One-way ANOVA were used to test for possible differences in weight, length, CF, survival rate and GR between 2006 families. Normality of residual was tested using Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and homogeneities of variance determined with Levene. Tukey *post-hoc* test was used when significant differences were detected ($P < 0.05$).

2.4. Results

Considering both production years, no significant differences appear between purebred and hybrid crosses for egg diameter (T-Test, $df=4$, $F=1$, $P > 0.5$), hatching rate (T-Test, $df=4$, $F=3.1$, $P > 0.5$) or the length of the incubation period (T-Test, $df=4$, $F=7.1$, $P > 0.5$) (Table 2.1). A hybridization response featuring mean weight at hatching day is however observed, $S > SH$ (T-Test, $df=3$, $F=12.3$, $P < 0.01$) (Table 2.1). No differences in mean length (T-Test, $df=3$, $F=0.8$, $P > 0.5$) and condition factor at hatching (T-Test, $df=3$, $F=0.5$, $P > 0.5$) were detected between crosses, however, high variation between families possibly concealed possible effect of hybridization status (Table 2.1).

Table 2.1 Egg diameter (mm), hatching rate (%), length of the incubation period (degree-days), weight (g), length (mm) and condition factor at hatching of pure strain and hybrid crosses of spotted wolffish based on three different families (mean \pm SD). Different letters indicate significant differences between crosses, $P < 0.05$. *A. minor*, spotted wolffish; *A. lupus*, Atlantic wolffish.

Variable	Cross ($\text{♀} \times \text{♂}$)	
	<i>A. minor</i> \times <i>A. minor</i>	<i>A. minor</i> \times <i>A. lupus</i>
n	3	3
Egg diameter (mm)	5.8 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1
Hatching rate (%)	22.1 \pm 18.6	17.1 \pm 10.7
Length of the incubation period (degree-days)	932 \pm 62	909 \pm 25
Weight at hatching (g)*	0.135 \pm 0.007 ^a	0.111 \pm 0.002 ^b
Length at hatching (mm)*	25.0 \pm 2.4	23.9 \pm 2.7
Condition factor at hatching*	0.92 \pm 0.19	0.86 \pm 0.28

* n=2 for pure strain cross, missing data for S2

During the first growth trial (0-140 DPH in 2006), the differences in weight at hatching between the hybrid and pure strain crosses were maintained until 10 DPH (S1>SH1=SH2). Thereafter, SH1 achieved weight equivalent to the pure family (S1=SH1>SH2) and from 70 DPH no further significant differences were found among these families (Fig. 2.1, Table 2.2). GR values were in accordance with these results (Fig

2.1a inset, ANOVA, $df=2$, $F=0.901$, $P > 0.05$). For length and CF values, no particular trends were observed among families (Table 2.2). Percent mortalities for S1, SH1 and SH2 stabilized respectively at 42, 42 and 49 DPH. No significant differences between families were observed for survival throughout the experiment, except from 35 DPH for family SH2 (Table 2.2). SH2 displayed a significantly lower final survival rate ($11.0 \pm 1.9\%$) compared to S1 and SH1 ($53.7 \pm 17.5\%$ and $69.2 \pm 2.6\%$ respectively) (Table 2.2). During the second growth trial (0-300 DPH in 2007), the available information suggest lower or similar growth performance of SH3 compare to its half sib cross S3 (Fig. 2.1b and inset) and no specific trends were observed for final survival rate ($> 80\%$).

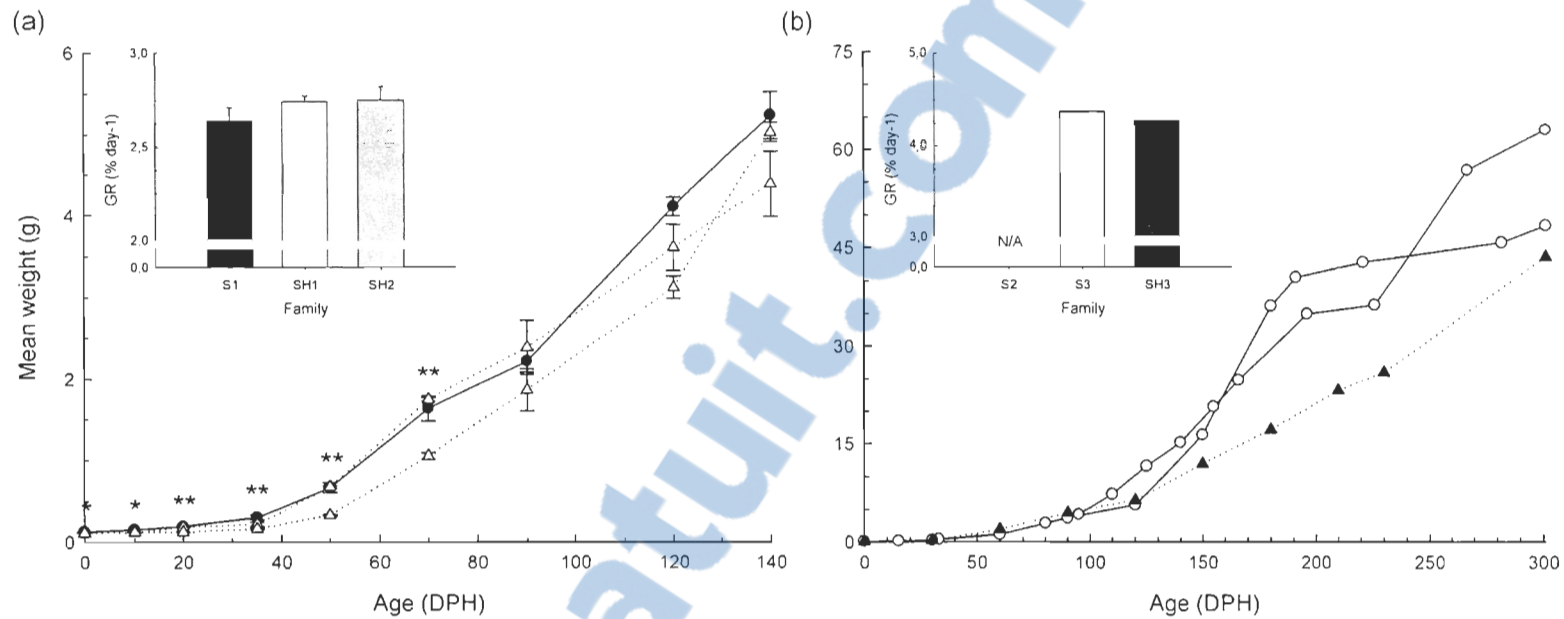


Figure 2.1 (a) Growth in weight (g) from hatching to 140 DPH of 2006 families (S1 (●), *A. minor*; SH1 (Δ), SH2 (⊕), *A. minor* × *A. lupus*). Inset shows their growth rate (GR, % day⁻¹) from 0 to 140 DPH. (b) Growth in weight (g) from hatching to 300 DPH of 2007 families (S2 (●), S3 (○), *A. minor*; SH3 (▲), *A. minor* × *A. lupus*). Inset shows their growth rate (GR, % day⁻¹) from 0 to 300 DPH. Asterisks indicate significant differences among 2006 families, $P < 0.05$ (* S1>SH1=SH2; ** S1=SH1>SH2) (mean ± SD).

Table 2.2 General linear model for weight, length, condition factor (CF) and survival rate for 2006 families (S1, SH1, SH2) at different age in DPH. Significant probabilities are bold faced ($P < 0.05$)

Age (DPH)	Source	df	Weight		Length		CF		Survival rate	
			F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
0	Family	2	118.7	0.000	26.4	0.001	50.3	0.000	-	-
10	Family	2	129.6	0.000	5.22	0.049	12.1	0.008	2.49	0.178
20	Family	2	171.1	0.000	153.2	0.000	35.5	0.000	3.23	0.126
35	Family	2	9.57	0.014	11.2	0.009	3.66	0.091	16.2	0.007
50	Family	2	29.5	0.001	31.6	0.001	6.44	0.032	16.1	0.007
70	Family	2	16.2	0.004	9.43	0.014	7.46	0.024	15.7	0.007
90	Family	2	1.10	0.393	1.34	0.330	0.15	0.866	21.1	0.004
120	Family	2	4.81	0.068	2.35	0.191	1.20	0.375	19.8	0.004
140	Family	2	1.60	0.309	0.56	0.613	2.51	0.197	19.8	0.004

Based on coloration patterns and caudal and pectoral fins structures, it was not possible to clearly distinguish reciprocal hybrids: *A. minor* × *A. lupus* (at 140 DPH and ≈ 500 DPH) or *A. lupus* × *A. minor* (at ≈ 500 DPH) from pure *A. minor* (Fig. 2.2). *A. lupus* was, however, clearly discernible from both the hybrids and pure *A. minor*.

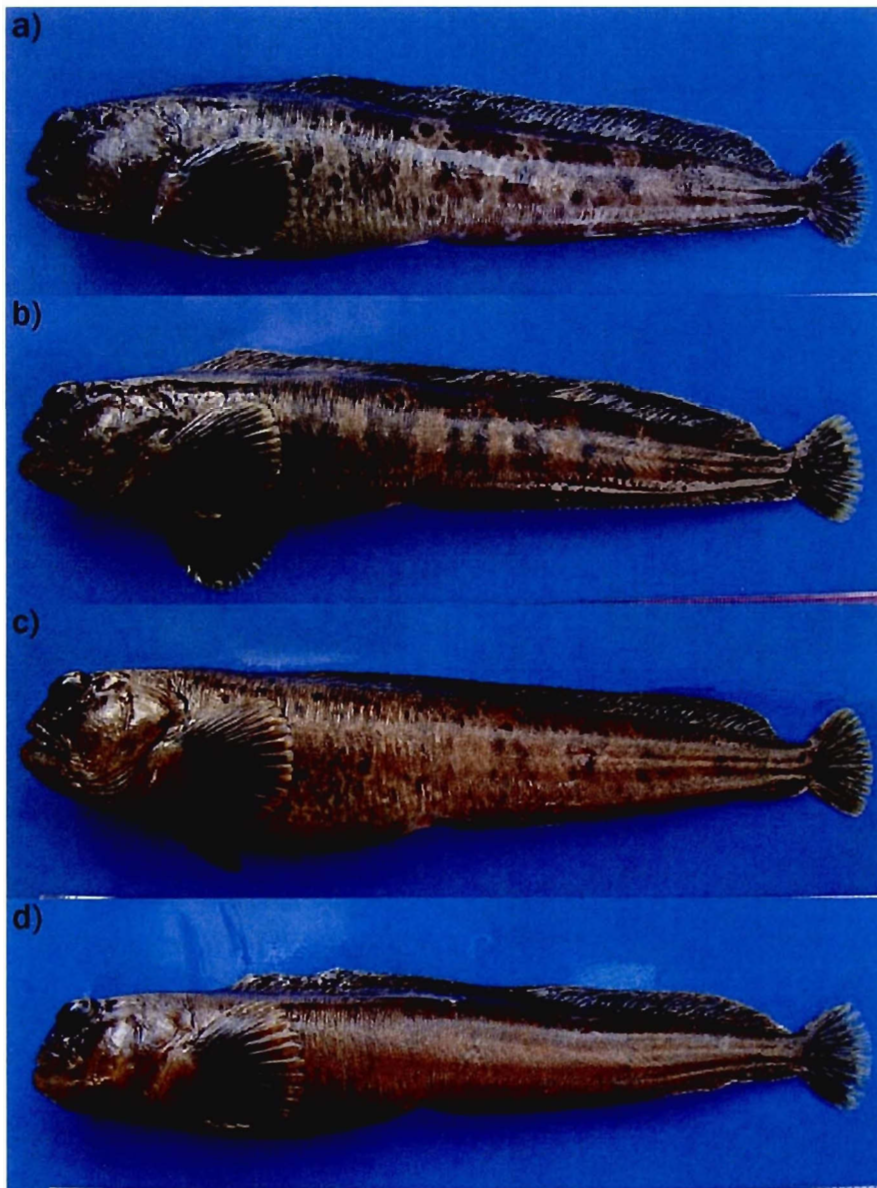


Figure 2.2 Coloration patterns of (a) spotted wolffish (*A. minor*) (S3, 500 DPH), (b) *A. minor* × *A. lupus* hybrid, (SH3, 492 DPH), (c) *A. lupus* × *A. minor* hybrid, (AH2, 533 DPH) and (d) Atlantic wolffish (*A. lupus*) (A1, 479 DPH) (DSC H50, Sony Canada Ltd., ON, Canada).

The eight microsatellites markers used allowed the confirmation of the hybrid status of families SH1 and SH2 and allowed a perfect discrimination of hybrids from pure fish (Fig. 2.3). They all inherited in a mendelian way (all offspring tested have one allele of each parent). The allele range observed for *Alu25* was markedly different for *A. minor* and *A. lupus* (120 to 132 bp and 156 to 176 bp respectively).

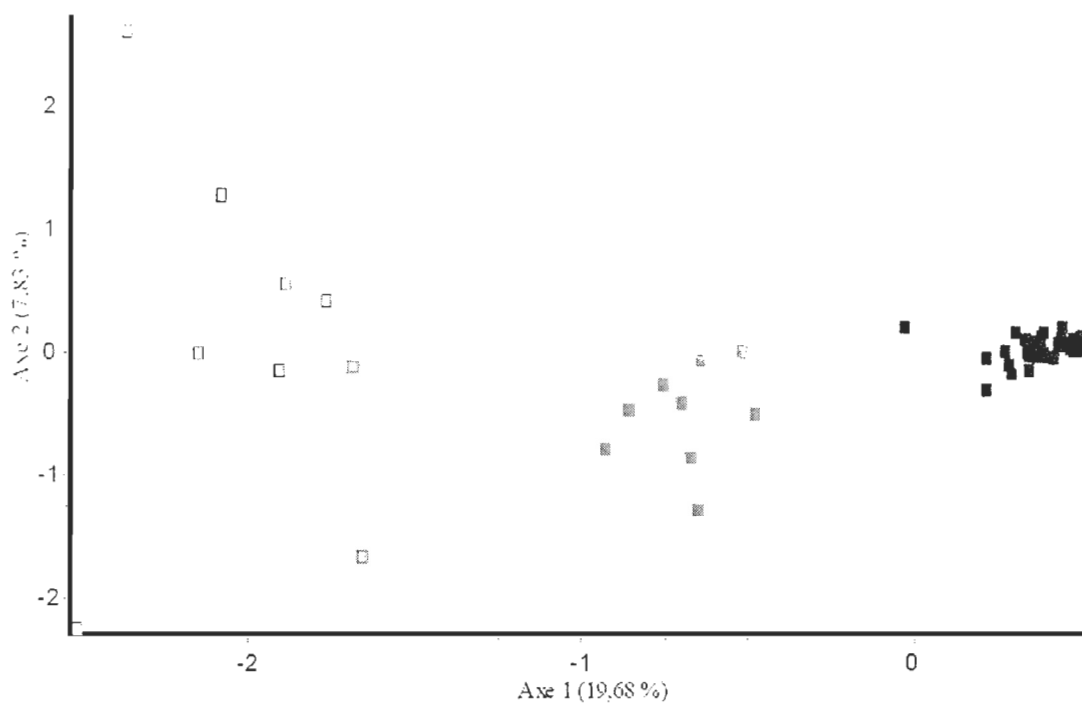


Figure 2.3 Factorial Correspondence Analysis (FCA) based on microsatellites genotyping (pure *A. lupus* (□); *A. minor* × *A. lupus* hybrid (■); pure *A. minor* (■)).

2.5. Discussion

Our results demonstrate that the spotted and Atlantic wolffish can easily interbreed to produce viable hybrid progeny and that morphologically, the reciprocal hybrids cannot be distinguished from pure *A. minor* by simple visual observations. Reciprocal hybrid juveniles (*A. minor* × *A. lupus* and *A. lupus* × *A. minor*) distinctively display color patterns with a predominance of dark spots in opposition to the spotless Atlantic wolffish juveniles (adults are vertically dark striped (Barsukov, 1972)). Hybrid maternal as well as paternal predominance of various phenotypic traits have been reported for other fish species (Park *et al.*, 2003). In our study, newly-hatch *A. minor* × *A. lupus* hybrids displayed a smaller size at hatching than pure *A. minor* indicating a certain degree of hybridization response as *A. lupus* larvae are generally smaller than *A. minor* (Le François *et al.*, 2008). However, no unambiguous conclusions can be made on hybrid growth and survival as our incomplete mating design and low number of families produced seriously limit the scope of our findings. Nevertheless, our hatching data (Table 2.1) were in accordance with previous reports on spotted and Atlantic wolffish (Falk-Petersen *et al.*, 1999; Hansen & Falk-Petersen, 2001; Falk-Petersen & Hansen, 2003) as well as the early growth performances (Mokness & Pavlov, 1996; Hansen & Falk-Petersen, 2002; Le François *et al.*, 2004; Lamarre *et al.*, 2004; Savoie *et al.*, 2006).

In addition to coloration patterns, species and hybrid identification can rely on a collection of unique morphological traits, characteristic of each species, such as vertebrae and fin rays number, teeth distribution, caudal fin structure and skull forms (see Barsukov, 1972). However, morphological variability introduced by hybridization, further increases the complexity of their identification (Loy *et al.*, 1999). Hybrids can involve two distinct species, strains or populations within a single species (Duchesne & Bernatchez, 2007) and in order to successfully identify the hybrid forms, it requires a certain level of genetic information, especially when parental species are phylogenetically closely related, such as the Atlantic and the spotted wolffish. Fish genotypic hybrid identification for field studies is frequently used (Metcalf *et al.*, 2008; Papousek *et al.*, 2008). Our results, based on the utilisation of seven loci (i.e. *Alu7*, *Alu10*, *Alu23*, *Alu25*, *Alu26*, *Alu29* and *Alu31*) were found to be adequate for the detection of wolffish hybrids originating from our broodstock populations.

Increase of genetic diversity induced by hybridization could facilitate adaptations to novel environments (Seehaussen, 2004) and provide opportunities for the expansion of wolffishes distribution range. Indeed, the Atlantic wolffish, which is the southeast and more coastal wolffish species (Barsukov, 1959 cited by Barsukov, 1972; Scott & Scott, 1988), is believed to be adapted to a wider range of temperature and salinity conditions, while the spotted wolffish is more stenothermal as it inhabits deeper ocean areas (Foss *et al.*, 2001; Le François *et al.*, 2004). Further investigations in captivity within a wide range of

environmental conditions (temperature, salinity, etc. and possible interactions) will be important to fully understand the eco-physiological consequences of wolffish hybridization. At present, the mitochondrial functionality impairment that could be generated by hybridization (Blier *et al.*, 2006) and severely limit the adaptability of the hybrids exposed to sub-optimal conditions is currently being assessed (Gaudreau *et al.* submitted a) as well as the evaluation of the heritability of antifreeze protein synthesis capacities (present in *A. lupus* but not *A. minor* see Desjardins *et al.*, 2006, 2007). The evaluation of the reproductive abilities of the hybrids based on histological, hormonal and functionality assessments is also planned.

2.6. Acknowledgements

The authors wish to thank the following for their help in various aspects of this study: T. Grenier (UQAR), D. Ouellet (UQAR), A. Savoie (UQAR), F. Dufresne (UQAR), G. Parent (U. Laval), M. Cauvier and L. Halfyard (MUN). This study was supported by grants from AquaNet (AP-34), FQRNT and the MAPAQ to NLF and PB. CG was awarded grants from CSMOPM, FUQAR and RAQ.

CHAPITRE 3

MTDNA DIVERGENCE AND MITOCHONDRIAL FUNCTIONS: INSIGHTS FROM HYBRIDIZATION OF *ANARHICHAS MINOR* AND *A. LUPUS*

3.1 Abstract

Interspecific hybridization may expose functional incompatibilities between genomes that have not coevolved and induced metabolic limitations through catalytic or regulatory impairments which may in turn result in an enhanced production of reactive oxygen species (ROS). Different physiological indicators such as lipid peroxidation and enzymes involved in aerobic/anaerobic energy metabolism were measured in pure and hybrid lines of wolffish juveniles (*Anarhichas minor*, *A. minor* × *A. lupus*). Mitochondrial sequence genes analysis between the Atlantic (*A. lupus*) and spotted wolffish (*A. minor*) were later performed to further assess the existence of a divergence threshold above which hybrid breakdown is detected for mitochondrial functions and to explore oxidative stress management. The level of divergence between *A. minor* and *A. lupus* (2.0 %) and the number of nonsynonymous substitutions (n=23) do not seem to be sufficient to generate detectable differences in ETS complexes catalytic capacities. We also suggested a significative involvement of LDH activity in oxidative stress management probably via regulation of redox potential (NADH/NAD⁺) which could be important for the interpretation of the evolutionary

significance of LDH adaptation to different environments. Our results were discussed in comparison with a similar study on a charr hybrid (*Salvelinus alpinus* × *S. fontinalis*).

3.2 Introduction

The mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) is an essential network where energy is produced through a succession of linked redox reactions. This energy production critically depends on nuclear-mitochondrial interactions as essential OXPHOS polypeptides encoded by the mitochondrial genome interact directly with those encoded by the nuclear genome. The mitochondrial and nuclear genes are believed to co-adapt to each other in synchrony throughout evolution to enable an efficient mitochondrial respiration process (reviewed by Blier *et al.*, 2001). In hybrid organisms, the contribution of both species to the nuclear or mitochondrial genome may expose functional incompatibilities between genomes that have not coevolved together. Since NADH dehydrogenase (CI), cytochrome *bc*₁ (CIII), cytochrome *c* oxidase (CIV) and ATP synthase (CV) rely on this unique coevolutionary challenge, incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes can induce metabolic limitations through catalytic or regulatory impairments. These mitochondrial dysfunctions can generate a reduction of hybrid fitness and may pose an intrinsic post-zygotic isolating barrier for populations or species having strong genetic divergence (Ellison & Burton, 2006). Impairment of aerobic capacity was shown in interpopulation hybrids of copepod (Sackton *et al.*, 2003; Ellison & Burton, 2006) and in murid xenomitochondrial cybrid cell lines (McKenzie *et al.*, 2003). By creating a panel of

nuclear-mitochondrial DNA combinations from progressively more divergent murid species, McKenzie *et al.* (2003) suggested an increase of mitochondrial functional impairment with phylogenetic distance. Previous analysis of nuclear/mitochondrial interactions on respiratory-chain functions indicated that disruption is apparent only when a certain degree of divergence is reached (Blier *et al.*, 2006). This recent study on mitochondrial functions of Arctic and brook charr hybrid (*Salvelinus alpinus* Mitchill × *S. fontinalis* Mitchill) suggested that the level of divergence between those species (659 SNPs on a respective 16 659 and 16 624 bp mitochondrial genome length (4.6 %) leading to 47 amino acid replacements (Doiron *et al.*, 2002)) was probably too modest to carry detectable differences at the level of catalytic properties.

The electron transport system (ETS) is also an important source of reactive oxygen species (ROS) in mammals (Heise *et al.*, 2003). ROS target and oxidize the cell's most vital macromolecules. According to the mitochondrial free radical theory of aging, ROS production will increase with age and affect the life-span of the organism (Sohal *et al.*, 1990; Barja, 1998). The term "oxidative stress" is used for states where the balance between generation and elimination of ROS by the antioxidant system is disturbed in favour of the former (Sies, 1991). One of the biochemical perturbations resulting from oxidative stress is lipid peroxidation leading to different products such as malondialdehyde (MDA) or lipid peroxide (LOOH) (Almroth *et al.*, 2005; Luschak & Bagnyukova, 2006). Since ROS production depends on the proton gradient and electron flow rate between

complexes (Abele *et al.*, 2002), impairments in mitochondrial respiration can result in an enhanced production of ROS in mitochondria. Therefore, disruption of mitochondrial function induced by hybridization could potentially trigger ROS production.

The Atlantic and spotted wolffish (*Anarhichas lupus* Linnaeus and *Anarhichas minor* Olafsen) are arctic-boreal bottom-dwelling fish species distributed in the North Atlantic Ocean. Since both species are the focus of aquaculture research (Le François *et al.*, 2002; Foss *et al.*, 2004), rearing procedures are well understood and their production of quite large larvae (20-24 mm at hatching) enables various measurements in a single individual. Moreover, the complete mitochondrial DNA (mtDNA) genome sequences of three wolffish species (*Anarhichas* spp.) were recently determined (Johnstone *et al.*, 2007) as a contribution to the recently adopted recovery plan for the reestablishment of wolffishes in the east of Canada (Kulka *et al.*, 2007). Indeed, the phylogenetic relationships among *Anarhichas* species mtDNA indicates that *A. minor* and *A. lupus* are each other's closest relative. Their respective mitochondrial genome comprises 16520 and 16519 base pairs, among which there are 283 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Johnstone *et al.*, 2007). These nucleotide substitutions between the three *Anarhichas* species lead to amino acid replacements and many of them were observed in gene encoding the ETS and ATP synthase. Despite these divergences, the occurrence of wolffish hybrids has been suggested in the North Atlantic Ocean (Luhmann, 1954; Barsukov, 1972; Templeman, 1986; Imsland *et al.*, 2008) and a recent complementary study has demonstrated that the Atlantic and

spotted wolffish can be hybridised in captivity to produce viable offspring which suggested no prezygotic isolation between both species (Gaudreau *et al.*, submitted b). Considering the potential existence of a divergence threshold above which hybrid breakdown is detected, more precise mitochondrial gene sequences analyses are required to further assess the impacts of amino acid substitutions in metabolic functions and ROS production.

In this study, we measured the activity of key metabolic enzymes involved in the anaerobic and aerobic metabolism (acid citric cycle and ETS) as well as a product of free radical oxidation in spotted wolffish and their hybrid with the Atlantic wolffish (♀ *A. minor* × ♂ *A. lupus*) reared from 0 to 90 days post-hatching (DPH) at the optimal growth temperatures at the chosen size range; 7-8 °C for *A. minor* and 10-11 °C for *A. lupus* (McCarthy *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2006). Additionally, we performed a comparative sequence analysis of mitochondrial genes of Atlantic and spotted wolffish to identify the distribution of mutational differences across both genomes by exploring the results of Johnstone *et al.* (2007). These data were used to scrutinize if impairment of mitochondrial functions, resulting from cyto-nuclear coadaptations breakdown, could lead to disruption of redox equilibrium and foster oxidative stress. These results are important because they could establish ROS regulation impairment as a potential trigger for reproductive isolation between closely related species.

3.3. *Materials and methods*

3.3.1. *mtDNA sequence analysis*

Nucleotide sequences of mitochondrial genes from Atlantic wolffish (GenBank accession no. EF427916) and spotted wolffish (GenBank accession no. EF427917) were aligned with BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.0); Hall (1999). The sequence comparisons, including nucleotide differences, synonymous substitutions and total amino acid differences, were carried out with MEGA (version 1.01); Kumar *et al.* (1993). Nonconservative amino acids substitution, i.e., the replacement of one amino acid by another belonging to a different amino acid class, were also quantified.

3.3.2. *Fish lines and rearing conditions*

All families (S1, pure *A. minor*; SH1 and SH2, ♀ *A. minor* × ♂ *A. lupus* hybrid) originated from wild captive broodstock of spotted and Atlantic wolffish, held at the facilities of the Centre Aquacole Marin (QC, Canada) operated by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), and were produced by artificial fertilization (see Moksness & Pavlov, 1996). Fertilized eggs were incubated for approximately 1000 degree days in modified Heath tray incubators at 6.0 ± 0.2 °C. Hatching of families occurred in January 2006. Due to low fecundity and poor egg quality, pure *A. lupus* and ♀ *A. lupus* × ♂ *A. minor* hybrid were successfully produced but not considered in this experiment.

Immediately after hatching, triplicates of all families were gradually acclimated (over 2 days) in two independent recirculating rearing systems (Aquabiotech inc., QC, Canada) held at 8 and 10 °C (optimal temperature for growth of *A. minor* and *A. lupus* respectively) for a period of 90 days ($3 \times 150 = 450$ fish). Fishes were fed enriched *Artemia* nauplii for the first two weeks post-hatching and weaned on a marine fish feed formulae (Gemma Skretting Canada, N.-B., Canada).

3.3.3. Tissue preparation

Six individuals per replicate were randomly sampled at hatching and at 30 and 90 DPH, weighed, measured and preserved at -80 °C for physiological measurements. Fish were fasted for 15 hours before sampling and were killed by lethal dose of anaesthetics (Benzocaine). UQAR local ethics committee and funding agency reviewed the project prior to its realization in governmental facilities (MAPAQ, Centre Aquacole marin). Whole individuals were homogenised in nine volumes of ice-cold buffer (50 mmolL^{-1} imidazole, 2 mmolL^{-1} MgCl_2 , 5 mmolL^{-1} EDTA and 0.09 % Triton X-100, pH 7.5) for three 10-s periods (with 1 min on ice between) with an Ultra Turrax T25 (IKA labortechnik, DE, USA). All manipulations were performed on ice. A first aliquot of the homogenate was centrifuged at 400 g for 1 minute and a second was centrifuged at 400 g for 10 minutes. The supernatant from the first aliquot was afterwards separated in four sub-aliquots of 100 μl : two kept on ice for immediate citrate synthase (CS, EC 2.3.3.1) and lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) assays, one frozen at -20 °C for protein content assay and another quickly frozen at -80 °C for lipid peroxidation level (with a nitrogen flush). The supernatant from the

second centrifuged aliquot was used for immediate cytochrome *c* oxidase (CIV, EC 1.9.3.1) and NADH dehydrogenase and cytochrome *bc*₁ combined (CI-III, EC 1.6.5.3 and 1.10.2.2) assays.

3.3.4. Physiological measurements

All enzymatic activities were expressed as U mg⁻¹ or g protein⁻¹. Total protein content was determined using the bicinchoninic acid method (Smith *et al.*, 1985). Enzyme activities were measured using a Lambda 11 UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer, MA, USA). Activities of CS and LDH, were assayed according to methods described in Thibeault *et al.* (1997). Activity of CI-III was measured according to the method described in Lannig *et al.* (2003) with minor modifications, while the activity of CIV was measured according to the method described in Pelletier *et al.* (1993). Enzymatic assays were conducted at 15 °C. Conditions for enzyme assays are resumed in Table 3.1. Lipid peroxidation level (TBARS) was measured using a thiobarbituric acid reactive substances assay kit (OXItek TBARS Assay Kit; ZeptoMetrix Corporation, N.-Y., USA) in which MDA reacts with TBA substances under conditions of high temperature and acidity to generate a colored adduct that is measured spectrofluorometrically (F-2500 Fluorescence spectrophotometer, Hitachi Software Engineering America Ltd, CA, USA) (Almroth *et al.*, 2005).

Table 3.1 Substrates and buffer used for enzyme analysis.

Enzyme	Substrate	Buffer solution	pH	Reference
CS	Oxaloacetate (0.15 mM)	Imidazole-HCl (100 mM)	8.0	Thibeault <i>et al.</i> (1997)
LDH	Pyruvate (0.4 mM)	Phosphate (100 mM)	7.0	Thibeault <i>et al.</i> (1997)
CI-III	INT (2 mM)	Potassium-phosphate- sodium (100 mM)	8.5	Lannig <i>et al.</i> (2003)
CIV	Cytochrome c (100 μ M)	Potassium-phosphate (100 mM)	8.0	Pelletier <i>et al.</i> (1993)

3.3.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SYSTAT (version 11.0, SPSS, 2004, Chicago, IL, USA). General linear model (GLM) was used for enzyme activities and lipid peroxidation level with family, temperature and age as main effects and weight as covariance. A second GLM was done omitting none significant interaction(s) with weight. Tukey *post-hoc* test was used when significant differences were detected ($P < 0.05$). Normality of residuals was tested using Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and homogeneities of variance were determined with Levene's test. To represent linear combinations between energy metabolism enzymes, lipid peroxidation level and weight, a principal component analysis (PCA) of all measured variables at the end of the

experiment was performed and to clear up linear relation between co-linear variables, partial correlations were made.

3.4. Results

3.4.1. mtDNA divergence: ETS coding regions

The overall nucleotide divergence between the two complete mtDNA genomes of *A. minor* and *A. lupus* is estimated at 2.0 %. Table 3.2 presents the comparison of the 13 protein-coding genes between Atlantic and spotted wolffish. The total nucleotide differences ranged from 0.3 % in the *nad3* gene to 3.0 % in the *nad4* gene, whereas the synonymous substitutions ranged from 0.6 % in the *atp8* gene to 2.6 % in the *nad1* gene. The transition to transversion ratio was highly variable among genes, ranging from 0 in the *cox3*, *atp8* and *atp6* genes to 40 in the *nad4* gene.

Table 3.2 Differences between the mitochondrial peptide-coding genes of Atlantic and spotted wolffish. N_n , total number of nucleotide differences; N_a , total number of amino acid differences; T_s , transition; T_v , transversion; Syn., synonymous substitutions.

Gene	Length	Nucleotide difference							Amino acid substitution		
		N_n	Total (%)	T_s	T_v	T_s/T_v	Syn.		N_a	Total (%)	Non-conservative (%)
							nbr	(%)			
<i>cox1</i>	1551	24	1.5	19	5	3.8	21	1.4	3	0.6	0.6
<i>cox2</i>	691	6	0.9	5	1	5	6	0.9	0	0	0
<i>cox3</i>	786	13	1.7	13	0	—	13	1.7	0	0	0
<i>cob</i>	1141	25	2.2	24	1	24	24	2.1	1	0.3	0.3
<i>atp8</i>	168	1	0.6	1	0	—	1	0.6	0	0	0
<i>atp6</i>	684	6	0.9	6	0	—	5	0.7	1	0.4	0
<i>nad1</i>	975	26	2.7	24	2	12	25	2.6	1	0.3	0
<i>nad2</i>	1046	27	2.6	24	3	8	23	2.2	4	1.1	0.6
<i>nad3</i>	349	1	0.3	5	1	5	5	1.4	1	0.9	0
<i>nad4L</i>	297	4	1.3	3	1	3	4	1.3	0	0	0
<i>nad4</i>	1381	41	3.0	40	1	40	35	2.5	6	1.3	0.9
<i>nad5</i>	1838	36	2.0	35	1	35	32	1.7	4	0.7	0.3
<i>nad6</i>	522	14	2.7	12	2	6	12	2.3	2	1.2	0.6
Total		224		211	18		206		23		

A total of 23 amino acid substitutions occurred between both species. Except for *cox2*, *cox3*, *atp8* and *nad4L*, all other genes showed amino acid substitutions. Three amino acid substitutions were observed for the *cox1* gene and one in the *cob* and *atp6* genes. The majority of amino acid differences was observed in genes of the NADH oxidoreductase complex, *nad4* (6), *nad2* (4), *nad4* (4), *nad6* (2), *nad1* (1) and *nad3* (1). Many genes (*cox1*, *cob*, *nad2*, *nad4*, *nad5* and *nad6*) underwent nonconservative substitutions.

3.4.2. Protein content

No difference in protein content of newly hatched larvae was detected for any sources of variation and this trend remained until the end of the experiment (results not shown).

3.4.3. Mitochondrial functions

Since no significant temperature \times family interactions were found for all physiological indicators (CI-III, CIV, CS, LDH, TBARS and CIV to CS ratio; Table 3.3), data from both temperatures groups were pooled. As a rough guide, mass of sampled fish (pooled temperatures) is shown in Figure 3.1. Energy metabolism and oxidative stress indicators during the overall experimental period (0 to 90 DPH) are summarized in Figure 3.2. Despite a significant interaction between family and age for the activity of the electron transport system (CI-III and CIV), no significant differences between families were observed at any age of the fish, except at 30 DPH for CI-III (SH1 > S1) (Fig. 3.2a,b; family \times age interaction, Table 3.3). CIV values significantly increased from hatching to 30 dph and afterwards stabilized until 90 dph for all families (Fig. 3.2b). No specific effect of

hybridization and age was observed on CIV when the activity was expressed as a ratio of CS (Fig. 3.2f; family \times age interaction, Table 3.3). In contrast, CI-III values were stable through the experiment (Fig. 3.2a). The activity of the control enzyme (CS), was not affected by either family or age and no interaction between those two factors was detected (Fig. 3.2c; Table 3.3). Therefore, data from families were pooled together. All these family variations were independent of fish mass (family \times weight interaction, Table 3.3).

From hatching to 30 DPH, LDH activity stayed low for all families and increased afterwards until the end of the experiment (90 DPH) (Fig. 3.2d). However at 90 DPH, LDH activity for both spotted hybrid families increased more than the pure control family (Fig. 3.2d; family \times age interaction, Table 3.3) and the three families were thus found significantly different from each other. Compared to the pure line, this increase, between 30 and 90 DPH, is about 1.37-1.54 higher depending on which hybrid family. The TBARS level decreased for all families from 0 to 30 DPH and then increased until the end of the experience to reach higher values than at hatching (Fig. 3.2e). Like LDH activity, TBARS level were found significantly different between families at 90 DPH, but only SH1 showed a higher value (Fig. 3.2e; family \times age interaction, Table 3.3).

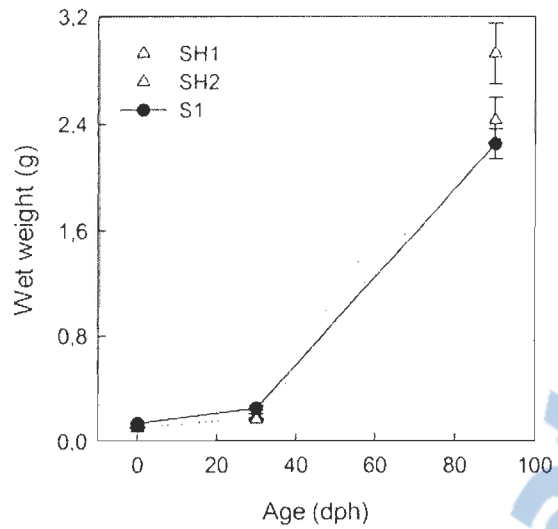


Figure 3.1 Mean wet weight (g) of sampled fish of SH1 and SH2 (*A. minor* × *A. lupus*) and S1 (*A. minor*) families from 0 to 90 DPH (mean ± SE). Data from both temperatures were pooled together.

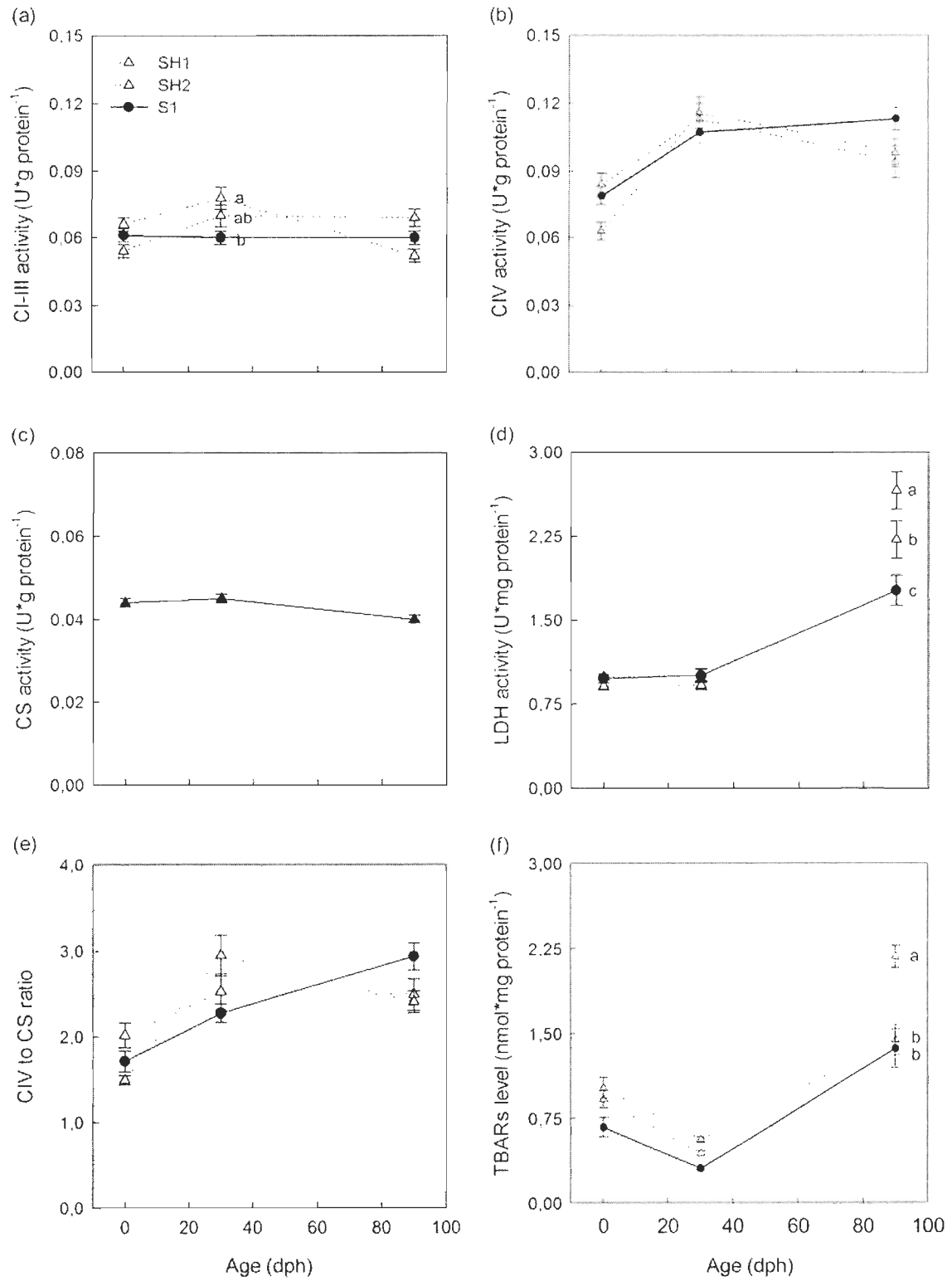


Figure 3.2 Enzymatic activities of (a) NADH dehydrogenase and cytochrome bc_1 combined (*CI-III*), (b) cytochrome c oxidase (*CIV*), (c) citrate synthase (*CS*), (d) lactate dehydrogenase (*LDH*), (e) the lipid peroxidation level (*TBARS*) and (f) the *CIV* to *CS* ratio (*CIV:CS*) among wolffish families (SH1 and SH2, *A. minor* \times *A. lupus*; S1, *A. minor*) from 0 to 90 DPH (mean \pm SE). Data from different temperatures and families were pooled together when these effects were not significant. *a*, *b*, *c* indicate significant differences between families.

Table 3.3 General linear model for enzymatic activities (CI-III, CIV, CS, LDH) and lipid peroxidation level (TBARS) for the three wolffish families (non significant weight interactions were omitted in the model). Independent variables were temperature (8 and 10 °C), family (S1, SH1 and SH2) and age (0, 30 and 90 DPH). Significant probabilities are bold faced ($P < 0.05$).

Source	df	CI-III		CIV		CS		LDH		TBARS		CIV to CS ratio	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Family	2	1.39	0.252	0.67	0.515	2.33	0.101	10.1	0.000	16.8	0.000	0.04	0.961
Age	2	4.52	0.013	28.3	0.000	1.4	0.249	15.2	0.000	30.9	0.000	18.9	0.000
Temperature	1	1.45	0.231	2.12	0.158	7.82	0.006	37.4	0.000	19.4	0.000	0.28	0.597
Weight	1	0.04	0.834	0.03	0.861	7.37	0.007	0.69	0.409	4.81	0.030	3.55	0.062
Family × age	4	5.38	0.000	2.56	0.042	2.10	0.084	7.33	0.000	7.45	0.000	5.81	0.000
Temperature × age	2	1.39	0.252	0.93	0.399	0.31	0.733	40.5	0.000	11.3	0.000	0.41	0.666
Family × temperature	2	0.78	0.462	0.95	0.391	0.33	0.719	0.57	0.566	0.12	0.887	0.43	0.652
Family × weight	2	-	-	1.76	0.175	-	-	-	-	8.17	0.000	-	-
Age × weight	2	-	-	-	-	-	-	6.18	0.003	-	-	-	-

3.4.4. Relationship between energy metabolism and oxidative stress

A principal component analysis that combined the values of 6 variables into a single model: CI-III, CIV, CS and LDH activity, TBARS level and weight was realized (Fig. 3.3). The analysis extracted 2 components explaining together 72.0 % of the variability in the original data. The PCA clustered the dataset into two groups in which variables are positively related together 1) activity of the aerobic metabolism enzymes (CI-III, CIV and CS) and 2) lipid peroxidation level (TBARS), LDH activity and weight. To clear up the relation between lipid peroxidation level and LDH activity by taking off the effect of weight, a partial correlation was performed. The analysis lead to a strong linear relation between the anaerobic metabolism capacity and the oxidative stress indicator (TBARS level) ($r = 0.489$, $P < 0.001$) since controlling for weight did not lower the strength of the relationship between LDH and TBARS by that much (the outcome while not controlling for weight was $r = 0.637$, $P < 0.001$).

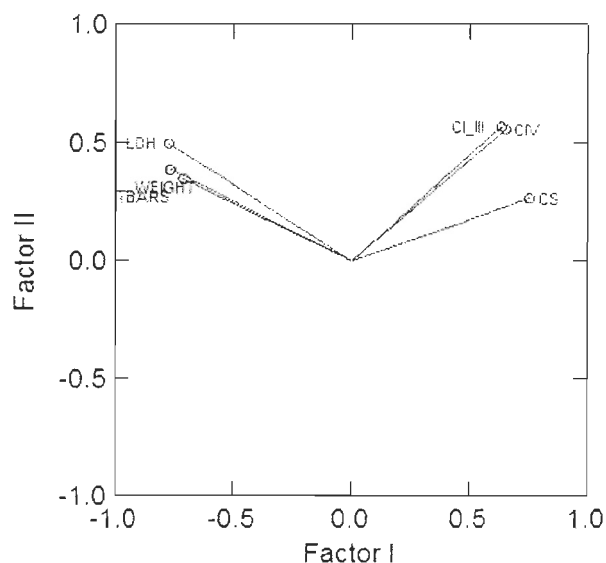


Figure 3.3 Position of the vector-variables in the plan of the first two principal components (variance explained: 51.6 and 20.4 %). CI_III is for the activity of NADH dehydrogenase and cytochrome bc_1 combined, CIV is for the activity of cytochrome c oxidase, CS is for the activity of citrate synthase, LDH is for the activity of lactate dehydrogenase and TBARS is for lipid peroxidation level.

3.5. Discussion

3.5.1. Mitochondrial functions

This study clearly demonstrates that hybridization does not affect the developmental pattern of the mitochondrial enzymes studied in F1 *A. minor* × *A. lupus* hybrid as no major distortion in the measured aerobic enzymatic profiles was observed between pure and

hybrid lines. Some studies have demonstrated that amino acid substitutions may have an impact on nuclear-mitochondrial interactions and on the mechanisms regulating mitochondrial functioning (reviewed in Blier *et al.*, 2001). Between the Atlantic and the spotted wolffish, most of amino acid substitutions are localized in the complex I genes (18) and others are in the complex III genes (1), the complex IV genes (3) and the complex V genes (1). These 23 nonsynonymous substitutions are far beyond the 47 found between the brook and the Arctic charr (45 in the complex I genes, one in the complex IV and the complex V; Doiron *et al.*, 2002) and this amount of substitutions between charr species leads to minor impacts on the catalytic capacity of complexes I and IV of the hybrids (Blier *et al.*, 2006). Obviously, the level of divergence between *A. minor* and *A. lupus* (2.0 %) and the number of nonsynonymous substitutions do not seem to be sufficient to carry detectable differences in ETS complexes catalytic capacities and suggested that the *A. minor* × *A. lupus* hybrid is under the critical divergence threshold above which hybrid breakdown for these traits could be detected. For example in murid xenomitochondrial cybrids, to display a significant decrease in CIV activity, they should contain at least approximately 26 amino acid substitutions between mitochondrially encoded complex IV peptides of the nucleus donor species and the mtDNA donor species (McKenzie *et al.*, 2003). In addition, hybridization did not affect the size and shape of mitochondria as shown by the CIV to CS activities ratio which is associated with a change in the surface-volume ratio of mitochondria (Pelletier *et al.*, 1995).

Highest values in LDH activity and lipid peroxidation level for wolffish hybrids seem not to be a response to hybridization but rather a response to fish mass. LDH profile linked to weight is in accordance with previous studies on wolffishes and other species (Somero & Childress, 1980; Martinez *et al.*, 2000; Lemieux *et al.*, 2003; Lamarre *et al.*, 2004; Lamarre *et al.*, 2007; Savoie *et al.*, 2008). TBARS assay is an integrative parameter that quantified malonedialdehyde accumulation in tissues and our results suggest an allometric scaling of oxidative stress in the early life stages in fish. However, it is also possible that the weight relation concealed potential effects of hybridization status, but in light of our results, *A. minor* × *A. lupus* hybrids seem to be physiologically robust and as the spotted pure line (Savoie *et al.*, 2008), they seem to rely on adequate metabolic capacities to sustain their high growth rate. Indeed, there was no clear reduced in performances or viability in the hybrids compared to the pure strain (see Gaudreau *et al.*, submitted b).

This weak impact of mitochondrial haplotype on metabolic enzymes activity is corroborated by the absence of relation between hybridization and temperature responses. As previously cited, Blier *et al.* (2006) evaluated functional properties of key mitochondrial enzyme in Arctic charr, brook charr and their hybrids and found no significant differences in enzymes activities even though these species evolved in different thermal environments. However, the limited scope of temperature acclimation used in this experiment does not provide reliable conclusions on specific physiological adaptations of *A. minor* × *A. lupus* hybrid to cold and warm temperatures. Bowler (2005) proposed that if acclimation

responses measured within viable thermal limits and those measured at extreme temperatures involved different factors, then those factors may be differently subject to selection in evolution. Thus maybe under sub-optimal conditions, hybridization between the spotted and Atlantic wolffish could limit the adaptability of the progeny. As cautioned by Blier *et al.* (2006) it is also possible that the absence of differences is related to the difficulty of identifying and measuring the proper evolutionary significant biochemical parameters.

3.5.2. Oxidative stress management

There was no detectable aerobic metabolism activities-dependence of lipid peroxidation level, but rather a strong relationship with LDH activity independently of weight. Lactate dehydrogenase, that catalyzed pyruvate-lactate conversion, regulates levels of cytosolic NADH and thus NADH/NAD⁺ ratio. NAD/NADH and NADP/NADPH ratios have an important implication in oxidative stress management as they play key roles in cellular antioxidation capacity and ROS generation (reviewed by Ying, 2008). In addition to be linked to the cellular reducing potential, NADH, via NADPH, promoted glutathione (GSH) regeneration, which is required for the activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferases (GST). Our results could thus suggest an important function of LDH enzyme in oxidative stress management probably via management of redox potential (NADH/NAD⁺). In clear, increase in LDH activity (mostly muscular LDH) could shift the redox equilibrium to a lower NADH/NAD⁺ ratio impairing GSH regeneration through diminution of NADPH content. This explanation however has to

be tested, but our observations could be important in the interpretation on evolutionary significance of LDH adaptation to different environments.

3.6. *Acknowledgments*

The authors wish to thank the following for their help in various aspects of this study: T. Grenier, D. Ouellet and A. Savoie from UQAR and G. Parent (U. Laval). Special thanks to R. Vergilino (UQAR) for sequences comparison analysis. This study was supported by grants from AquaNet (AP-34), FQRNT and the MAPAQ to NLF and PB. CG was awarded grants from CSMOPM, FUQAR and RAQ.

CHAPITRE 4

CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1. *Bilan et avancement des connaissances*

Cette étude démontre sans équivoque la faisabilité de l'hybridation entre le loup tacheté et le loup Atlantique. Basé sur les valeurs préliminaires de taux d'éclosion et de longueurs de période d'incubation, ces hybrides semblent pouvoir être produits avec la même efficacité que les espèces pures. Les résultats suggèrent d'ailleurs une faible isolation prézygotique entre ces deux espèces, ce qui renforce indéniablement la probabilité de leur hybridation en milieu naturel. En se fiant sur quelques caractères morphologiques distinctifs entre les deux espèces (patron de coloration et structure de la nageoire caudale), il est impossible de discriminer efficacement les deux types d'hybrides de la forme pure tachetée durant leur première année de vie. Toutefois, les différents marqueurs microsatellites testés se sont avérés de puissants outils pour discriminer le statut d'hybride chez le loup de mer.

À l'éclosion, la taille des hybrides *A. minor* × *A. lupus* est inférieure à celle des individus purs tachetés indiquant un certain degré de réponse à l'hybridation. Toutefois, aucune conclusion claire et sans équivoque ne peut être faite du point de vue des performances. Ces dernières sont par ailleurs conformes à celles d'études antérieures

portant sur *A. minor* et *A. lupus*, ce qui laisse croire à un bon potentiel de croissance et de survie à des températures de 8 et 10 °C.

De plus, les hybrides semblent être physiologiquement robustes vu le faible impact de l'haplotype mitochondrial sur l'activité des enzymes métaboliques, ce qui démontre des capacités métaboliques adéquates pour soutenir un taux de croissance élevé. D'ailleurs, l'absence de lien entre l'hybridation et l'effet de la température au niveau des capacités métaboliques vient corroborer cette hypothèse. Dans ce sens, l'analyse des séquences des gènes mitochondriaux des deux espèces et la comparaison des résultats avec une étude similaire sur les fonctions mitochondriales de l'hybride d'omble *S. alpinus* × *S. fontinalis* (Blier *et al.*, 2006) supporte l'idée que le croisement *A. minor* × *A. lupus* est en-dessous du seuil critique de divergence pour lequel la dépression hybride pour ces traits pourrait être détectée.

Parallèlement, une forte relation entre l'activité de la lactate déshydrogénase et le taux de peroxydation des lipides a été démontrée, ce qui suggère une fonction importante de cette enzyme dans la gestion du stress oxydant, probablement via le potentiel rédox (NADH/NAD⁺) du cytoplasme.

4.2. Limites de l'étude et perspectives

Cette première évaluation et caractérisation des hybrides de loup de mer est indicative de tendance plutôt que conclusive, mais fournit des indications de grandes valeurs pour de futures recherches.

Le schéma de reproduction incomplet et l'absence de réplicats dans certains croisements limitent évidemment la portée des résultats. Pour bien évaluer les effets génétiques qui contribuent à la variation phénotypique observée, par exemple pour les performances, le plan d'expérience devrait comporter plusieurs groupes de progéniture reliés entre eux de manières variées (p.ex. même père ou même mère, *half siblings*, ou les deux, *full siblings*) (Lutz, 2001; Dupont-Nivet *et al.*, 2002; Blanc, 2003a). Ainsi, les contributions parentales deviennent un facteur dans les analyses statistiques. Cette méthode de production des familles est exécutée avec succès pour plusieurs espèces de poissons marins, surtout chez les salmonidés (Refstie, 1990; Blanc, 2003b; Blanc *et al.*, 2005), et sera évidemment préconisée pour les futures études portant sur les hybrides de loup de mer.

L'utilisation des patrons de coloration de même que de la structure de la nageoire caudale ne constitue évidemment pas une caractérisation morphométrique exhaustive des hybrides de loup de mer. La variabilité morphométrique additionnelle introduite par l'hybridation complique l'identification des espèces spécialement si des techniques incomplètes ou inappropriées sont utilisées (Loy *et al.*, 1999). La géométrie

morphométrique, par exemple, permet une reconstitution complète de la forme pour comprendre celle-ci directement plutôt qu'indirectement via des mesures fragmentaires telles qu'utilisées en morphométrie traditionnelle dans cette étude (Richtsmeier *et al.*, 2002). L'apparence et les différences de forme peuvent donc être quantifiées entre les deux espèces et leurs hybrides, comme cela a été le cas dans l'étude de Valentin *et al.* (2002) sur deux espèces de sébastes (*S. mentella* et *S. fasciatus*). Jumelée à un bon schéma de reproduction, cette technique novatrice semble être une avenue appropriée pour caractériser plus complètement la morphologie des hybrides de loup de mer juvéniles ou adultes. D'ailleurs, concernant les individus adultes, il serait intéressant de re-qualifier leur apparence sur la base de leur coloration afin de valider cette méthode. La répartition de la dentition pourrait également être envisagée comme indicateur morphométrique (voir Barsukov, 1972).

Lors des essais de croissance, les poissons ont été acclimatés aux températures optimales de croissance respectives des deux espèces. L'augmentation de la diversité génétique induit par l'hybridation peut faciliter l'adaptation à de nouveaux environnements (Seehaussen, 2004) et ainsi donner l'opportunité aux loups de mer d'étendre leurs aires de distribution. De nouveaux essais devront être réalisés en captivité à l'intérieur d'une gamme de conditions environnementales plus grande (température, salinité, etc. et interactions possibles), ce qui permettra de mieux comprendre les conséquences éco-physiologiques de l'hybridation du loup de mer.

Une des problématiques récurrentes de ce type d'étude comportant des paramètres biochimiques évolutifs est la difficulté d'identifier et de mesurer les plus appropriés. D'autres mesures de l'efficacité métabolique peuvent être employées. Par exemple, au niveau du métabolisme énergétique, la mesure de la respiration mitochondriale (Estabrook, 1967), où l'activité des différents complexes de l'ETS et celui de l'ATP synthase est mesurée en suivant la consommation d'oxygène suite à l'ajout de substrats et d'agents inhibiteurs, est largement utilisée. L'activité de d'autres enzymes métaboliques clés, telles que la phosphofructokinase-1 (PFK-1) (glycolyse, régulation) (Thibeault *et al.*, 1997), la pyruvate kinase (PK) (glycolyse, régulation) (Pelletier *et al.*, 1994), la pyruvate déshydrogénase (PDH) (voie d'entrée mitochondriale des glucides) (Thibeault *et al.*, 1997), l' α -cétoglutarate déshydrogénase (cycle de l'acide citrique, régulation) et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (ETS) (Merritt *et al.*, 2006), pour ne nommer que celles-ci, pourrait aussi être investiguée.

Également, afin de bonifier les résultats concernant la gestion du stress oxydant et ainsi clarifier sa relation avec l'équilibre rédox, il serait intéressant de mesurer la production mitochondriale du radical libre H_2O_2 (Staniek & Nohl, 1999), le taux de glutathione réduit (GSH) ainsi que l'activité d'enzymes du système de défenses antioxydantes (la catalase (CAT) (Orr & Sohal, 1992), la superoxide dismutase (SOD) (Sun & Tower, 1999), la glutathione peroxidase (GPx) et la glutathione-S-transferase (GST)). D'autres classes de macromolécules que les lipides étant susceptibles de subir des attaques

oxydantes, des mesures du taux d'oxydation de l'ADN de même que celui des protéines via le taux de protéines carbonylées (Lenz *et al.*, 1989) et l'activité de l'aconitase (cycle de l'acide citrique) (Yarian *et al.*, 2006), par exemple, seraient évidemment appropriées.

La maturation sexuelle et la stérilité possible des hybrides de loup de mer n'ont pas été abordées dans le cadre de cette étude, puisque celle-ci se concentrait sur les jeunes stades de vie. Toutefois, il serait particulièrement intéressant d'évaluer les habilités reproductrices des adultes hybrides d'un point de vue histologique, hormonal et fonctionnel.

Parallèlement, le croisement hybride *A. lupus* × *A. minor* nécessite une évaluation plus poussée, l'accent n'ayant pas été mis sur ce dernier lors de cette étude. Les différences entre les croisements réciproques intra- ou inter- spécifiques étant largement attribuables aux effets maternels, leur implication dans les variations observées a donc d'importantes répercussions sur les performances et le succès de l'hybride (Lutz, 2001). D'un point de vue pratique et dans un contexte aquacole, le croisement hybride *A. minor* × *A. lupus* est favorisé puisque la femelle loup tacheté produit un plus grand nombre d'œufs pour une même ponte, qui sont d'ailleurs plus gros, et le sperme du loup Atlantique est préféré à celui du loup tacheté pour sa densité et ses capacités motiles accrues. Le même type de favoritisme dans l'industrie aquacole a été démontré pour l'hybride de bar *M. saxatilis* × *M. chrysops*, toutefois, à ce jour, l'industrie compte principalement sur l'hybride *M.*

chrysops × *M. saxatilis* lequel produit certes des œufs plus petits, mais est entre autre beaucoup plus tolérant aux stress que son croisement hybride réciproque. Ainsi des études complémentaires devront être réalisées afin d'évaluer plus clairement la valeur des deux croisements hybrides de loup de mer dans une optique d'élevage commercial.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O. & Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology* **205**, 1831-1841.

Albert, V. (2005). Hybridation naturelle entre les anguilles américaines et européennes : ampleur, répartition et stades de vie. Mémoire présenté à Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en biologie. Université Laval, Québec, Canada. 59 p.

Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A. & Forlin, L. (2005). Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **73**, 171-180.

Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B., Yousif, B.S., Lavee, J. & Smolinsky, A.K. (2004). Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. *Cryobiology* **48**, 273–282.

Angilletta, M.J., Steury T.D. & Sears M.W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative Comparative Biology* **44**, 498-509.

Ballard, J.W. (2005). *Drosophila simulans* as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging. *Experimental Gerontology* **40**, 763-773.

- Barja, G. (1998). Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**, 224-238.
- Barsukov, V.V. (1972). The wolffish (Anarhichadidae). Smithsonian Institute NTIS, Springfield, VA, 22151 USA. 292 p.
- Bartley, D.M., Rana, K. & Immink, A.J. (2001). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 325-337.
- Basavaraju, Y., Deveraj, K.V. & Ayyar, S.P. (1995). Comparative growth of reciprocal carp hybrids between *Catla catla* and *Labeo fimbriatus*. *Aquaculture* **129**, 183-186.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Review* **78**, 548-571.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.04, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/constr.htm#download>.
- Bernatchez, L., Glemet, H., Wilson, C.C. & Danzmann, R.G. (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 179–185.
- Blanc, J.M., Vallée, F. & Dorson, M. (2000). Survival, growth and dressing traits of triploid hybrids between rainbow trout and three charr species. *Aquaculture Research* **31**, 349-358.

Blanc, J.M. (2003a). Comparison of experimental designs for estimating quantitative genetic parameters in fish. *Aquaculture Research* **34**, 1099-1105.

Blanc, J.M. (2003b). Paternal variation in juvenile survival and growth of the triploid hybrid between female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and male brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture Research* **34**, 205-210.

Blanc, J.M., Vallée, F., Maunas, P. & Fouriot, J.-P. (2005). Maternal variation in juvenile survival and growth of triploid hybrids between female rainbow trout and male brown trout and brook charr. *Aquaculture Research* **36**, 120-129.

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

Blier, P.U. & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome *c* oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology and Biochemistry* **171B**, 247-253.

Blier, P.U., Dufresne F. & Burton, R.S. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in Genetics* **17**, 400-406.

Blier, P.U., Breton, S., Desrosiers, V. & Lemieux, H. (2006). Functional conservatism in mitochondrial evolution: insight from hybridization of Arctic and brook charrs. *Journal of Experimental Zoology* **306B**, 1-8.

Bokov, A., Chaudhurib, A. & Richardson, A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanics of Ageing and Development* **125**, 811-826.

Boveris, A. & Cadenas, E. (2000). Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB* **50**, 245-250.

Bowler, K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology* **30**, 125-130.

Burke, J.M. & Arnold, M.L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* **35**, 31-52.

Campbell N.A. (1995). *Biologie*. ERPI, Canada. 1190 p.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L. & Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36027–36031.

Chevassus, B. (1979). Hybridization in salmonids: results and perspectives. *Aquaculture* **17**, 113-128.

Collie, J.S., Hall, S.J., Kaiser, M.J. & Poiner, I.R. (2000). A quantitative analysis of fishing impacts on shelf-sea benthos. *Journal of Animal Ecology* **69**, 785-798.

Conover, W.J. & Iman, R.L. (1981). Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* **35**, 124-134.

Couture, P., Dutil, J.D. & Guderley, H. (1998). Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 1591-1598.

Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O. & Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **12**, 33-58.

Desjardins, M., Le François, N.R., Fletcher, G.L. & Blier, P.U. (2006). Seasonal modulation of plasma antifreeze protein levels in Atlantic (*Anarhichas lupus*) and spotted wolffish (*A. minor*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **335**, 142-150.

Desjardins, M., Le François, N.R., Fletcher, G.L. & Blier, P.U. (2007). High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) make them an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters. *Aquaculture* **272**, 667-674.

Desrosiers, B., Sevigny, J.M. & Chanut, J.P. (1999). Restriction fragment length polymorphism of rDNA in the redfishes *Sebastes fasciatus* and *S. mentella* (Scopaeidae) from the Gulf of St Lawrence. *Canadian Journal of Zoology* **77**, 267-277.

Desrosiers, V., Le François, N.R., Tveiten, H., Andreassen, I. & Blier, P.U. (2008a). Ontogenesis of catabolic and energy metabolism capacities during the embryonic development of spotted wolffish (*Anarhichas minor*). *Comparative Physiology and Biochemistry* **150B**, 200-206.

Desrosiers, V., Le François, N.R. & Blier, P.U. (2008b). Trypsin-like enzyme from Atlantic wolffish (*Anarhichas Lupus*) viscera: Purification and characterization. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **17**, 11-26.

Doiron, S., Bernatchez, L. & Blier, P.U. (2002). A comparative mitogenomic analysis of the potential adaptive value of Arctic charr mtDNA introgression in brook charr

populations (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1902-1909.

Dowling, T.E. & Secor, C.L. (1997). The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 593-619.

Duchesne, P. & Bernatchez, L. (2007). Individual-based genotype methods in aquaculture. In: *Aquaculture genome technologies* (Liu, Z.J. ed). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 551 p.

Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M. & Chevassus, B. (2002). Optimization of factorial mating designs for inference on heritability in fish species. *Aquaculture* **204**, 361-370.

Edmands, S. (2002). Does parental divergence predict reproductive compatibility ? Review in *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 520-527.

Ellison, C.K. & Burton, R.S. (2006). Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution* **7**, 1382-1391.

Ellison, C.K. & Burton, R.S. (2008). Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* **62**, 631-638.

Estabrook, R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods in Enzymology* **10**, 41-47.

Falk-Petersen, I.B., Hansen, T.K., Fieler, R. & Sunde, L.M. (1999). Cultivation of the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen) - a new candidate for cold-water fish farming. *Aquaculture Research* **30**, 711-718.

Falk-Petersen, I.B. & Hansen T.K. (2003). Early ontogeny of the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Aquaculture Research* **34**, 1059-1067.

Foss, A., Evensen, T.H., Imsland, A.K. & Oiestad, V. (2001). Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology* **59**, 416-426.

Foss, A., Imsland, A.K., Falk-Petersen, I.B. & Oiestad, V. (2004). A review of the culture of spotted wolffish *Anarhichas minor* Olafsen. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **14**, 277-294.

Funge-Smith, S. (2001). Opportunities and constraints related to the development of aquaculture systems based on indigenous Mekong fish species. Mekong River Commission for sustainable development. Annual Report. MRC, Phnom Penh, Cambodia. 18 p.

Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A. & Remohi, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology* **6**, 59-65.

Gaudreau, C.M. (2008). Caractérisation de l'hybride de loup de mer, *Anarhichas minor* × *A. lupus* : performances et fonctionnalité mitochondriale. Mémoire présenté comme exigence partielle du programme de Maîtrise en Océanographie à l'Université du Québec à Rimouski. Rimouski, QC., 113 p.

Gaudreau, C.M., Le François, N.R., Tveiten, H. & Blier, P.U. (submitted a). mtDNA divergence and mitochondrial functions: insights from hybridization between *Anarhichas minor* and *A. lupus*. *Journal of Experimental Zoology - Part B*.

Gaudreau, C.M., Le François, N.R., Ditlecadet, D., Tveiten, H. & Blier, P.U. (submitted b). A first assessment of the wolffish hybrid *Anarhichas minor* × *A. lupus*: conservation and aquaculture applications. Aquatic Living Resources.

Guderley, H. (2004). Metabolic responses to low temperature in fish muscle. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society **79**, 409-427.

Guelpen, L.V., Pohle, G.W. & Chmura, G.L. (2005). Impacts of sea surface temperature changes on marine fish species in the Northwest Atlantic. In: *Implications of a 2°C global temperature rise for Canada's natural resources*. World Wildlife Fund for Nature, Report pp. 22-51. http://assets.panda.org/downloads/2_degrees.pdf.

Griffiths, A.J.F., Miller J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M. (2002). Introduction à l'analyse génétique. 3^e édition. Traduction de la 7^e édition américaine. De Boeck Université. Paris. France. 860 p.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41**, 95-98.

Hansen, T.K. & Falk-Petersen, I.B. (2001). The influence of rearing temperature on early development and growth of spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen). Aquaculture Research **32**, 369-378.

Hansen, T.K. & Falk-Petersen, I.B. (2002). Growth and survival of first-feeding spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) at various temperature regimes. Aquaculture Research **33**, 1119-1127.

Harper, F.M. & Hart, M.W. (2005). Gamete compatibility and sperm competition affect paternity and hybridization between sympatric *Asteria* sea stars. *Biological Bulletin* **209**, 113-126.

Heise, K., Puntarulo, S., Pörtner, H.O. & Abele, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* **134C**, 79-90.

Houlihan, D.F., McCarthy, I.D., Carter, C.G. & Martin, F. (1995). Protein turnover and amino acid flux in fish larvae. Mass rearing of juvenile fish, Bergen (Norway). ICES Marine Science Symposium **201**, 87-99.

Imsland, A.K., Foss, A., Sparboe, L.O. & Sigurdsson, S. (2006). The effect of temperature and fish size on growth and feed efficiency ratio of juvenile spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Journal of Fish Biology* **68**, 1107-1122.

Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Sparboe, L.-O., Øiestad, V. & Sigurdsson, S. (2007). Comparison of juvenile spotted wolffish, *Anarhichas minor*, growth in shallow raceways and circular tanks. *Journal of the World Aquaculture Society* **38**, 154-160.

Imsland, A.K., Stensland, K., Johansen, T., Le François, N.R., Lamarre, S.G., Naevdal, G. & Foss, A. (2008). Population genetic structure of the spotted wolffish, *Anarhichas minor* in the North Atlantic. *Open Journal of Marine Biology* **2**, 7-12.

Iwamatsu, T., Yoshiazaki, N. & Shibata, Y. (1997). Changes in the chorion and sperm entry into the micropyle during fertilization in the teleostean fish, *Oryzias latipes*. *Development, Growth and Differentiation* **39**, 33-41.

Jansson, H., Holmgren, I., Wedin, K. & Andersson, T. (1991). High frequency of natural hybrids between Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*S. trutta*) in a Swedish River. *Journal of Fish Biology* **39A**, 343–348.

Johnston, I.A., Guderley, H., Franklin, C.E., Crockford, T. & Kamunde, C. (1994). Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation? *Journal of Experimental Biology* **195**, 293-306.

Johnstone, K.A., Marshall, H.D. & Carr, S.M. (2007). Biodiversity genomics for species at risk: patterns of DNA sequence variation within and among complete mitochondrial genomes of three species of wolffish (*Anarhichas* spp.). *Canadian Journal of Zoology* **85**, 151-158.

Keats, D.W., South, G.R. & Steele, D.H. (1985). Reproduction and egg guarding by Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*: Anarhichadidae) and ocean pout (*Macrozoarces americanus*: Zoarcidae) in Newfoundland waters. *Canadian Journal of Zoology* **63**, 2565-2568.

Kime, D.E. & Tveiten, H. (2002). Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology* **61**, 1549-1559.

Kingston, J.J. & Gwilliam, J. (2007). Hybridization between two sympatrically breeding species of fur seal at Iles Crozet revealed by genetic analysis. *Conservation Genetics*. **8**, 1133-1145.

Kulka, D.W. (2002). Reporting wolffish by species in the NAFO regulatory area. Northwest Atlantic Fisheries Organization - Scientific council meeting - June 2002. NAFO SCR Doc. 02/64.

Kulka, D., Hood, C. & Huntington, J. (2007). Recovery strategy for Northern wolffish (*Anarhichas denticulatus*) and spotted wolffish (*Anarhichas minor*), and management plan for Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) in Canada. Fisheries and Oceans Canada: Newfoundland and Labrador region. St-John's (NL), 103 pp. (<http://www.sararegistry.gc.ca/>).

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (1993). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis. Version 1.01. Pennsylvania State University, University Park.

Lamarre, S.G., Le François, N.R., Falk-Petersen, I.-B. & Blier, P.U. (2004). Can digestive and metabolic enzyme activity levels predict growth rate and survival of newly hatched Atlantic wolffish? *Aquaculture Research* **35**, 608-613.

Lamarre, S.G., Le François, N.R., Lemieux, H., Falk-Petersen, I.B. & Blier, P.U. (2007). The digestive and metabolic enzyme activity profiles of a nonmetamorphic marine fish species: effects of feed and feeding level. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **64**, 849-856.

Lannig, G., Eckerle, L.G., Serendero, I., Sartoris, F.-J., Fischer, T., Knust, R., Johansen, T. & Pörtner, H.O. (2003). Temperature adaptation in eurythermal cod (*Gadus morhua*): a comparison of mitochondrial enzyme capacities in boreal and Arctic populations. *Marine Biology* **142**, 589-599.

Larocque, R., Gendron, M.-H. & Dutil, J.-D. (2008). A survey of wolffish (*Anarhichas* spp.) and wolffish habitat in Les Méchins, Quebec. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2786 : vi + 29 p.

Le François, N.R., Lemieux, H. & Blier, P.U. (2002). Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture. *Aquaculture Research* **33**, 95-108.

Le François, N.R., Desjardins, M. & Blier, P.U. (2004a). Enhancement of profitability perspective of wolffish cultivation by the extraction of high value biomolecules. In *Seafood quality and safety: advances in the new millennium* (Éds. Shahidi, F. and Simpson, B.K.) St. John's (T.-N., Canada). Science tech publishing. pp. 61-69.

Le François, N.R., Lamarre, S.G. & Blier, P.U. (2004b). Tolerance growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) to low and intermediate salinities. *Aquaculture* **236**, 659-675.

Le François, N.R., Lamarre, S.G., Tveiten, H., Blier, P.U. & Bailey, J. (2008). Sperm cryoconservation in *Anarhichas* sp., endangered cold-water aquaculture species with internal fertilization. *Aquaculture International* **16**, 273-279.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005). *Principles of biochemistry*. Freeman, New York, USA. 1119 p.

Lemieux, H., Le François, N.R. & Blier, P.U. (2003). The early ontogeny of digestive and metabolic enzyme activities in two commercial strains of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Experimental Zoology* **299A**, 151-160.

Lenz, A.G., Costabel, U., Shaltiel, S. & Levine, R.L. (1989). Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Analytical Biochemistry* **177**, 419-425.

Long, J., Wang, X., Gao, H., Liu, Z., Liu, C., Miao, M. & Liu, J. (2006). Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Life Sciences* **79**, 1466–1472.

Loy, A. Bronzi, P. & Molteni, S. (1999). Geometric morphometrics in the characterization of the cranial growth pattern of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 50-53.

Lucassen, M., Koschnick, N., Eckerle, G. & Pörtner, H.O. (2006). Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2462-2471.

Luhmann, M. (1954). Über intermediäre Formen zwischen *Anarhichas minor* Olafs. und *A. lupus* L. (Teleostei). *Ber. Dtsch. Wiss. Komm. Meeresforsch* **13**, 310-326. (Journal of the Fisheries Resources Board of Canada, translation serial no.1812 (1971))

Luschak, V.I. & Bagnyukova, T.V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143C**, 30-35.

Lutz, C.G. (2001). *Practical genetics for Aquaculture*. Blackwell Publications, Oxford, UK. 235 p.

Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* **45**, 622-629.

Mandavilli, B.S., Santos, J.H. & Van Houten, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research* **509**, 127-151.

Martinez, M., Dutil, J.D. & Guderley, H. (2000). Longitudinal and allometric variation in indicators of muscle metabolic capacities in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Experimental Zoology* **287**, 38-45.

McCarthy, I.D., Moksness, E., Pavlov, D.A. & Houlihan, D.F. (1999). Effects of water temperature on protein synthesis and protein growth in juvenile Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* **56**, 231-241.

McCartney M.A. & Lessios, H.A. (2002). Quantitative analysis of gametic incompatibility between closely related species of neotropical sea urchins. *Biological Bulletin* **202**, 166-181.

McClary, D.J. & Sewell, M.A. (2003). Hybridization in the sea: gametic and developmental constraints on fertilization in sympatric species of *Pseudechinus* (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **284**, 51-70.

McClelland, E.K. & Naish, K.A. (2007). What is the fitness outcome of crossing unrelated fish populations? A meta-analysis and an evaluation of future research directions. *Conservation Genetics* **8**, 397-416.

McCusker, M.R., Patersen, I.G. & Bentzen, P. (2008). Microsatellite markers discriminate three species of North Atlantic wolffishes (*Anarhichas* spp.). *Journal of Fish Biology* **72**, 375-385.

McKenzie, M., Chiotis, M., Pinkert, C.A. & Trounce, I.A. (2003). Functional respiratory chain analyses in murid xenomitochondrial cybrids expose coevolutionary constraints of cytochrome *b* and nuclear subunits of complex III. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1117-1124.

Meraner, A., Baric, S. & Dalla Via, J. (2008). The selection of the « wild »: a combined molecular approach for the identification of pure indigenous fish from hybridised populations. *Comparative Biochemistry and Physiology* **3D** 36-42.

Merritt, T.J.S., Sezgin, E., Zhu, C.-T. & Eanes, W.F. (2006). Triglyceride pools, flight and activity variation at the Gpdh locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **172**, 293-304.

Metcalf, J.L., Siegle, N.R. & Martin, A.P. (2008). Hybridization dynamics between Colorado's native cutthroat trout and introduced rainbow trout. *Journal of Heredity Advance* **99**, 149-156.

Metz, E.C. Kane, R.E., Yanagimachi, H. & Palumbi, S.R. (1994). Fertilization between closely related sea urchins is blocked by incompatibilities during sperm-egg attachment and early stages fusion. *Biological Bulletin* **187**, 23-34.

Mitchell, M. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

Moksness, E. (1994). Growth rate of the common wolffish, *Anarhichas lupus* L., and spotted wolffish, *A. minor* Olafsen, in captivity. *Aquaculture and Fisheries Management* **25**, 363-371.

Moksness, E. & Pavlov, D.A. (1996). Management by life cycle of wolffish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold-water aquaculture: a technical paper. *Aquaculture Research* **27**, 865-883.

Mortensen, A., Toften, H. & Aas, K. (2007). Cage culture of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Aquaculture* **264**, 475-478.

Nordeide, J.T. (2007). Is there more in gamete « quality » than quality of the gametes? A review of effects of female mate choice and genetic compatibility on offspring quality. *Aquaculture Research* **38**, 1-16.

O'Dea, N.R. & Haedrich, R.L. (2000). COSEWIC status report on the Atlantic wolffish *Anarhichas lupus* in Canada, in COSEWIC assessment and status report on the Atlantic wolffish *Anarhichas lupus* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 1-21 p.

O'Dea, N.R. & Haedrich, R.L. (2001a). COSEWIC status report on the spotted wolffish *Anarhichas minor* in Canada, in COSEWIC assessment and status report on the spotted wolffish *Anarhichas minor* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 1-22 p.

O'Dea, N.R. & Haedrich, R.L. (2001b). COSEWIC status report on the Northern wolffish *Anarhichas denticulatus* in Canada, in COSEWIC assessment and status report on the spotted wolffish *Anarhichas denticulatus* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 1-22 p.

Okamura, A., Zhang, H., Utoh, T., Akazawa, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S. & Oka, H.P. (2004). Artificial hybrid between *Anguilla anguilla* and *A. japonica*. *Journal of Fish Biology* **64**, 1450-1454.

Orr, W.C. & Sohal, R.S. (1992). The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **297**, 35-41.

- Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 547-572.
- Papousek, I., Vetesnik, L., Halacka, K., Luskova, V., Humpl, M. & Mendel, J. (2008). Identification of natural hybrids of gibel carp *Carrassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian carp *Carrassius carrassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic). *Journal of Fish Biology* **72**, 1230-1235.
- Paspatis, M., Markakis, G., Koumoundouros, G. & Kentouri, M. (1999). Preliminary results on rearing of *Sparus aurata* × *Pagrus pagrus* hybrids: performance comparison with the parental species. *Aquaculture international* **7**, 295-306.
- Pavlov, D.A. & Moksness, E. (1996). Repeat sexual maturation of wolffish (*Anarhichas lupus* L.) broodstock. *Aquaculture* **139**, 249-263.
- Pavlov, D.A., Knudsen, P., Emel'yanova, N.G. & Moksness, E. (1997). Spermatozoon ultrastructure and sperm production in wolffish (*Anarhichas lupus*), a species with internal fertilization. *Aquatic Living Resource* **10**, 187-194.
- Payne, R.H., Child, A.R. & Forrest, A. (1972). The existence of natural hybrids between the European trout and the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* **4**, 223-236.
- Pelletier, D., Guderley, H. & Dutil, J.-D. (1993). Does aerobic capacity of fish muscle change with growth rates? *Fish Physiology and Biochemistry* **12**, 83-93.
- 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*. *Journal of Comparative Physiology* **164B**, 173-190.

- Pelletier, D., Blier, P.U., Dutil, J.D. & Guderley, H. (1995). How should enzyme-activities be used in fish growth-studies. *Journal of Experimental Biology* **198**, 1493-1497.
- Pham, L., Dahira, R. & Rubinsky, B. (1999). An in vivo study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery. *Cryobiology* **38**, 169–175.
- Pörtner, H.O. (2002). Physiological basis of temperature dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. *Journal of Experimental Biology* **205**, 2217-2230.
- Pörtner, H.O., Van Dirfk, P.L.M., Hardewig, I. & Somero, A. (2000). Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In *Antarctic ecosystems: models for wider ecological understanding* (Eds. Davison, W., Howard-Williams, C. and Borady, P., Caxton Press, Christchurch New-Zealand. pp.109-122)
- Pörtner, H.O, Bennett, A.E, Bozinovic, F., Clare, A., Lardies, M.A., Lucassen, M., Pelster, B., Schiemer, F. & Stillman, J.H. (2006). Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. *Physiology and Biochemistry in Zoology* **79**, 295-313.
- Refstie, T. (1990). Application of breeding schemes. *Aquaculture* **85**, 163-169.
- Refstie, T. & Gjedrem, T. (1975). Hybrids between salmonidae species. Hatchability and growth rate in the freshwater period. *Aquaculture* **6**, 333-342.
- Richtsmeir, J.T. Burke-Deleon, V. & Lele, S.R. (2002). The promise of geometric morphometrics. *Yearbook of Physical Anthropology* **45**, 63-91.

Rieseberg, L.H., Archer M.A. & Wayne, R.K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* **83**, 363-372.

Roques, S. Sevigny, J.M. & Bernatchez, L. (2001). Evidence for broadscale introgressive hybridization between two redbfish (genus *Sebastes*) in the Northwest Atlantic: a rare marine exemple. *Molecular Ecology* **10**, 149-165.

Rosenfield, J.A. & Kodric-Brown, A. (2003). Sexual selection promotes hybridization between Pecos pupfish, *Cyprinodon pecosensis* and sheepshead minnow, *C. variegates*. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 595-606.

Rosenfield, J.A., Nolasco, S., Lindauer, S., Sandoval, C. & Kodric-Brown, A. (2004). The role of hybrid vigor in the replacement of pecos pupfish by its hybrids with sheepshead minnow. *Conservation Biology* **18**, 1589-1598.

Rubidge, E.M. & Taylor, E.B. (2004). Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology*, **13**, 3735-3749.

Sackton, T.B., Haney, R.A. & Rand, D.M. (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome *c* oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution* **57**, 2315-2325.

Savoie, A., Le François, N.R., Cahu, C., Blier, P.U. & Andreassen, I. (2006). Do protein hydrolysate improve survival and growth of newly-hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*), a non-metamorphic aquaculture fish species. *Aquaculture* **261**, 782-788.

Savoie, A., Le François, N.R., Cahu, C. & Blier, P.U. (2008). Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effect of temperature. *Aquaculture Research* **39**, 382-389.

Scott, W.B. & Scott, M.G. (1988). *Atlantic Fishes of Canada*. Canadian Bulletin of Fish Aquatic Science 219. 731 p.

Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 198-207.

Servedio, M.R. (2004). The what and why of research on reinforcement. *PLoS Biology* **2**, 2032-2035.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: introduction. In : Sies, H. (Ed.), *Oxidative Stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 21-48.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, M.D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals in Biochemistry* **150**, 76-85.

Sohal, R.S., Arnold, L. & Orr, W.C. (1990). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP and NADH/NAD in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* **56**, 223-235.

Somero, G.N. & Childress, J.J. (1980). A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger-size fish. *Physiological Zoology* **53**, 322-337.

Staniek, K. & Nohl, H. (1999). H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochemistry, Biophysics and Bioenergetics* **1413**, 70-80.

Sun, J.T. & Tower J. (1999). FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 216-228.

Templeman, W. (1984). Vertebral and dorsal fin-ray numbers in Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) of the Northwest Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* **5**, 207-212.

Templeman, W. (1986). Spotted forms of the Northern wolffish (*Anarhichas denticulatus*). *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Science* **7**, 77-80.

Thibeault, M., Blier, P.U. & Guderley, H. (1997). Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 139-155.

Turelli, M. & Orr, H.A. (2000). Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* **154**, 1663-1679.

Turner, G.F. (1999). What is a fish species? Review in *Fish Biology and Fisheries* **9**, 281-297.

Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* **552**, 335-344.

Tveiten, H. & Johnsen, H.K. (1999). Temperature experienced during vitellogenesis influences ovarian maturation and the timing of ovulation in common wolffish. *Journal of Fish Biology* **55**, 809-819.

Tveiten, H., Solevag S.E. & Johnsen H.K. (2001). Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolffish *Journal of Fish Biology* **58**, 374–385.

Urbach, D. Folstad, I. & Rudolfsen G. (2005). Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behavioral Ecology and Socio-biology* **57**, 438-444.

Valentin, A. Sevigny, J.M. & Chanut, J.P. (2002). Geometric morphometrics reveals body shape differences between sympatric redfish *Sebastes mentella*, *Sebastes fasciatus* and their hybrids in the Gulf of St Lawrence. *Journal of Fish Biology* **60**, 857-875.

Verspoor, E. & Hammar, J. (1991). Introgressive hybridization in fishes: the biochemical evidence. *Journal of Fish Biology* **39A**, 309–334.

Vickers, T., Young, I.S. & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* **29**, 358–62.

Wang, J. & Xia D. (2002). Studies on fish heterosis with DNA fingerprinting. *Aquaculture Research* **33**, 942-947.

Ward, R.D. (2006). The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research* **80**, 9-18.

Wilson, J. Le François, N., Blier, P., Dufresne, F., Roy, R. & Halfyard, L. Structural efforts for pilot scale operation of spotted wolffish: a step toward commercialization stage. [En ligne] <http://www.aquanet.ca/English/research/as3.php> (page consultée le 8 avril 2008).

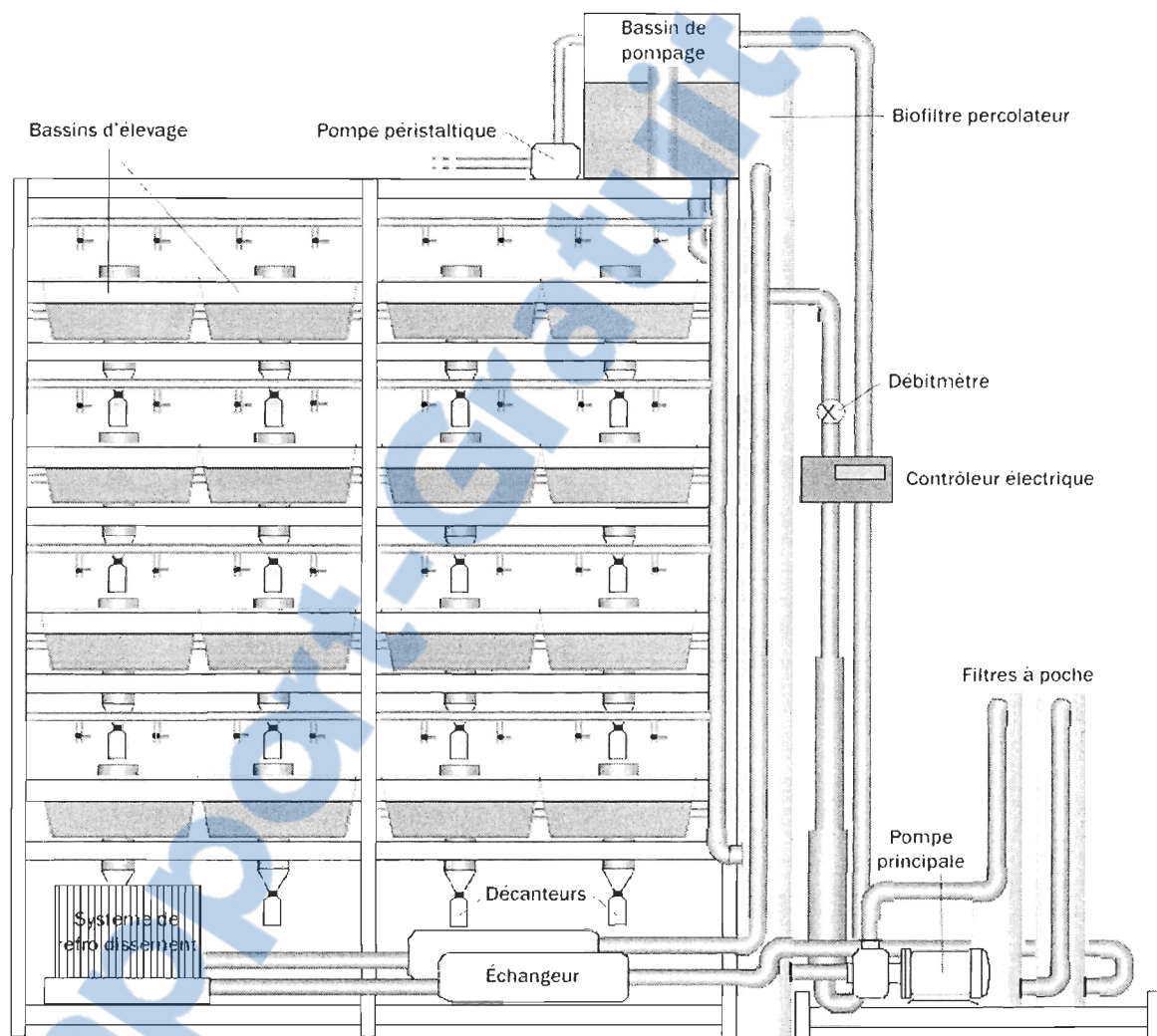
Yarian, C.S., Toroser, D. & Sohal, R.S. (2006). Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mechanisms of Ageing Development* **127**, 79–84.

Ying, W. (2008). NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants and Redox Signaling* **10**, 179-205.

Young, J.A., Smith, A. & Muir, J.F. (1999). Market analysis using multiple correspondence analysis: the case of consumer acceptance of African catfish. *Aquaculture Research* **27**, 283-291.

ANNEXES

ANNEXE 1



Représentation schématique d'une des deux unités du système en recirculation conçue par Aquabiotech Inc. (QC, Canada). L'unité est montrée en vue frontale.

