

**TOLÉRANCE ET RÉPONSE PHYSIOLOGIQUE
DES CIVELLES PIGMENTÉES DE L'ANGUILLE D'AMÉRIQUE
(*ANGUILLA ROSTRATA*)
FACE À L'HYPOXIE EN EAU DOUCE**

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
ET DE LA RECHERCHE EN VUE DE L'OBTENTION
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES EN BIOLOGIE

ANNIE SARAH LAVOIE-ROCHON

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE MONCTON
OCTOBRE 2025

COMPOSITION DU JURY

<i>Président du Jury</i>	Dr Luc J. Martin, Ph. D. Département de Biologie <i>Université de Moncton, Moncton, N.-B.</i>
<i>Directeur de thèse</i>	Dr Simon G. Lamarre, Ph. D. Département de Biologie <i>Université de Moncton, Moncton, N.-B.</i>
<i>Examinatrice interne</i>	Dre Marianna E. Horn, Ph. D. Département de Biologie <i>Université de Moncton, Moncton, N.-B.</i>
<i>Examinatrice externe</i>	Dre Céline Audet, Ph. D. Institut des sciences de la mer <i>Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Qc</i>

REMERCIEMENTS

Merci à mon superviseur Simon Lamarre de m'avoir accueillie au *Labo Lamarre* dès 2018 et d'avoir accepté d'entreprendre ce projet de maîtrise en janvier 2021, au plein cœur de la pandémie. J'ai toujours grandement apprécié nos échanges sur la biologie, oui, mais aussi sur la plomberie et les systèmes électriques, sans oublier les partages de recettes de kimchi et les recommandations de groupes musicaux lors des longs déplacements en voiture. Merci de ta présence pendant tout ce temps, je t'apprécie beaucoup. J'espère que dans un proche avenir, tu auras toi aussi plus de temps pour *aller jouer dehors* !

Je remercie très chaleureusement Alyre Chiasson (et ses pains au chocolat d'encouragements) et qu'Anne-Marie Dion-Côté de leur aide et de leurs conseils, notamment lors de mes moments de doutes. En plus d'être membres de mon *Comité Consultatif de Thèse*, vous avez également été des membres inestimables de mon « *Comité Consultatif de Santé Mentale* ». Vous avez toujours cru en moi et gardé mon meilleur intérêt à cœur, qu'importe la situation. Je n'aurais pas fini cette thèse sans vous. Merci. Vraiment.

J'aimerais remercier Céline Audet, mon évaluatrice externe, ainsi que Marianna Horn, mon évaluatrice interne, pour le temps que vous m'accordez : je l'apprécie énormément. Merci aussi à Luc Martin d'avoir accepté de présider mon Jury de thèse. Je remercie également mes collègues qui m'ont encouragée et soutenue au cours de ces dernières années : merci !

Un merci tout spécial à mon conjoint Loïck, sans qui les cinq dernières années auraient été carrément insoutenables. Tu as su être mon ancre *et* mon phare dans la tempête : le bateau ne se serait pas rendu en un seul morceau sans toi. Merci de ton grand cœur, de ta patience (qui ne fait que grandir), de ta gentillesse et de ta générosité infinie. Je t'aime beaucoup, merci de partager ta vie avec la mienne. Merci également à Merlin, mon petit chat de lumière, d'amour et de joie, d'exister et de faire partie de mon quotidien.

De plus, mille mercis à mes parents et à Noémie (ma cousine de sang, mais ma sœur de vie), pour leur appui, leur amour inconditionnel et leur patience. Dans la même veine, merci à Alyssa pour sa constance et son aide. Merci aussi à Ashley, Chloé, Claude et Antoine de leur soutien calme et continu. De plus, merci à ma famille élargie pour sa compréhension lors de ces dernières années : j'ai hâte de pouvoir vous voir plus souvent !

SOMMAIRE

Le changement climatique et les perturbations d'origine anthropique exposent les espèces de poissons d'eau douce à une fréquence et une intensité accrue de facteurs de stress, tels que l'hypoxie environnementale. Malgré son importance écologique, socio-économique et culturelle, l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) est une espèce menacée et en déclin qui fait face à de nombreux éléments stressants environnementaux lors de son cycle de vie long et complexe. Cette thèse examine la réponse physiologique des civelles de l'anguille d'Amérique à l'hypoxie aiguë en eau douce, dans le but d'évaluer si leur tolérance à ce stade développemental pourrait fournir des pistes sur les facteurs contribuant au déclin de l'espèce. Notre hypothèse était que les civelles sont intolérantes à l'hypoxie à cause de leur haute demande métabolique et de leur capacité limitée pour l'utilisation soutenue de la production anaérobie d'ATP, toutes deux découlant de leur petite taille corporelle. Pour examiner ceci, des civelles (≤ 7 cm) ont été exposées à 8 heures d'hypoxie, soit graduelle (saturation en air minimale de 15 %) ou constante (saturation en air d'environ 20 %), en eau douce. La consommation en oxygène ($\dot{M}O_2$), la charge énergétique des adénylate (AEC), le ratio phosphocréatine/créatine (PCr/Cr), la concentration de lactate et le taux de synthèse relatif des protéines (PSR relatif) ont été comparés entre les groupes de traitements normoxiques et hypoxiques. Bien que le métabolisme anaérobie ait été activé, les ratios d'AEC et de PCr/Cr sont demeurés stables, et aucune dépression métabolique ni réduction du taux de synthèse protéique relative (PSR) n'a été détectée. Nos résultats montrent que les civelles de l'anguille d'Amérique tolèrent l'hypoxie aiguë à court terme en eau douce, bien que des conditions plus extrêmes lors de tests préliminaires aient été fatales pour certains individus. Cette limitation pourrait indiquer une sensibilité accrue des civelles face à des conditions environnementales extrêmes en nature. Bien que la réponse à l'hypoxie observée ici soit limitée par les paramètres expérimentaux, elle contribue à une meilleure compréhension de la physiologie des civelles soumises à un stress hypoxique.

Mots clés : Métabolisme des poissons, écophysiologie, désoxygénation, équilibre énergétique, tolérance

ABSTRACT

Climate change and anthropogenic disturbances are exposing freshwater fish species to increasingly frequent and severe stressors, such as environmental hypoxia. Despite its ecological, socio-economic, and cultural significance, the American eel (*Anguilla rostrata*) is a declining and threatened species, facing numerous environmental stressors throughout its long and complex life cycle. This thesis investigates the physiological response of American eel elvers to acute freshwater hypoxia, with the aim of assessing whether their tolerance at this developmental stage may offer insight into factors contributing to the species' decline. We hypothesized that juvenile eels are intolerant to hypoxia due to their elevated metabolic demands and limited capacity for sustained anaerobic ATP production, both stemming from their small body size. To examine this, elvers (≤ 7 cm) were exposed to 8 hours of either graded hypoxia (minimum air saturation of 15%) or constant hypoxia (approximately 20% air saturation) in fresh water. Whole-body oxygen consumption ($\dot{M}O_2$), adenylate energy charge (AEC), phosphocreatine/creatinine ratio (PCr/Cr), lactate concentration, and relative protein synthesis rate (PSR) were compared between normoxic and hypoxic treatment groups. Although anaerobic metabolism was activated, both AEC and PCr/Cr ratios remained stable and no signs of metabolic depression or reduction in relative PSR were detected. Our findings suggest that young American eel elvers exhibit a degree of short-term tolerance to acute freshwater hypoxia, although preliminary trials indicate that exposure to more extreme conditions can be fatal for many individuals. However, the observed lack of plasticity in $\dot{M}O_2$ and relative PSR regulation may reflect a physiological vulnerability, potentially placing elvers at risk when such acute conditions arise in natural environments. While the hypoxia response documented here is constrained by the experimental parameters of this study, it nonetheless contributes to a deeper understanding of elver physiology under hypoxic stress.

Keywords: Fish metabolism, ecophysiology, deoxygenation,
energy balance, tolerance

TABLE DES MATIÈRES

COMPOSITION DU JURY	ii
REMERCIEMENTS	iii
SOMMAIRE	iv
ABSTRACT	v
LISTE DES FIGURES	ix
AVANT-PROPOS	x
CHAPITRE I Introduction générale	1
1.1 Dynamisme du milieu aquatique	2
1.1.1 Climat perturbé et instable.....	2
1.1.2 Hypoxie environnementale.....	3
1.2 Mécanismes physiologiques des poissons	3
1.2.1 Métabolisme et budget énergétique	3
1.2.2 Gestion du métabolisme énergétique lors de l'hypoxie	5
1.2.3 Voies anaérobies chez les poissons	6
1.2.4 Voies alternatives de conservation de l'énergie.....	7
1.3 <i>Anguilla rostrata</i> : une espèce indicatrice de nos régions	8
1.3.1 Aire de répartition, cycle de vie et migrations	8
1.3.2 Habitat post-migratoire des civelles : choix et préférences	10
1.3.3 Réponse physiologique des anguilles face à l'hypoxie	11
1.3.4 Contexte socio-économique et statut de l'espèce	12
1.4 Objectifs et portée de ce projet	13
CHAPITRE II Physiological response of American eel elvers (<i>Anguilla rostrata</i>) to acute freshwater hypoxia	15
2.1 Abstract	17
2.2 Introduction	18
2.3 Materials and Methods	21
2.3.1 Animal care	21
2.3.2 Experimental protocols	21
2.3.2.1 <i>Experiment 1: Intermittent-flow respirometry during graded hypoxia</i>	22
2.3.2.2 <i>Experiment 2: Energetic pathways during exposition to stable hypoxia</i>	23
2.3.3 Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2).....	24

2.3.3.1 <i>General sample preparation</i>	24
2.3.4 Rate of protein synthesis (E2).....	24
2.3.4.1 <i>Validation</i>	24
2.3.4.2 <i>Sample preparation</i>	25
2.3.5 Data processing and statistical analyses.....	26
2.3.5.1 <i>MO₂ during graded hypoxia (E1)</i>	26
2.3.5.2 <i>Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)</i>	27
2.3.5.3 <i>Relative PSR (E2)</i>	29
2.4 Results	30
2.4.1 <i>MO₂ during graded hypoxia (E1)</i>	30
2.4.1.1 <i>Generalized additive model (GAM)</i>	30
2.4.1.2 <i>Two-way ANOVA</i>	30
2.4.2 <i>Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)</i>	33
2.4.2.1 <i>Adenylate Energy Charge</i>	33
2.4.2.2 <i>Creatine phosphate/Creatine ratio</i>	35
2.4.2.3 <i>Lactate concentration</i>	36
2.4.2.4 <i>Link between lactate and PCr/Cr</i>	37
2.4.3 <i>Relative Protein Synthesis Rate (E2)</i>	38
2.5 Discussion	39
2.5.1 <i>MO₂ remains largely unaffected during graded hypoxia (E1)</i>	39
2.5.2 <i>Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)</i>	40
2.5.2.1 <i>Energetic status seems to be kept stable</i>	40
2.5.2.2 <i>Protein synthesis rate is maintained under stable hypoxia</i>	42
2.5.3 <i>Conclusion</i>	43
2.6 Acknowledgements	44
2.7 Competing interests	44
2.8 Author contributions	44
2.9 Funding	44
2.10 Supplementary figures	45
CHAPITRE III Discussion générale	47
3.1 Retour global sur les objectifs	48
3.2 Réponse des civelles face à l'hypoxie	49
3.2.1 <i>Gestion du métabolisme énergétique</i>	49
3.2.2 <i>Indices de patrons comportementaux chez les civelles</i>	51

3.2.3 L'importance des variations inter-individuelles.....	53
3.3 L'avenir d'<i>Anguilla rostrata</i> face à l'hypoxie	54
3.3.1 Impact potentiel sur la dynamique de la population.....	54
3.3.2 Éléments stressants supplémentaires à considérer	56
3.4 Conclusion : <i>les poissons, ça vit dehors</i>	58
RÉFÉRENCES.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 – Budget énergétique simplifié d’un poisson.....	4
Figure 1.2 – Aire de répartition et patron migratoire de l’anguille d’Amérique (<i>Anguilla rostrata</i>) au Canada.	9
Figure 1.3 – Cycle de vie de l’anguille d’Amérique (<i>Anguilla rostrata</i>) et d’Europe (<i>Anguilla anguilla</i>).....	10
Figure 2.1 – Individual elver $\dot{M}O_2$ values during graded hypoxia trials, modeled using a generalized additive model (GAM)	31
Figure 2.2 – Mean $\dot{M}O_2$ (\pm SD) values measured via intermittent respirometry, presented for each experimental trial phase, across treatment groups (normoxia and hypoxia)	32
Figure 2.3 – Adenylate energy charge means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia.....	33
Figure 2.4 – Correlations between whole elver adenylate energy charge and eel mass	34
Figure 2.5 – Whole elver PCr/Cr ratio means (\pm SD) in fish exposed to normoxia or hypoxia	35
Figure 2.6 – Lactate concentration means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia.....	36
Figure 2.7 – Correlation between Log-transformed lactate concentration and PCr/Cr ratio on whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia.....	37
Figure 2.8 – Relative protein synthesis rate (relative PSR) means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia	38
Figure S1 – Custom respirometry system design.....	45
Figure S2 – Typical respiration trace of elvers in either normoxia or hypoxia	46

AVANT-PROPOS

Cette thèse par article a été réalisée sous la supervision de Simon Lamarre, dans le but d'obtenir le diplôme de maîtrise ès Sciences en Biologie de l'Université de Moncton (N.-B., Canada).

J'ai mené l'ensemble des travaux de cette thèse, avec le soutien de Simon Lamarre, Alyre Chiasson et Loïck Ducros. J'ai notamment assuré les soins aux animaux, participé activement à la conception du design expérimental, conçu les systèmes expérimentaux de respirométrie et d'exposition à l'hypoxie, effectué les manipulations au laboratoire humide, traité les échantillons, analysé les données et rédigé le manuscrit.

Les chapitres 1 et 3 ont été rédigés en français, comme l'exige la Faculté des Études Supérieures et de la Recherche (FESR) de l'Université de Moncton. Le chapitre 2 a été préparé et rédigé en anglais en vue d'une soumission en tant que publication dans une revue scientifique évaluée par les pairs.

CHAPITRE I
Introduction générale

1.1 Dynamisme du milieu aquatique

1.1.1 Climat perturbé et instable

Bien que le changement climatique soit souvent associé au réchauffement global de la planète, il engendre également une accentuation marquée de la variabilité climatique, tant dans l'espace que dans le temps (IPCC, 2001; Both et Marvelde, 2007; Brown *et al.*, 2016). Cette instabilité accrue des conditions environnementales est particulièrement préoccupante pour les milieux aquatiques, où les organismes sont étroitement dépendants des paramètres physico-chimiques de leur habitat. En ce sens, une intensification des épisodes extrêmes – oscillations rapides de température, fluctuations de l'oxygène dissous ou modifications soudaines du pH – pourrait avoir des effets plus perturbateurs que le danger seul de l'élévation progressive de la température moyenne associée au changement climatique (Kingsolver *et al.*, 2015; Morash *et al.*, 2018, 2021; Blewett *et al.*, 2022).

En zones tempérées, dès la période printanière, et tout au long de la saison estivale, voire parfois jusqu'au début de l'automne, les milieux aquatiques d'eau douce sont exposés à une intensification notable des variables stressantes environnementales. Notamment, cette période coïncide avec une hausse marquée des températures, une diminution de la solubilité de l'oxygène dans l'eau et une reprise importante des perturbations d'origines anthropiques. De plus, les facteurs environnementaux agissent rarement de façon isolée. Leurs effets se cumulent souvent, générant des interactions complexes et parfois imprévisibles sur le plan physiologique des organismes aquatiques (Crain *et al.*, 2008; Teichert *et al.*, 2018).

Parmi ces facteurs potentiellement stressants pour les organismes, les épisodes de désoxygénation dans l'eau (hypoxie) se distinguent par leur accroissement, à la fois en fréquence et en sévérité, dans de nombreux écosystèmes aquatiques (Diaz and Breitburg, 2009; Williams *et al.*, 2019). La compréhension des réponses adaptatives propres aux diverses espèces aquatiques face à ces pressions multiples devient ainsi essentielle pour évaluer leur vulnérabilité. Puisque les épisodes extrêmes tendent à se multiplier durant les mois chauds, soit une période critique pour de nombreuses fonctions biologiques, ce besoin s'accroît dans un contexte de plus grande imprévisibilité.

1.1.2 Hypoxie environnementale

La diminution de l'oxygène dissous dans l'eau, communément appelée hypoxie environnementale, constitue un événement à la fois naturel et récurrent dans les écosystèmes aquatiques (Nilsson et Renshaw, 2004; Behrens et Steffensen, 2007; Roesner *et al.*, 2008). Ce phénomène peut être le résultat de plusieurs facteurs environnementaux, notamment la prolifération saisonnière d'algues induite par l'eutrophisation, l'élévation des températures ou encore la stratification verticale de la colonne d'eau (Richards *et al.*, 2009).

Un milieu est considéré hypoxique lorsque la concentration en oxygène dissous (DO) atteint un seuil pouvant perturber les fonctions métaboliques normales des organismes tels les poissons (Farrell et Richards, 2009). Une valeur de référence fréquemment utilisée pour caractériser une hypoxie sévère est de 2 mg/L (Rabalais, 2009). Toutefois, la sensibilité à l'hypoxie varie considérablement d'une espèce de poisson à l'autre (tolérance interspécifique), mais également au sein d'une même espèce (intraspécifique), en fonction de la population, de l'individu ou du stade de développement (Diaz et Breitburg, 2009).

1.2 Mécanismes physiologiques des poissons

1.2.1 Métabolisme et budget énergétique

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se produisant au sein d'un organisme, en plus de refléter à la fois son état physiologique et sa gestion de l'énergie (Nelson, 2016; Treberg *et al.*, 2016). L'énergie issue de la digestion est en partie assimilée, puis allouée à différentes fonctions vitales ou dissipée sous forme de pertes. Ce processus dicte le budget énergétique disponible de l'organisme (Fig. 1.1), c'est-à-dire la portion d'énergie pouvant être consacrée à ses diverses fonctions biologiques (Brett et Groves, 1979; Treberg *et al.*, 2016).

L'adénosine triphosphate (ATP) occupe une place centrale au sein de ce budget, en permettant le transport de l'énergie sous forme chimique et en jouant le rôle de « monnaie d'échange énergétique ». Cette molécule essentielle, indispensable pour le fonctionnement des organismes vivants (Knowles, 1980; Nelson, 2016), est attribuée aux processus physiologiques selon une hiérarchie définie. En priorité, l'énergie est dirigée vers le maintien des fonctions vitales de base assurant la survie, telles que la régulation des

gradients ioniques, la maintenance des protéines cellulaires et la stabilité de l'ADN (Treberg *et al.*, 2016). L'énergie restante peut alors soit être utilisée pour d'autres besoins physiologiques ou soit mise en réserve, selon les exigences métaboliques propres à chaque organisme (Brett et Groves, 1979; Treberg *et al.*, 2016).

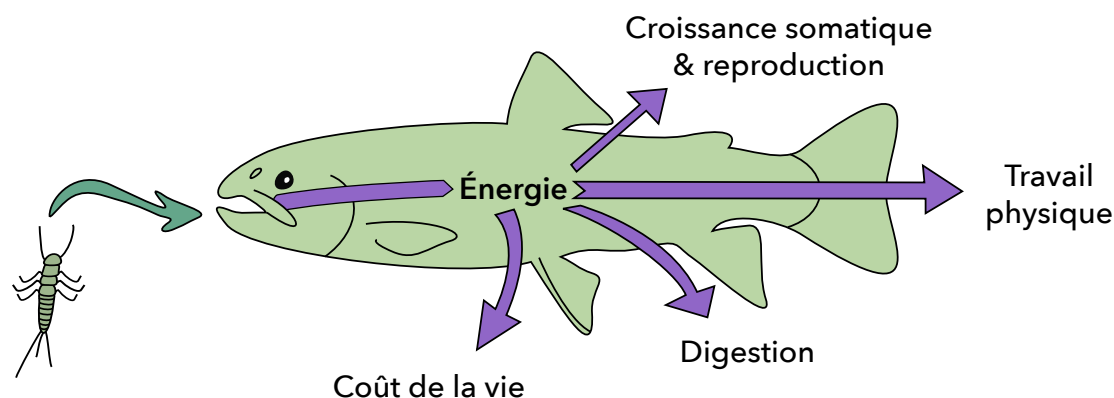


Figure 1.1 – Budget énergétique simplifié d'un poisson. Adaptée de Treberg *et al.* (2016).

Le maintien de l'équilibre du budget énergétique repose sur un ensemble de voies métaboliques régulant finement la production, l'utilisation et la conservation de l'adénosine triphosphate (ATP). Chez les poissons, le métabolisme aérobie constitue la principale voie de synthèse de l'ATP via la phosphorylation oxydative. Dans ce processus, l'oxygène agit comme accepteur final d'électrons au sein du système de transport des électrons (ETS) mitochondrial, via l'action de la cytochrome c oxydase (Hatefi, 1985).

Le métabolisme aérobie des poissons peut être quantifié en utilisant la consommation d'oxygène ($\dot{M}O_2$) comme approximation du taux métabolique (TM) (Chabot *et al.*, 2016; Rosewarne *et al.*, 2016; Rummer *et al.*, 2016; Treberg *et al.*, 2016). Cette méthode consiste à placer un poisson dans un volume d'eau connu et à mesurer sa consommation d'oxygène pendant un intervalle de temps défini. Les valeurs de $\dot{M}O_2$ obtenues reflètent généralement le TM de routine (RMR) (Chabot *et al.*, 2016). Le RMR comprend le TM standard (SMR), soit la dépense énergétique de base d'un poisson à jeun au repos, et la dépense d'énergie liée à l'activité sporadique, résultant des mouvements occasionnels aléatoires du poisson (Voutilainen *et al.*, 2011; Chabot *et al.*, 2016).

1.2.2 Gestion du métabolisme énergétique lors de l'hypoxie

En situation d'hypoxie, le métabolisme aérobie est perturbé. La réduction de l'oxygène dans l'habitat aquatique compromet le métabolisme mitochondrial en limitant la phosphorylation oxydative. En effet, la diminution de l'accepteur final d'électrons de l'ETS entraîne une chute du potentiel membranaire mitochondrial. L'activité de l'ATP synthase est ainsi réduite et la production d'ATP chute, ce qui peut mener à un déséquilibre du budget énergétique (Solaini *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2019).

Afin de compenser, les cellules peuvent activer des voies alternatives de régulation énergétique, notamment via la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), un capteur central du statut énergétique cellulaire (Hardie, 2018). Cette enzyme est activée lors d'une hausse de l'AMP issue d'un déséquilibre dans l'utilisation de l'ATP. L'AMPK entraîne alors une inhibition des voies anaboliques, notamment la synthèse des protéines, et une stimulation des voies cataboliques comme la glycolyse et l'oxydation lipidique, contribuant ainsi au rétablissement de l'homéostasie énergétique (Kim *et al.*, 2016).

L'équilibre relatif entre ces trois molécules d'adénylates (ATP : ADP : AMP), qui se situe généralement autour de 100 : 10 : 1 en conditions basales, constitue un indicateur de sensibilité du statut énergétique cellulaire (Lanning *et al.*, 2014). La charge énergétique des adénylates (AEC), soit un indice calculé à partir de ces concentrations relatives, est couramment utilisée pour évaluer l'effet métabolique d'un élément stressant environnemental sur un organisme (Atkinson, 1968, 1977; Vetter et Hodson, 1982). Une diminution de cette charge reflète un déséquilibre dans la gestion énergétique de l'organisme et un débalancement potentiel de l'homéostasie (Atkinson, 1968; Vetter et Hodson, 1982; Giesy, 1988).

Ainsi, chez les poissons, l'accès restreint à l'oxygène lors d'épisodes d'hypoxie peut devenir un facteur limitant critique susceptible de compromettre leur survie (Thomas *et al.*, 2019). La capacité à mobiliser des ajustements physiologiques face à l'hypoxie détermine ainsi non seulement la résilience individuelle, mais influence également la dynamique des populations d'espèces exposées à des environnements de plus en plus variables.

1.2.3 Voies anaérobies chez les poissons

Lorsque l'apport en ATP devient insuffisant pour répondre aux besoins énergétiques d'un poisson soumis à l'hypoxie, des voies métaboliques anaérobies peuvent être activées afin de maintenir, au moins temporairement, l'équilibre énergétique (Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008).

Parmi ces mécanismes, la phosphocréatine (PCr) constitue une réserve de phosphate énergétique dans l'organisme. Composée d'une molécule de créatine (Cr) liée à un groupe phosphate, la PCr permet la régénération immédiate de l'ATP à partir de l'ADP (Negrete *et al.*, 2024). Ce réservoir énergétique, localisé principalement dans les tissus musculaires (Kohlmeier, 2003), est mobilisé lors d'efforts intenses ainsi que lors des premiers stades d'un épisode d'hypoxie (van Waarde *et al.*, 1983; Kohlmeier, 2003; Negrete *et al.*, 2024). Une diminution du ratio PCr/Cr lors de telles conditions constitue ainsi un indicateur de l'activation de ce mécanisme compensatoire. Toutefois, son efficacité demeure limitée dans le temps et dépend étroitement de la réserve tissulaire disponible (van den Thillart *et al.*, 1980; Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008; Marcinek *et al.*, 2010).

À plus long terme, la glycolyse anaérobie, aussi appelée fermentation lactique, représente la principale voie de production d'ATP en absence d'oxygène chez la plupart des poissons (Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008). Ce processus permet de générer deux molécules d'ATP par molécule de glucose, en régénérant le NAD^+ nécessaire pour la glycolyse par la réduction du pyruvate en lactate via le NADH et H^+ (Everse et Kaplan, 1973; Vazquez *et al.*, 2010). Bien qu'efficace à court-moyen terme, cette voie a un faible rendement comparativement à la phosphorylation oxydative, consommant jusqu'à 18 fois plus de glucose pour une même quantité d'ATP produite (Vazquez *et al.*, 2010). La mesure des concentrations de lactate après un épisode hypoxique peut ainsi être utilisée comme marqueur de la mobilisation de cette réponse métabolique alternative.

Il est également intéressant de mentionner que certaines espèces de poissons ont développé des stratégies uniques afin de limiter l'accumulation du lactate. Par exemple, certains cyprinidés, comme le poisson rouge (*Carassius auratus*), peuvent convertir le lactate en éthanol et en CO_2 , soit deux produits pouvant ensuite être excrétés par les branchies

(Shoubridge et Hochachka, 1980; Lushchak *et al.*, 2001; Roesner *et al.*, 2008). Cette voie de fermentation alcoolique est rare chez les vertébrés : elle n'a été observée que chez certains cyprinidés adaptés à des habitats sujets à des épisodes d'hypoxie aiguë, voire d'anoxie prolongée.

1.2.4 Voies alternatives de conservation de l'énergie

En réponse à un stress environnemental tel que l'hypoxie, certaines espèces de poissons peuvent déclencher une dépression métabolique, soit un mécanisme visant à réduire la consommation d'oxygène en abaissant les dépenses énergétiques de l'organisme (Guppy et Withers, 1999; Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008; Thomas *et al.*, 2019).

Parmi les stratégies possibles, la répression du taux de synthèse des protéines (K_s) constitue un mécanisme clé pour certains poissons. Chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), la synthèse des protéines peut représenter jusqu'à 20 à 40 % de la consommation cellulaire d'oxygène (Houlihan *et al.*, 1988; Lyndon *et al.*, 1992). Lors d'une situation d'hypoxie aiguë, l'oscar amazonien (*Astronotus ocellatus*), un poisson très tolérant à l'hypoxie, peut réduire son K_s de 50 à 95 % selon le tissu, ce qui se traduit par une diminution globale de son métabolisme pouvant atteindre 36 % (Cassidy *et al.*, 2018). La mesure du K_s peut ainsi représenter un indicateur pertinent de la modulation du budget énergétique en contexte hypoxique.

Par ailleurs, la réduction de l'activité locomotrice constitue une autre voie efficace de conservation de l'énergie. Certaines espèces adoptent ainsi un comportement de léthargie ou réduisent leur nage en réponse à une baisse prolongée d'oxygène dissous (Farrell et Richards, 2009; Speers-Roesch *et al.*, 2018; Ducros *et al.*, 2024). À l'inverse, certaines espèces optent plutôt pour une stratégie comportementale opposée et augmentent temporairement leur activité de nage afin de fuir un environnement aux conditions défavorables (Giesy, 1988; Herbert et Steffensen, 2006; Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008; Herbert *et al.*, 2011).

La diversité des réponses physiologiques et comportementales face à l'hypoxie illustre l'adaptabilité différentielle des espèces aquatiques. Selon leur mode de vie et leur tolérance au manque d'oxygène, certains poissons parviennent ainsi à maintenir leurs fonctions vitales dans des conditions extrêmes, tandis que d'autres en subissent

des conséquences potentiellement létales. Parmi les espèces présentes dans l'est du Canada, l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) se distingue par sa vraisemblable capacité à répondre aux fluctuations des conditions environnementales. Malgré l'apparente résilience des adultes, la place singulière qu'occupe cette espèce dans les écosystèmes et dans la société, combinée à son écologie complexe, fait en sorte qu'elle sera exposée à des facteurs environnementaux potentiellement stressants de plus en plus prononcés apportés par le changement climatique et les perturbations anthropiques.

1.3 *Anguilla rostrata* : une espèce indicatrice de nos régions

1.3.1 Aire de répartition, cycle de vie et migrations

Au niveau mondial, les anguilles sont souvent considérées comme des espèces indicatrices particulièrement sensibles aux changements environnementaux, en raison de leur large distribution géographique, de leur plasticité écologique et de leur cycle de vie complexe (Amiard-Triquet *et al.*, 1987; de Boer *et al.*, 2010; Itakura *et al.*, 2020). En Amérique du Nord, l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) est le poisson indigène présentant la plus vaste aire de répartition (Gouvernement du Canada, 2025). Au Canada, sa distribution couvre la majorité des eaux continentales, ainsi que l'ensemble des voies d'accès menant aux réseaux d'eau douce et estuariens connectés à l'océan Atlantique (Fig. 1.2) (COSEWIC, 2012; Gouvernement du Canada, 2025).

Anguilla rostrata est une espèce semelpare, c'est-à-dire que sa reproduction constitue un événement singulier au cours de sa vie, à l'issue duquel l'individu meurt (Jessop *et al.*, 2002; Gouvernement du Canada, 2025). Selon les connaissances actuelles sur l'espèce, cet événement aurait principalement lieu dans l'océan Atlantique, au sein de la mer des Sargasses (Fig. 1.2). Environ une semaine après la fécondation, les œufs éclosent, libérant des larves leptocéphales au stade planctonique, qui grandissent en dérivant dans la colonne d'eau au gré des courants marins (Gouvernement du Canada, 2025). Une fois qu'elles atteignent 55 à 56 mm de longueur, ces larves se métamorphosent en civelles transparentes (Fig. 1.3) et amorcent une migration active vers les eaux douces du continent (Wuenschel et Able, 2008; Redmann *et al.*, 2020; Gouvernement du Canada, 2025). Après leur arrivée en zones continentales, elles se transforment successivement en civelles pigmentées (pendant 3 à 12 mois), puis en anguilles jaunes, soit leur stade de croissance principal (8 à 23 ans) qui précède la maturation sexuelle (Jessop *et al.*, 2002;

Wuenschel et Able, 2008; Redmann *et al.*, 2020; Gouvernement du Canada, 2025). Certains individus peuvent passer jusqu'à 50 ans en eau douce avant d'atteindre la maturité sexuelle, alors que la phase marine, amorcée au stade argenté, ne durerait qu'environ deux ans (ICES, 2011). C'est à ce stade final que les anguilles entreprennent leur ultime migration vers l'océan pour se reproduire, marquant ainsi l'achèvement et le renouveau de leur cycle de vie.

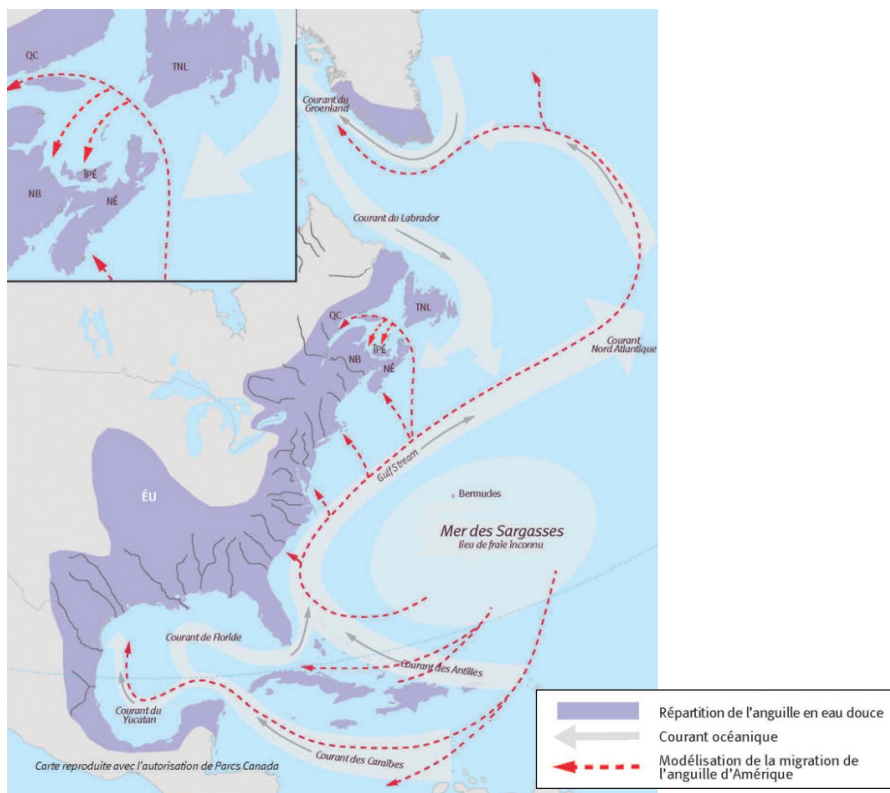


Figure 1.2 – Aire de répartition et patron migratoire de l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) au Canada. Adaptée d'Environnement Canada (2015).

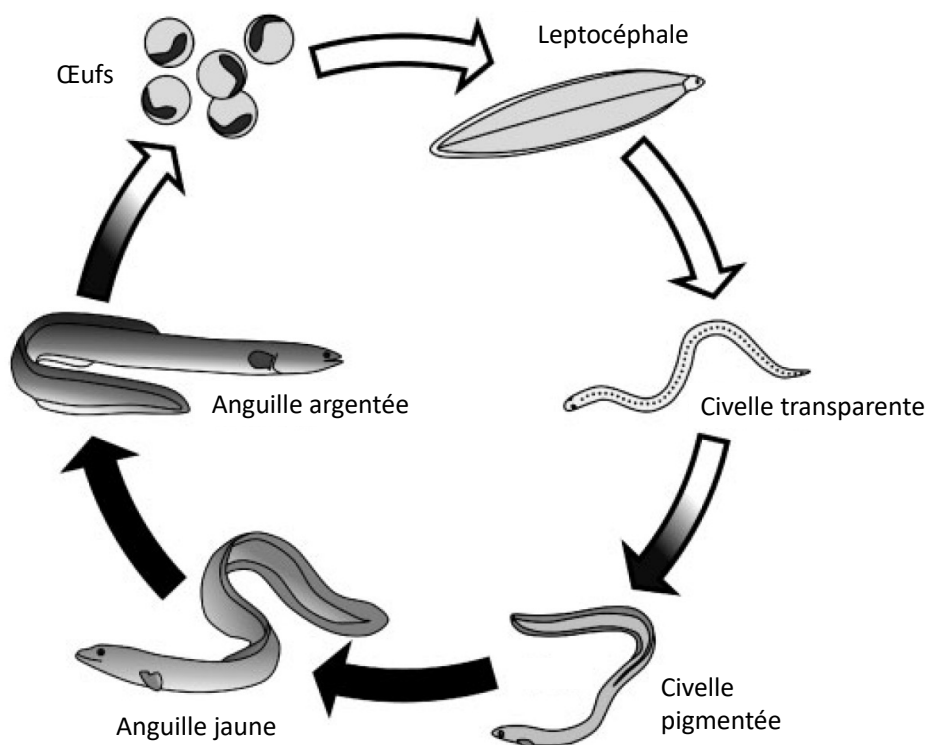


Figure 1.3 – Cycle de vie de l’anguille d’Amérique (*Anguilla rostrata*) et d’Europe (*Anguilla anguilla*). Les flèches en blanc représentent la vie en mer; les flèches en noir représentent la vie en eau continentale. Adaptée de Redmann *et al.* (2020).

1.3.2 Habitat post-migratoire des civelles : choix et préférences

Jusqu’à récemment, l’anguille d’Amérique était considérée comme une espèce strictement catadrome, c’est-à-dire effectuant une croissance strictement en eau douce avant la reproduction en mer une fois la maturité sexuelle atteinte (Lamson *et al.*, 2006; Wuenschel et Able, 2008). Toutefois, plusieurs études ont révélé que les populations des zones tempérées (dont *A. rostrata*, *A. anguilla* et *A. japonica*) présentent une grande plasticité migratoire lors de la phase de croissance, reclassifiant plutôt cette espèce comme catadrome facultative (Tsukamoto et Arai, 2001; Jessop *et al.*, 2002; Marohn *et al.*, 2013; Gaillard *et al.*, 2016; Tzeng, 2016; Durif *et al.*, 2023).

Cette flexibilité se manifeste par une variabilité marquée dans l’utilisation des habitats le long du gradient de salinité : certaines civelles complètent leur migration jusqu’en eau douce, tandis que d’autres demeurent en milieux saumâtres; certaines alternent entre les habitats, tandis que d’autres encore adoptent un mode de

vie plutôt sédentaire (Tsukamoto et Arai, 2001; Jessop *et al.*, 2002, 2004; Daverat *et al.*, 2006; Lamson *et al.*, 2006).

Des études sur les civelles transparentes d'anguilles d'Europe ont démontré que le choix d'habitat post-migratoire résulterait d'un ensemble complexe de facteurs hormonaux, génétiques et environnementaux (Edeline *et al.*, 2004, 2005b, 2005a, 2006; Gaillard *et al.*, 2016). Les civelles qui privilégient l'eau douce présentent généralement un profil de croissance plus lent ainsi qu'un meilleur potentiel locomoteur que celles s'établissant en milieux plus salés (Edeline *et al.*, 2005b). Puisque le stade de civelle pigmentée peut durer jusqu'à 12 mois chez l'anguille d'Amérique (Gouvernement du Canada, 2025), et si les anguilles d'Amérique ont des mécanismes semblables à celles d'Europe, une croissance lente et de longue durée en eau douce exposerait ces individus à une période accrue de vulnérabilité potentielle face aux épisodes d'hypoxie estivale.

1.3.3 Réponse physiologique des anguilles face à l'hypoxie

En raison de leur cycle de vie complexe et de leur vaste répartition géographique, les anguilles du genre *Anguilla* ont fait l'objet de nombreuses études portant sur leur métabolisme, leur plasticité physiologique et leur tolérance aux stress environnementaux. Les adultes de ce genre (à partir du stade d'anguille jaune) semblent généralement présenter une grande tolérance aux variations de salinité, de température et de teneur en oxygène (Owen, 2001). En conditions hypoxiques, certaines espèces peuvent recourir à des ajustements physiologiques tels que la ventilation intermittente (Smith *et al.*, 1983; Chan, 1986; Cruz-Neto et Steffensen, 1997) ou la bradycardie (Iversen *et al.*, 2010). Elles sont également capables d'augmenter l'affinité de leur hémoglobine pour l'oxygène (Wood et Johansen, 1972; Chan, 1986) et certaines peuvent même se déplacer sur la terre ferme afin de rejoindre de nouveaux milieux aquatiques en cas de nécessité (Redmann *et al.*, 2020). Un autre exemple de mécanisme observé chez les anguilles est la respiration cutanée, qui contribuerait de manière significative à l'apport total en oxygène. Bien que peu vascularisée, la peau pourrait assurer jusqu'à 47 % de l'oxygénation chez *A. australis* exposée à l'hypoxie (Smith *et al.*, 1983) et 35 % chez *A. anguilla* exposée à l'hypercapnie (McKenzie *et al.*, 2002). Des recherches sur l'anguille d'Australie (*Anguilla australis*) ont révélé qu'en contexte hypoxique, cette espèce peut adopter une stratégie d'apnée prolongée, potentiellement comme mécanisme de conservation énergétique (Forster,

1981). La régulation respiratoire serait davantage déclenchée par la concentration d'oxygène dans le sang que par la pression partielle en O₂ dans l'eau environnante (Forster, 1981). Dans cette optique, *A. australis* peut interrompre sa ventilation pendant 12 minutes en moyenne, certains individus atteignant même deux heures d'apnée (Smith *et al.*, 1983).

Chez les civelles (soit transparentes ou pigmentées), en revanche, les données sur les réponses métaboliques face à l'hypoxie restent extrêmement limitées. La majorité des études disponibles concernant leur métabolisme sont liées à la migration (Landman *et al.*, 2005; Gaillard *et al.*, 2015, 2016; Bolliet *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019). Bien que ces travaux apportent des informations intéressantes, ils ne permettent pas de tirer de conclusions directes sur la capacité des civelles à tolérer des conditions hypoxiques en eaux douces. Sinon, une étude sur les civelles transparentes d'*Anguilla anguilla* a démontré qu'elles hyperventilent et que le métabolisme mitochondrial est réprimé lors de l'hypoxie (Pierron *et al.*, 2007). Selon mes observations de la littérature scientifique disponible, aucune publication ne documente spécifiquement la réponse physiologique des civelles d'*Anguilla rostrata* face à l'hypoxie.

1.3.4 Contexte socio-économique et statut de l'espèce

Les anguilles jouent un rôle économique majeur dans plusieurs régions du monde, notamment en Asie et dans l'Est du Canada (Shiraishi et Crook, 2015). En 2022, les prises commerciales déclarées d'anguilles d'Amérique adultes (*Anguilla rostrata*) représentaient une valeur de débarquement de plus de 83 000 dollars au Nouveau-Brunswick et près de 123 000 dollars dans les provinces maritimes du Canada atlantique (N.-B. + N.-É.) (Pêches et Océans Canada, 2024). Ces captures correspondaient à des poids vifs estimés à environ 24 et 36 tonnes métriques, respectivement.

Le stade de civelle transparente, l'une des phases juvéniles de l'espèce, est lui aussi très recherché pour la vente. En 2022, bien que ce stade de vie ait une taille corporelle individuelle modeste, la prise annuelle totale déclarée atteignait 8,3 tonnes métriques (Pêches et Océans Canada, 2024). En raison de leur forte valeur marchande et du contexte de tension autour de leur exploitation, la pêche commerciale de cette espèce a été suspendue en 2020 et en 2023, pour des raisons de sécurité publique et de conservation (Pêches et Océans Canada, 2024).

Depuis mai 2012, *Anguilla rostrata* est officiellement reconnue comme une espèce menacée au Canada (COSEWIC, 2012). Son déclin est attribué à une combinaison de facteurs : modification de l'habitat, surexploitation, parasites et changement climatique (Drouineau *et al.*, 2018; Gouvernement du Canada, 2025). Des consultations publiques ont été entamées dès 2015-2016 afin de déterminer si l'espèce devait être inscrite à l'annexe 1 de la Loi sur les espèces en péril (LEP) (Environnement et Changement climatique, 2024). L'inscription à cette annexe entraînerait l'interdiction de sa capture, de sa vente et de son harcèlement, en plus d'assurer la protection de son habitat. Elle permettrait aussi la mise en œuvre d'un programme officiel de rétablissement des populations (Environnement et Changement climatique, 2024). Bien que la fin de la vérification des consultations ait initialement été prévue pour mai 2024, celle-ci est toujours en suspens, plus d'un an après la date ciblée (Gouvernement du Canada, 2025).

1.4 Objectifs et portée de ce projet

Les réponses métaboliques varient selon les stades de vie, rendant les poissons juvéniles généralement moins tolérants à l'hypoxie que les adultes de la même espèce (Diaz et Breitburg, 2009). Cette sensibilité accrue découle de leur petite taille et de leur taux métabolique massique plus élevé, facteurs qui limitent leur capacité à soutenir la demande énergétique par voie anaérobie (Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008). Ainsi, bien que la tolérance à l'hypoxie des anguilles adultes (anguille jaune, surtout) soit documentée, la capacité de réponse physiologique des civelles (soit transparentes ou pigmentées) demeure incertaine et largement inexplorée.

L'hypothèse principale de cette thèse était que compte tenu de leur petite taille, impliquant une forte demande métabolique, et de leur capacité limitée à assurer la production d'ATP à long terme par voie anaérobie, les civelles d'*Anguilla rostrata* (< 7 cm) sont intolérantes à l'hypoxie. Nous avons prédit qu'elles ne parviendraient pas à réguler efficacement leur métabolisme aérobie et que, par conséquent, leur taux métabolique ainsi que leur taux de synthèse des protéines post-hypoxie seraient similaires à ceux des groupes en normoxie (prédiction P1). Nous nous attendions également à ce que l'hypoxie agisse au niveau de la gestion énergétique en induisant une altération de la charge en adénylates, une diminution du ratio PCr/Cr et une accumulation de lactate (prédiction P2).

Pour tester l'hypothèse et vérifier ces prédictions, des civelles récemment arrivées en eau douce de la Nouvelle-Écosse (Canada), ont été récoltées au stade de civelles transparentes et ont transitionné progressivement au début du stade de civelles pigmentées au cours des cinq mois suivant leur arrivée au laboratoire. Les individus observés lors des expériences étaient donc toutes au début du stade pigmenté. Les civelles furent soumises à l'un de deux types de profils expérimentaux, chacun correspondant à 8 heures continues d'exposition à de l'hypoxie. L'expérience 1 (E1) visait à mesurer le $\dot{M}O_2$ à l'aide d'un respiromètre artisanal, à partir d'une phase d'acclimatation à 100 % de saturation en air dans l'eau, suivie d'une baisse progressive de l'oxygène dissous. La saturation en air était diminuée de 5 % à toutes les deux heures et la période hypoxique passait de 30 % à 15 %. L'expérience 2 (E2) consistait à exposer les civelles à une hypoxie relativement stable (~ 20 % de saturation en air) dans de l'eau enrichie en phénylalanine normale et deutérée (ratio 50/50), afin de quantifier leur taux de synthèse des protéines (Ks). Pour caractériser leur statut énergétique, les concentrations en adénylates (ATP, ADP, AMP), phosphocréatine (PCr), créatine (Cr) et lactate ont été mesurées chez les individus des deux types d'expériences (E1 et E2).

En contexte de changements climatiques rapides et de perturbations anthropiques, dont notamment l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes d'hypoxie estivale, l'intérêt principal de ce projet était de documenter la réponse physiologique des civelles d'*Anguilla rostrata* face à l'hypoxie en eau douce. Puisqu'elles peuvent rester au stade de civelle pigmentée pour une période pouvant aller jusqu'à un an, les civelles encourent le risque d'être de plus en plus confrontées à divers facteurs stressants estivaux. Mieux comprendre leur réponse physiologique à l'hypoxie en eau douce permettrait donc d'enrichir les connaissances sur les mécanismes potentiels participant au déclin de cette espèce et pourrait également contribuer à éclairer les prises de décisions sur les stratégies de conservation à mettre en place dans le futur.

CHAPITRE II

**Physiological response of American eel elvers
(*Anguilla rostrata*) to acute freshwater hypoxia**

– Article préparé en vue de publication –

**Physiological response of American eel elvers (*Anguilla rostrata*)
to acute freshwater hypoxia**

Annie Sarah Lavoie-Rochon¹, Loïck Ducros^{1,2}, Alyre Chiasson¹ and Simon G. Lamarre^{1,*}

¹ *Département de Biologie, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, E1A 3E9.*

² *Département de Chimie et Biochimie, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, E1A 3E9.*

* Auteur de correspondance : simon.lamarre@umoncton.ca

2.1 Abstract

Climate change and anthropogenic disturbances are exposing freshwater fish species to increasingly frequent and severe stressors, such as environmental hypoxia. Despite its ecological, socio-economic, and cultural significance, the American eel (*Anguilla rostrata*) is a declining and threatened species, facing numerous environmental stressors throughout its long and complex life cycle. This study investigates the physiological response of American eel elvers to acute freshwater hypoxia, with the aim of assessing whether their tolerance at this developmental stage may offer insight into factors contributing to the species' decline. We hypothesized that young elvers are intolerant to hypoxia due to their elevated metabolic demands and limited capacity for sustained anaerobic ATP production, both stemming from their small body size. To examine this, elvers (≤ 7 cm) were exposed to 8 hours of either graded hypoxia (minimum air saturation of 15%) or constant hypoxia (approximately 20% air saturation) in fresh water. Whole-body oxygen consumption ($\dot{M}O_2$), adenylate energy charge (AEC), phosphocreatine/creatine ratio (PCr/Cr), lactate concentration, and relative protein synthesis rate (PSR) were compared between normoxic and hypoxic treatment groups. Although anaerobic metabolism was activated, both AEC and PCr/Cr ratios remained stable and no signs of metabolic depression or reduction in relative PSR were detected. Our findings suggest that young American eel elvers exhibit a degree of short-term tolerance to acute freshwater hypoxia, although preliminary trials indicate that exposure to more extreme conditions can be fatal for many individuals. However, the observed lack of plasticity in $\dot{M}O_2$ and relative PSR regulation may reflect a physiological vulnerability, potentially placing elvers at risk when such acute conditions arise in natural environments. While the hypoxia response documented here is constrained by the experimental parameters of this study, it nonetheless contributes to a deeper understanding of elver physiology under hypoxic stress.

Keywords: Fish metabolism, ecophysiology, deoxygenation, energy balance, tolerance

2.2 Introduction

Environmental hypoxia is a common stressor in coastal zones, estuaries and freshwater systems, but due to climate change and anthropogenic disturbances, both the frequency and magnitude of hypoxic episodes are increasing (Diaz and Breitburg, 2009; Rabalais *et al.*, 2010; Jenny *et al.*, 2016). Hypoxia notably impairs mitochondrial ATP production (Solaini *et al.*, 2010). Therefore, organisms must be able to adjust their physiological and biochemical processes to maintain their energy balance and insure essential metabolic functions ongoing under hypoxic conditions. When needed, ATP production is sustained for a limited period by the mobilization of phosphagens, such as creatine phosphate (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Still, the switch to anaerobic metabolism must occur before reserves become depleted (Richards *et al.*, 2009; Speers-Roesch *et al.*, 2013). To maintain their energy balance, organisms may also reduce their ATP demand by limiting non-essential functions, such as swimming activities (Chapman and McKenzie, 2009; Ducros *et al.*, 2024), and energy-demanding processes, such as protein synthesis (Cassidy *et al.*, 2018; Cassidy and Lamarre, 2019), which by itself can account for up to 40% of fish aerobic metabolism (Houlihan *et al.*, 1988; Carter *et al.*, 1993).

Populations of Anguillid eels are undergoing worldwide declines ranging from ~ 50% up to ~ 95%, depending on the species (Jacoby *et al.*, 2015). The possible reasons for loss include habitat modification, overexploitation (of stocks and/or resources) and climate change (Drouineau *et al.*, 2018). While these factors have various degrees of influence on eel populations, the actual causes remain difficult to pinpoint with certainty. The American eel (*Anguilla rostrata*) has been considered a threatened species in Canada since May 2012 (COSEWIC, 2012). Even so, American eels of many life stages (e.g., glass eels, elvers and adults) represent an essential socioeconomic and cultural resource in different parts of their range, including eastern Canada (Shiraishi and Crook, 2015).

Adult eels (i.e. yellow and silver eel life stages) are globally recognised as being remarkably tolerant to various environmental stressors (Owen, 2001). They can increase their ventilation rate and/or adopt intermittent ventilation with increasing periods of apnea (Smith *et al.*, 1983; Cruz-Neto and Steffensen, 1997), use cutaneous respiration (Smith *et al.*, 1983; McKenzie *et al.*, 2002) and sustain bradycardia (Iversen *et al.*, 2010;

Joyce *et al.*, 2016). They are also known for their ability to travel overland, if the need arises (Tesch, 1977; Redmann *et al.*, 2020). A study on European glass eels (*Anguilla anguilla*) showed a repressed mitochondrial metabolism and hyperventilation during hypoxia (Pierron *et al.*, 2007). Most other studies focusing on early life stage eels (i.e. glass eel and elver life stages) are related to larval migration (Landman *et al.*, 2005; Gaillard *et al.*, 2015, 2016; Bolliet *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) and have yet to examine their metabolic and physiological responses to hypoxia. Furthermore, European and American eels are no longer believed to be obligatory catadromous (Jessop *et al.*, 2002; Daverat *et al.*, 2006; Marohn *et al.*, 2013; Gaillard *et al.*, 2016; Durif *et al.*, 2023). The American eel is also a panmictic species (Wirth and Bernatchez, 2003), which still displays a large array of phenotypic variation (Díaz *et al.*, 2025). Studies on habitat selection mechanisms have shown that predispositions for habitat type and associated physiological strategies can be found in European glass eels. Elvers predisposed to choose freshwater habitats have shown slower growth rates (Edeline *et al.*, 2005b), better locomotor activity potential (Edeline *et al.*, 2004, 2005a) and higher body condition (Edeline *et al.*, 2006) than their saltwater counterparts. Thus, if American glass eels are similar to their European counterparts, those with a freshwater predisposition have a slower growth rate. Because eels can transform to the elver stage soon after entering continental waters and since they can stay at that stage for up to 12 months (Gouvernement du Canada, 2025), individuals with a freshwater predisposition are likely to experience increased exposure to hypoxic conditions as the vernal and estival seasons advance.

Metabolism patterns differ among life stages (Diaz and Breitburg, 2009) and juvenile fish are generally less tolerant to hypoxia than adults. This is due to their small size and higher mass-specific metabolic rate, which limits their anaerobic ATP production efficiency potential through time (Nilsson and Östlund-Nilsson, 2008). Thus, considering the decline of the species and the more frequent occurrences of amplified temperatures rises and hypoxic events during the spring/summer seasons, due to climate change and anthropogenic disturbances, a better understanding of the metabolic responses of young elvers to hypoxia would be pertinent information. From this point forward, “young elvers” and “elvers” are used to describe eels who have recently gradually

transformed from the glass eel stage to the elver stage (< 6 months since glass eel stage arrived in continental waters, started feeding behavior and began pigmentation process).

We hypothesized that young elvers are intolerant to hypoxia due to their elevated metabolic demands and limited capacity for sustained anaerobic ATP production, both stemming from their small body size. To test this hypothesis, we exposed young American elvers (≤ 7 cm) to acute hypoxia levels for up to eight hours. Their metabolic rate was evaluated by measuring their oxygen consumption ($\dot{M}O_2$), which we predicted would not fluctuate from the normoxia group. We also assessed their aerobic metabolism status by measuring adenylate energy charge (AEC) and creatine phosphate (PCr)/creatine (Cr) ratio. We anticipated that the AEC would be altered, and the PCr/Cr ratio would be higher in hypoxia exposed fish. The onset of anaerobic metabolism was evaluated by measuring lactate concentration, which was predicted to rise during hypoxia. Finally, we tested their physiological performance by comparing their relative protein synthesis rate (relative PSR) during normoxic and hypoxic conditions. We predicted that there would be no differences between condition groups for relative PSR.

Determining how American eel elvers respond to hypoxia in freshwater will provide a better understanding of the physiological processes that occur at this early life stage. This study, alongside previous and future studies, on the responses of the American eel to hypoxia in freshwater, will be useful to support conservation efforts of this declining species.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Animal care

American glass eels (*Anguilla rostrata*) were wild-caught in the Salmon River (NS, Canada), within the Salmon River watershed which drains into the Bay of Fundy. They arrived at *Atlantic Canada Eels Inc.* (Eastern Passage, NS, Canada) on April 17th, 2022. A group of these eels was collected on April 22nd and brought to the Université de Moncton (Moncton, NB, Canada), where they were housed in 60 L aquariums. The aquariums were filled with dechlorinated freshwater and maintained at the same temperature as the capture site and temporary holding container (10 °C). The water treatment system consisted of a mechanical charcoal filter, a biological filter, and an UV disinfection lamp. To maintain stable conditions, partial (25%) water changes were performed weekly. Water quality parameters (pH, ammonia, nitrites, and nitrates) were monitored daily until stabilization, after which measurements were verified weekly.

A photoperiod of 14 h light/10 h dark was employed, with 35-minute dawn and dusk transitions to simulate a natural photoperiod. Environmental enrichment included 3-inch PVC pipe elbows, which some eels used as shelter. Additionally, the sides of the aquariums were darkened to minimize external disturbances. Following a two-week acclimation period, water temperature was increased to 16 °C, at a rate of 1 °C per hour, after which it remained constant throughout all experiments. Given that glass eels were not yet feeding, as a result of their developmental stage and recent migratory status, feeding behavior was initiated with a mixture of frozen haddock roe and ground salmonid feed (Nutra RC 80A 2.5 mm – Skretting). After two weeks, all eels demonstrated a regular feeding behavior, readily consuming salmonid feed. From that point forward, they were fed a 5% body mass ration every other day, to promote optimal body condition and prevent excessive adiposity. Eels were at the beginning of the elver stage (at the start of the pigmentation process) when experimental protocols began. All animal procedures were approved by the Université de Moncton animal care committee (UdeM19 – 12).

2.3.2 Experimental protocols

Experiments spanned between June and September 1st, 2022. Eels were either used in Experiment 1 (E1) or Experiment 2 (E2). Temporally, all E1 trials were performed before E2 trials, due to time and space constraints in the wet lab.

2.3.2.1 Experiment 1: Intermittent-flow respirometry during graded hypoxia

A cumulative graded hypoxia challenge was conducted, transitioning from 100% air saturation during acclimation to 30, 25, 20, and 15% air saturation, with each level maintained for 2 hours. Initially, a 10% air saturation condition was included but was later omitted due to mortality in preliminary trials (80%). Air saturation was regulated by a compressed nitrogen (N_2) gas injection system, comprising a PicoLo fibre-optic oxygen meter, a solenoid valve, and an Arduino Uno microcontroller. Three rounds of graded hypoxia respirometry trials were completed over five weeks, exposing 18 eels to E1 (mean mass \pm SD: 70.58 ± 15.25 mg; $n = 9$ normoxia, $n = 9$ hypoxia).

Before the experiments, eels were fasted for 24 hours and then placed individually in respirometry chambers, where they acclimated to 100% air saturation for 14 hours. Thus, with the acclimation period and experimental period (8 hours), oxygen concentration was continuously recorded for 22 hours using two homemade intermittent respirometry systems (Fig. S1 – A).

Each system was composed of four respiration chambers (Fig. S1 – B), constructed from 23.5 mL glass scintillation vials fitted with contactless oxygen sensor spots (OXSP5 – *PyroScience*). Chambers featured mesh false bottoms and magnetic stir bars, activated by submersible stir plates (Cimarec i Micro Stirrers – *Thermo Scientific*). Water was supplied via a flush pump delivering a total of 715 mL/min between all four chambers, ensuring at least 7 complete exchanges per minute, per chamber, during flush cycles. To prevent the possibility of social interaction, chambers were spaced at least 14 cm apart (~ 5.6 times a chamber width).

Oxygen concentration was monitored using fibre-optic oxygen meters (FireSting-O2 FSO2-C4 – *PyroScience*), incorporating temperature and atmospheric pressure correction. Oxygen meters and flush pumps were controlled via microcontrollers (*Arduino Mega*), executing 20-minute cycles of Flush (3 min), Wait (2 min), and Measure (15 min), resulting in three $\dot{M}O_2$ measurements per hour, per chamber. All oxygen probes underwent two-point calibration (100% and 0% air saturation) before experiments. Respirometers remained at ~ 16 °C, maintained by a shared 107 L water bath connected to a cooling unit (Fig. S1 – C).

For each trial, one respirometer was assigned to the treatment group (graded hypoxia) and the other to the control group (normoxia). The respirometer belonging to the treatment group was alternated between every trials. One respiration chamber per respirometer was left empty to quantify background bacterial respiration. Visual and auditory disturbances were minimized in the experiment room, to reduce stress responses.

At trial completion, eels were euthanized (100 mg/L benzocaine), measured, weighed, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C for further analyses. To prevent bacterial accumulation, respirometry systems were disassembled, cleaned and dried between each trial.

2.3.2.2 Experiment 2: Energetic pathways during exposition to stable hypoxia

Two 8-hour experimental trials, each comparing normoxia and hypoxia treatment groups, were conducted (n = 7 eels in trial 1, n = 8 eels in trial 2, per treatment group). To assess protein synthesis, fish (overall mean eel mass \pm SD: 161.56 \pm 60.16 mg) were housed in 2 L water tanks containing a 50/50 ratio solution of L-Phenylalanine (Phe) and L-Phenylalanine (ring-D5, 98%) (D5) at 1.50 mM/L. Experimental water was filtered between trials using *Nalgene* ‘Rapid-Flow’ filters (PES membrane; 0.2 μ m pores). To control for potential water composition effects, water ‘A’ was assigned to hypoxia and water ‘B’ to normoxia in the first trial, then switched between groups in trial two. Samples (1 mL) of waters A and B were frozen before and after both trials, to verify stability and concentration of the Phe/D5 ratio throughout the experiment.

Control fish received bubbling ambient air, equivalent to 100% air saturation. Hypoxia was regulated via an Arduino-controlled solenoid valve connected to a compressed nitrogen (N₂) gas system. Air saturation in hypoxic tanks fluctuated near 20%, with a minimum mode of 16.42% and a maximum mode of 20.07% at 16 °C. Following the 8 hours of exposure, eels were euthanized in a sample of corresponding experimental water containing benzocaine (100 mg/L), patted dry, placed in 1.5 mL cryogenic vials, and then flash frozen in liquid nitrogen.

2.3.3 Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)

2.3.3.1 General sample preparation

Both E1 eels (graded hypoxia trials ending at 15%) and E2 eels (stable hypoxia exposure) were processed in the laboratory at the same time for molecular marker analysis (E1: n = 8 per treatment; E2: n = 7 per treatment).

Each eel was weighed and thinly sliced on a chilled bench using a clean blade. Samples were homogenized by adding 15 volumes of 0.2 M perchloric acid (PCA) with D8 (30 μ M) and a chilled metal bead to a 2 mL tube. Initial homogenization was performed using a TissueLyser (*Retsch Qiagen*) at 25 Hz for 2 min, followed by 5 min on ice. Samples were then further homogenized via sonicator (Q55 Sonicator – *Qsonica*) until a smooth consistency was achieved (\lesssim 1 min).

Following homogenization, samples were centrifuged at 25,000 G (4 °C, 5 min), and supernatants were collected and transferred to new tubes. Both supernatants and pellets were stored at -70 °C until analysis.

To 150 μ L of supernatant (eel sample in PCA), 8 μ L of 5 M KOH was added, adjusting to pH > 9. After 5 min on ice, samples underwent centrifugation (25,000 G, 4 °C, 5 min). Then, 140 μ L of the resulting solution was mixed with 140 μ L chilled ammonium formate, followed by a second centrifugation (25,000 G, 4 °C, 5 min) to ensure complete precipitation of particles.

From this cleaned supernatant, 260 μ L was transferred to LC-MS vials for analysis. Six metabolic markers were quantified: Adenosine-triphosphate (ATP), Adenosine-diphosphate (ADP), Adenosine-monophosphate (AMP), Creatine (Cr), Creatine-phosphate (PCr) and lactate.

2.3.4 Rate of protein synthesis (E2)

2.3.4.1 Validation

To measure protein synthesis, the tracer would typically be injected directly into the abdominal cavity of the fish. However, the small size of the elvers made this approach unsafe and impractical. We therefore elected to use a non-invasive bathing protocol, as described by Houlihan *et al.* (1992, 1993). This method is effective in saltwater fish, where continuous drinking facilitates tracer uptake. Although freshwater eels do not

actively drink, we reasoned that exposing them to a sufficiently high concentration of phenylalanine in the water would allow for adequate tracer absorption within a relatively short time frame, especially since they exhibit a higher surface area-to-volume ratio compared to most typical fish.

To validate this approach, three animals were bathed in water containing 3 mM phenylalanine (50% ratio Phe/D5) for 8 hours. We then measured the enrichment of the free phenylalanine pool and its incorporation into the protein-bound pool. Using this method, we successfully enriched the free phenylalanine pool to approximately 20% and estimated a whole-animal fractional rate of protein synthesis of $1.06 \pm 0.44\%$ per day.

Both the enrichment of the free phenylalanine pool and the estimated rate of protein synthesis were lower than typically observed when the tracer is administered by injection, suggesting slower tracer uptake in the bathing protocol. This likely violates some of the assumptions required for the accurate calculation of the absolute fractional rate of protein synthesis (Lamarre *et al.*, 2015). Nevertheless, we consider this method suitable for assessing relative differences in protein synthesis between experimental and control animals. For this reason, protein synthesis results are presented as values relative to control mean, or relative protein synthesis rate (relative PSR).

2.3.4.2 Sample preparation

The relative PSR assay was conducted for each eel from Experiment 2, with 14 eels per treatment. Individual eels served as experimental units, and samples were processed in a randomized order within their respective categories (hypoxia versus control, and trial 1 versus trial 2) to ensure equal distribution across analysis groups.

The Ks assay protocol from Lamarre *et al.* (2015) was followed. Whole glass eels were homogenized via sonicator (Q55 Sonicator – *Qsonica*) in 1 mL of 0.2 M perchloric acid (PCA), then centrifuged at 25,000 G (5 min). The resulting pellets comprised the protein pool (PP), while the supernatants were collected separately as the free amino acid pool (FP).

To remove lipids, PP pellets were rinsed three times with PCA, washed in 1 mL of acetone, and then homogenized again. Protein pellets were placed in 6 mL of 6 M HCl and incubated at 110 °C for 18 hours to induce hydrolysis. FP samples were treated with

100 μL of 5 M KOH to precipitate perchlorate, followed by the addition of 100 μL of 6 M HCl to re-acidify the solution. After centrifugation, the supernatant was collected while residual perchlorate pellets were discarded.

For solid-phase extraction, PP and FP solutions were passed through Bond-Elut C-18 (*Varian*) columns. Extracted samples were evaporated at 110 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hours, then derivatized using pentafluorobenzyl bromide before analysis. Final quantification was conducted via GC-MS using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a single quadrupole inert mass selective detector (MSD, model 5973).

2.3.5 Data processing and statistical analyses

2.3.5.1 $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ during graded hypoxia (E1)

Raw dissolved oxygen (DO) data from the Measure phase was used to calculate $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ using the *FishResp* package (Morozov *et al.*, 2019) in R (version 4.0.5). Background respiration and eel body mass were included in the calculations. An R^2 threshold of 0.50 was used instead of the standard 0.95, to account for low-resolution measurements imposed by the small volume occupied by the eels and the gradual oxygen depletion in the respiration chambers. A typical respirometry trace, showing a before and after hypoxia phase change (from 20% to 15%) is shown in Fig. S2.

Statistical analyses of $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ data only included eels of E1 that survived the respirometry trials (minimum air saturation threshold phase = 15%). Eight fish per treatment were thus considered. A generalized additive model (GAM) was fitted to $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ data using the *mgcv* package in R. To ensure robust model performance and minimize the influence of extreme values, the interquartile range (IQR) method was applied, with outliers identified and removed using the $1.5 \times \text{IQR}$ rule. Missing values were omitted during quantile computation to prevent their potential impact on the model. The final model included smooth terms for time values by treatment (normoxia or hypoxia) and fish ID was present as a random effect. To get representative predictions, data for two artificial fish (one per treatment) were generated by calculating the mean $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ at each time point for each treatment. GAM-based predictions were then obtained using these artificial fish as representative data, with standard error (*se.fit*) and corresponding confidence intervals (upper $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ and lower $\dot{\text{M}}\text{O}_2$) computed as $1.96 \times \text{SE}$. GAM curves were plotted, showing

predicted $\dot{M}O_2$ trajectories across treatments, as well as real $\dot{M}O_2$ data points of all fish, to visualise inter-individual variability of fish in context with the model.

Rank-transformed $\dot{M}O_2$ data was fitted to a mixed linear model, with treatment (normoxia and hypoxia) and 2-hour experimental phases (100%, 30%, 25%, 20%, and 15% air saturation) as fixed factors, with individual fish as a random factor to account for repeated measures. Normality was assessed using Shapiro–Wilk and D’Agostino tests, and homoscedasticity was verified with Levene’s test. A two-way ANOVA was performed to determine the significance of fixed factors, with α set at 0.05 ($p < 0.05$). Following model estimation of significance, post hoc pairwise comparisons were conducted, using estimated marginal means (*emmeans*) to assess treatment differences within each oxygen phase. Tukey’s correction was applied to control for multiple comparisons. Additionally, we performed interaction contrasts to examine whether treatment effects varied across oxygen conditions. Statistical significance was determined at $\alpha = 0.05$ and confidence intervals (95%) were used. ANOVA-related analyses were conducted in R (version 4.4.1) using the *nlme* and *emmeans* packages.

2.3.5.2 Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)

Concentrations of ATP, AMP, ADP, PCr, Cr and lactate were quantified by LC-MS for whole-eel samples from E1 ($n = 8$ per treatment) and E2 ($n = 7$ per treatment). Molecule quantification was performed using standard concentration ranges, with visual verification of peak quality for every molecule in each sample.

Chromatographic separation was carried out on a HILIC-Z column (Poroshell 120, 2.1×150 mm, $2.7 \mu\text{m}$, PEEK-lined – *Agilent*) using an Agilent 1100 HPLC system coupled to an Ultivo triple quadrupole mass spectrometer (G6465B – *Agilent*). The gradient used mobile phase A (10 mM ammonium formate, pH 9.0) and mobile phase B (acetonitrile with 10% of the same buffer), both containing $5 \mu\text{M}$ medronic acid to serve as a sacrificial phosphate by binding to active metal sites, improving peak shape and signal consistency.

The column was maintained at 40°C and the sample compartment at 4°C . The injection volume was $1 \mu\text{L}$, and the flow rate was $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The proportion

of mobile phase B decreased from 85% to 60% over 5 minutes, held at 60% for 2 minutes, then returned to 85%, with a 13-minute equilibration phase (total runtime: 20 minutes).

Detection was performed in positive electrospray mode using multiple reaction monitoring (MRM). Quantifier transitions were m/z 348→136 (AMP), 428→136 (ADP), and 508→136 (ATP), with qualifier transitions 348→97, 428→97, and 508→410, respectively. Analyte concentrations were determined using freshly prepared calibration standards. Adenylate energy charge (AEC) was calculated using formula (1) (Atkinson, 1968). PCr/Cr ratio was determined, and lactate concentration was observed.

$$AEC = \frac{ATP + (ADP \times 0.5)}{ATP + ADP + AMP} \quad (1)$$

Unpaired t-tests were conducted to compare treatment group means versus control group means for AEC, PCr/Cr ratio, and lactate concentration, using R (version 4.0.5). Normality was assessed with Shapiro-Wilk and D'Agostino skewness tests, and homogeneity of variance with Levene's test. For each molecular group, if any assumption was violated, a Log(Y) transformation was applied to both treatment conditions (normoxia and hypoxia). The significance threshold was set at $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$).

Pearson correlation analyses were performed in PRISM 9 (ver. 9.3.1) to examine relationships between individual eel mass and AEC values for both experiments. Linear regressions were applied, and correlation strength was determined using Pearson's r and R^2 values, with statistical significance assessed at $\alpha = 0.05$.

Pearson correlation analyses were also performed in PRISM 9 (ver. 9.3.1) to examine relationships between log-log PCr/Cr ratio and lactate concentration values for both experiments. Here, data was log-transformed to simplify visualisation and interpretation of the figure.

2.3.5.3 Relative PSR (E2)

Fractional protein synthesis rate (K_s , in $\% \text{ day}^{-1}$) was calculated using formula (2) (Lamarre *et al.*, 2015; Cassidy *et al.*, 2018), where S_a represents free amino acid pool (FP) enrichment, S_b represents protein pool (PP) enrichment, t is incorporation time (min), and 1440 converts minutes into days:

$$K_s = \frac{S_b}{S_a} \times \frac{1440}{t} \times 100 \quad (2)$$

Since K_s assumptions (Garlick *et al.*, 1980; Lamarre *et al.*, 2015) could not be fully met, relative protein synthesis rate (relative PSR) was determined as a better representation of the data. Relative PSR was calculated by normalizing individual K_s values from treatment and control fish against the mean K_s value of the control group.

Normality of data was respected for log transformed data (Shapiro-Wilk and D'Agostino tests), but variance assumptions were violated based on Levene's test, so a Welch's t-test was performed to compare relative PSR between normoxia and hypoxia groups using R (version 4.0.5). The significance threshold was set at $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$).

2.4 Results

2.4.1 $\dot{M}O_2$ during graded hypoxia (E1)

2.4.1.1 *Generalized additive model (GAM)*

Whole eel $\dot{M}O_2$ values calculated from intermittent respirometry data show a lot of individual variation (Fig. 2.1). The parametric coefficient estimates (SE = standard error) indicated that the intercept was significant (Estimate = 215.79, SE = 29.86, $p < 0.001$), while the ‘treatment’ effect (N vs H) was not (Estimate = -50.06, SE = 42.21, $p = 0.236$). For the smooth terms, a significant effect was observed for ‘time’ within both treatments (H: edf = 4.235, $F = 9.422$, $p < 0.001$; N: edf = 5.215, $F = 5.903$, $p < 0.001$). The random effect of ‘fish individuality’ showed a strong significance (edf = 13.827, $F = 74.262$, $p < 0.001$), highlighting individual fish variability in $\dot{M}O_2$ responses. The model explained 60.2% of the deviance (adjusted $R^2 = 0.59$), with a generalized cross-validation (GCV) score of 4344.2 and a scale estimate of 4212.8, based on $n = 836$ observations.

2.4.1.2 *Two-way ANOVA*

Mean $\dot{M}O_2$ values for each two-hour step, calculated from individual fish mean $\dot{M}O_2$ for each phase, varied only slightly within and between treatment groups (Fig. 2.2). A two-way ANOVA, conducted on rank-transformed data, to respect test assumptions, revealed a significant interaction between ‘treatment’ and ‘oxygen phase’ ($F(4,55) = 3.21$, $p = 0.0193$).

Post hoc comparisons, evaluating ‘treatment’ effects across ‘oxygen phases’, revealed that $\dot{M}O_2$ was significantly higher at the 30% step for hypoxia fish compared to normoxia fish ($p = 0.0365$). A marginal effect was detected at the 25% step ($p = 0.0952$). No statistically significant differences were observed at the other phases (100%, 20% or 15%).

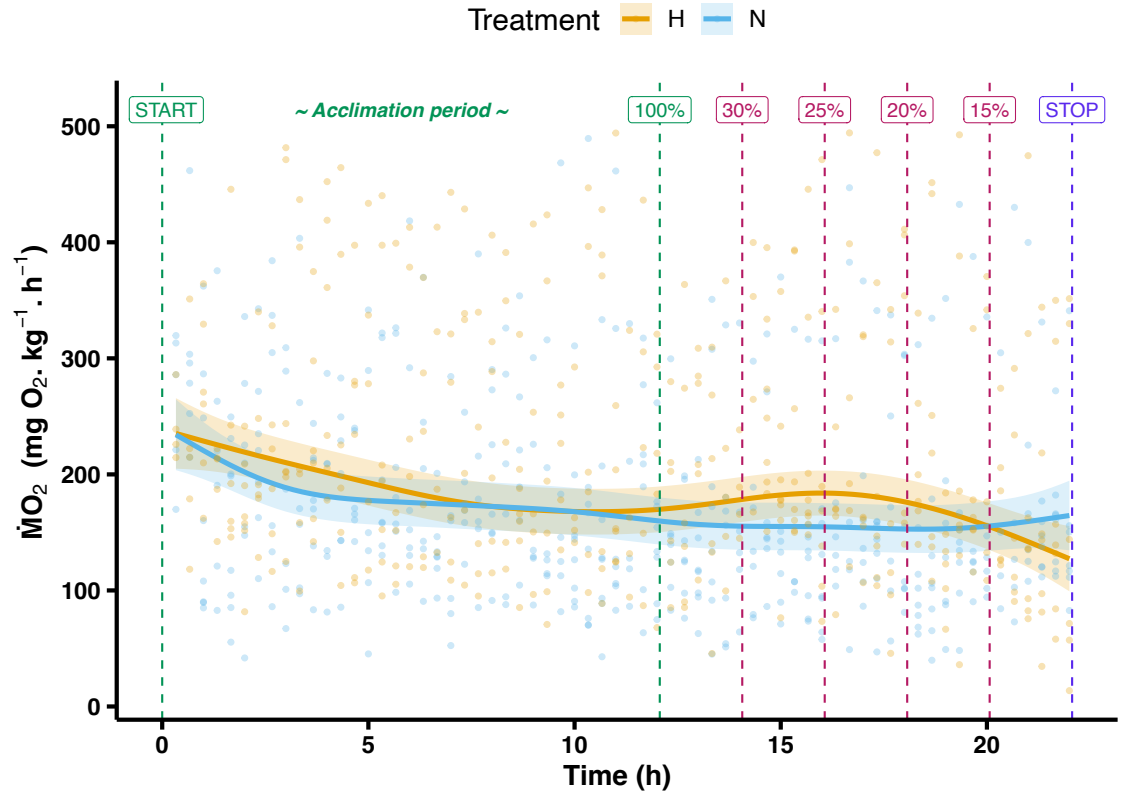


Figure 2.1 – Individual elver $\dot{M}O_2$ values measured via intermittent flow respirometry during graded hypoxia trials, modeled using a generalized additive model (GAM). The GAM illustrates oxygen consumption patterns in fish exposed to constant normoxia ($n = 8$) and graded hypoxia ($n = 8$) over time, with significant smooth terms for time within both treatments (H: $p < 0.001$; N: $p < 0.001$) and a strong random effect of fish individuality ($p < 0.001$). Dots represent raw $\dot{M}O_2$ data points, while curves denote GAM-predicted trends. Shaded areas indicate 95% confidence intervals (standard error) for the GAM fit. The dataset includes the 14 h acclimation period at the start of the time sequence (left side of the graph), with $\dot{M}O_2$ values adjusted for individual elver mass and background bacterial respiration.

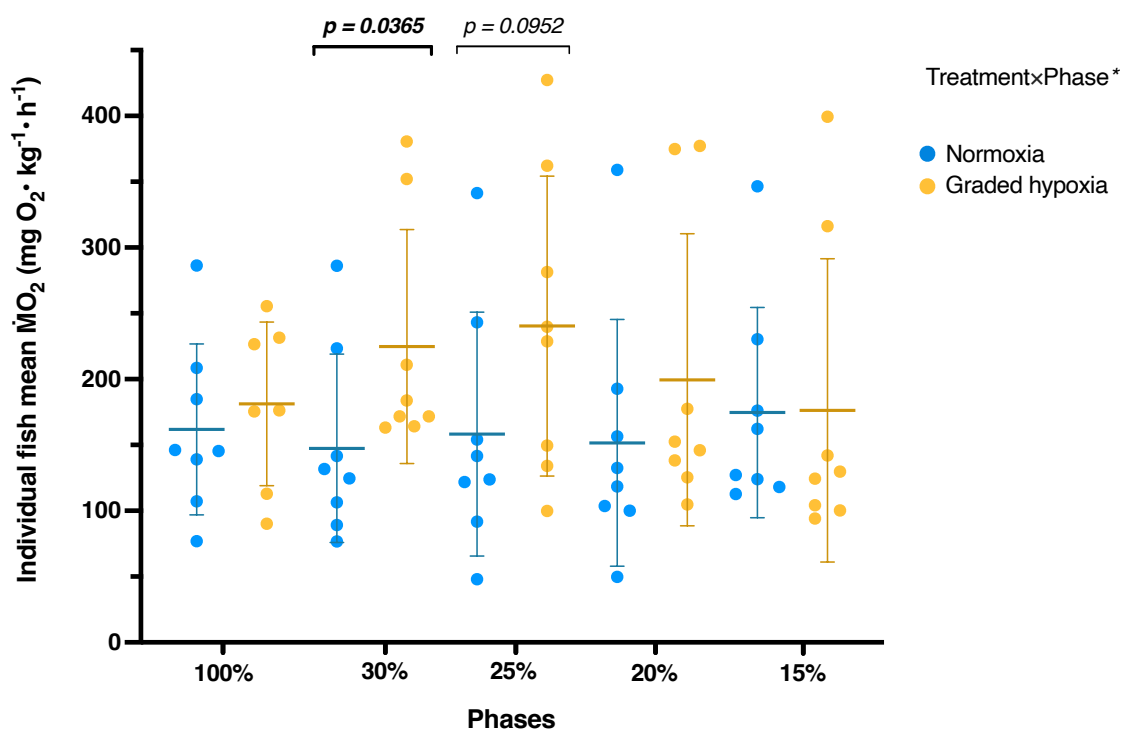


Figure 2.2 – Mean $\dot{M}O_2$ (\pm SD) values measured via intermittent respirometry, presented for each experimental trial phase, across treatment groups (normoxia and hypoxia). Dots represent individual fish mean $\dot{M}O_2$ values per trial step. All values are adjusted for individual eel mass and background bacterial respiration. Results of the two-way ANOVA on rank-transformed data are shown as ($p < 0.05$). Post hoc comparisons indicating significant ($p < 0.05$) or close to significant differences ($p < 0.1$) are specified over the appropriate phases.

2.4.2 Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)

2.4.2.1 Adenylate Energy Charge

While hypoxic groups appeared to exhibit less variability than normoxic groups, AEC values remained within a similar range across both experiments (Fig. 2.3). Statistical analysis using unpaired Student's t-tests confirmed that AEC means did not significantly differ between treatment groups in either experiment ($p > 0.05$). The mean AEC values \pm standard deviation recorded were as follows: normoxia = 0.50 ± 0.11 (E1) and 0.46 ± 0.12 (E2); hypoxia = 0.46 ± 0.07 (E1) and 0.44 ± 0.05 (E2) (Fig. 2.3).

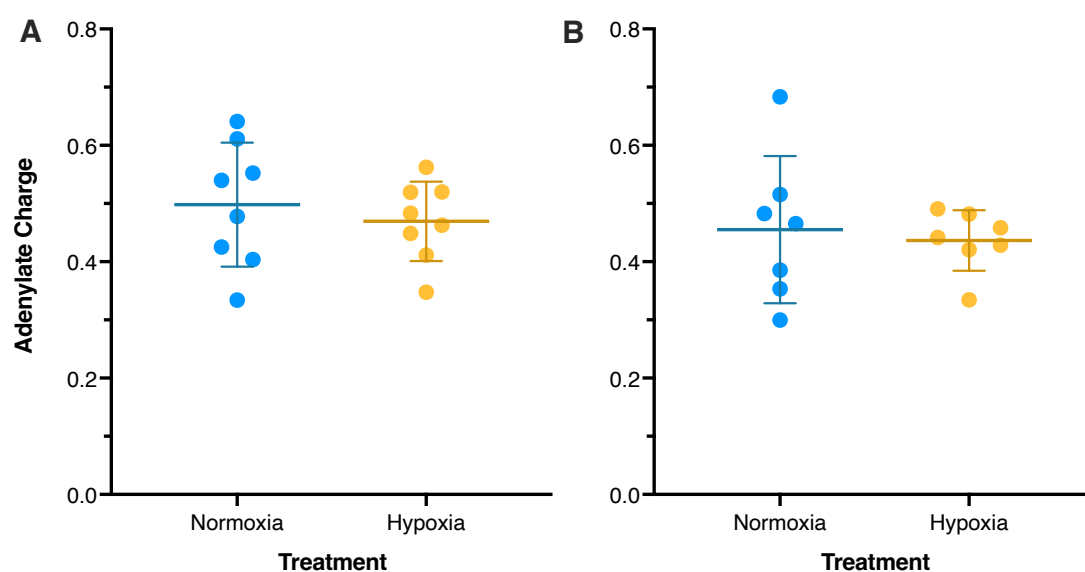


Figure 2.3 – Adenylate energy charge means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia, for experiment E1 (A) and experiment E2 (B). Dots represent individual fish adenylate energy charge values. Unpaired Student's t-tests confirmed no significant differences in adenylate energy charge means between treatment groups in either experiment.

Correlations between individual eel mass and whole eel AEC values were examined using Pearson correlation coefficients, with linear regressions applied (Fig. 2.4). In E1, correlations were weak for both normoxia ($r = 0.5834$, $p = 0.1290$) and hypoxia ($r = 0.3584$, $p = 0.3833$), with no significant associations detected. A narrow mass range was observed in Experiment 1 eels (Fig. 2.4 – A). In contrast, E2 eels exhibited a broader

mass distribution, as well as generally higher body mass (Fig. 2.4 – B). Stronger correlations were detected in normoxia ($r = 0.8410$, $p = 0.0177$), showing a significant positive association between mass and AEC, whereas hypoxia ($r = 0.6988$, $p = 0.0807$) displayed a moderate but non-significant correlation. Despite differences in mass between experiments, AEC values remained within a relatively similar range across both conditions and experiments.

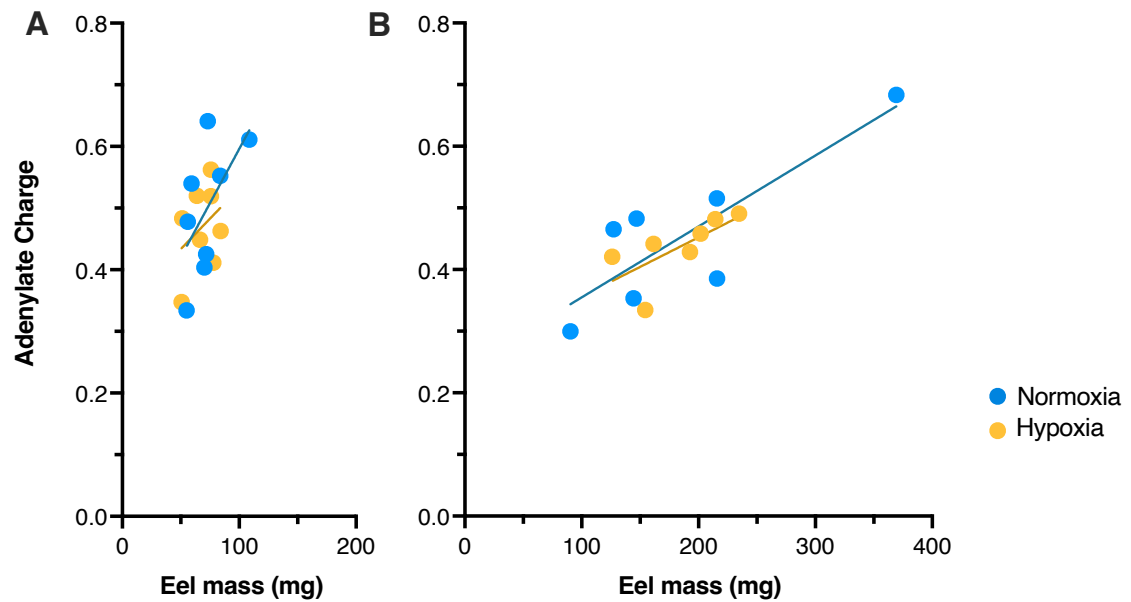


Figure 2.4 – Correlations between whole elver adenylate energy charge and eel mass. Linear regressions are applied for each treatment groups (normoxia and hypoxia), for Experiment 1 (A) and Experiment 2 (B).

2.4.2.2 Creatine phosphate/Creatine ratio

PCr/Cr ratio values varied between experiments, with E1 elvers generally displaying higher ratios compared to E2 (Fig. 2.5). Recorded PCr/Cr ratio mean values \pm standard deviations were as follows: normoxia = 0.23 ± 0.10 (E1) and 0.04 ± 0.05 (E2); hypoxia = 0.23 ± 0.17 (E1) and 0.02 ± 0.02 (E2) (Fig. 2.5). PCr/Cr ratio means did not differ significantly between hypoxia and normoxia groups within each experiment (unpaired Student's t-tests, $p > 0.05$). A log transformation was applied to E2 data due to deviations from normality (Shapiro-Wilk and D'Agostino skewness tests, as described in Materials and Methods).

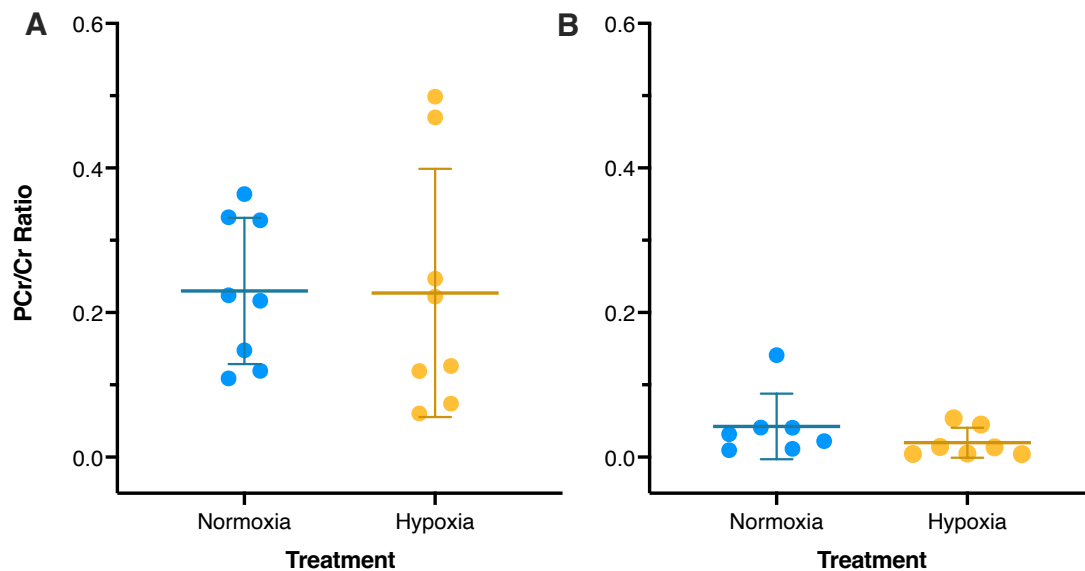


Figure 2.5 – Whole elver PCr/Cr ratio means (\pm SD) in fish exposed to normoxia or hypoxia, in experiment E1 (A) and experiment E2 (B). Dots represent individual fish PCr/Cr ratio values. Unpaired Student's t-tests confirmed no significant differences in PCr/Cr ratio means between treatment groups in either experiment.

2.4.2.3 Lactate concentration

Whole eel lactate concentration values remained within a similar range across both experiments (Fig. 2.6). However, mean lactate concentration differed significantly between treatment groups in E1 ($p = 0.02848$), as determined by an unpaired Student's t-test conducted on log-transformed data (Fig. 2.6 – A). For E2, the same test on non-transformed data found no significant ($p < 0.05$) difference in lactate concentrations (Fig. 2.6 – B). Lactate concentration means \pm standard deviations ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) were as follows: normoxia = 2.38 ± 1.21 (E1) and 5.58 ± 1.96 (E2); hypoxia = 5.19 ± 3.57 (E1) and 7.85 ± 3.69 (E2) (Fig. 2.6).

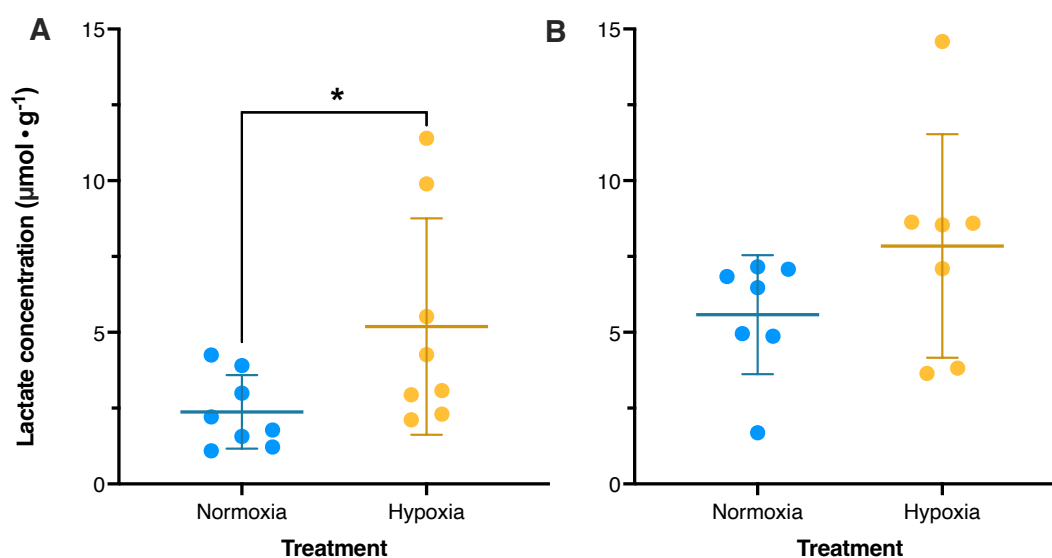


Figure 2.6 – Lactate concentration means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia, for experiment E1 (A) and experiment E2 (B). Dots represent individual fish lactate concentration values. Error bars denote standard deviations (SD). Unpaired Student's t-tests results are shown as ($p < 0.05$).

2.4.2.4 Link between lactate and PCr/Cr

Correlations between whole elver PCr/Cr ratio and lactate concentration log-transformed values were examined using Pearson correlation coefficients (Fig. 2.7). In E1, strong negative correlations were found for normoxia ($r = -0.7797$, $p = 0.225$) and hypoxia ($r = -0.7901$, $p = 0.0196$), both with significant associations detected. Likewise, correlations for E2 eels detected strong negative correlations in normoxia ($r = -0.8334$, $p = 0.0198$) and hypoxia ($r = -0.9009$, $p = 0.0056$), both displaying significant associations.

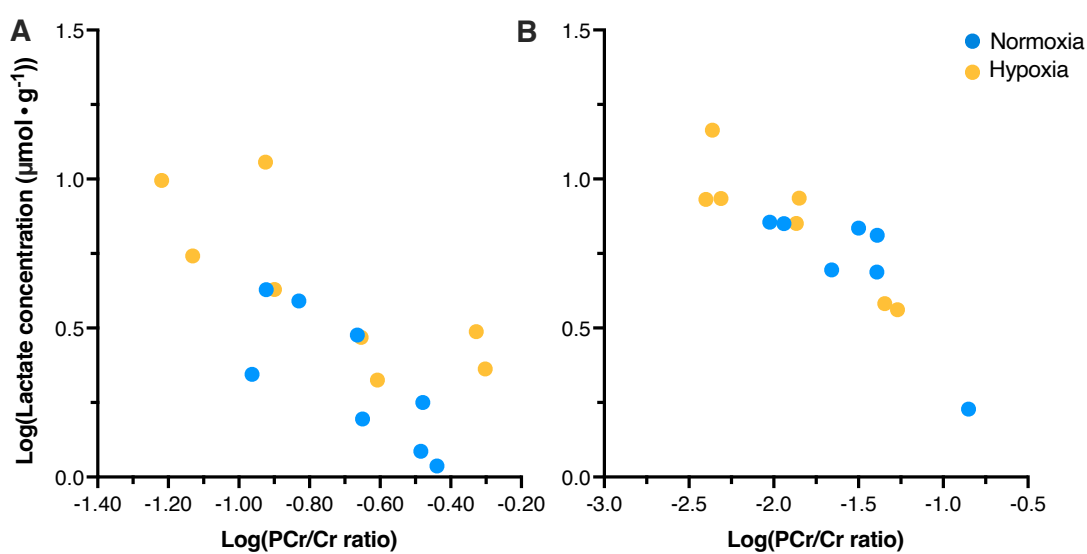


Figure 2.7 – Correlation between Log-transformed lactate concentration and PCr/Cr ratio on whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia, for experiment E1 (A) and experiment E2 (B).

2.4.3 Relative Protein Synthesis Rate (E2)

Whole elver relative protein synthesis rate (relative PSR) was measured in fish exposed to 8 hours of constant hypoxia (E2). Fish generally displayed similar values in the normoxia group, while fish from the hypoxia group exhibited greater variability and a tendency to have higher values (Fig. 2.8). However, Welch's t-test detected no significant difference in relative PSR between treatment groups.

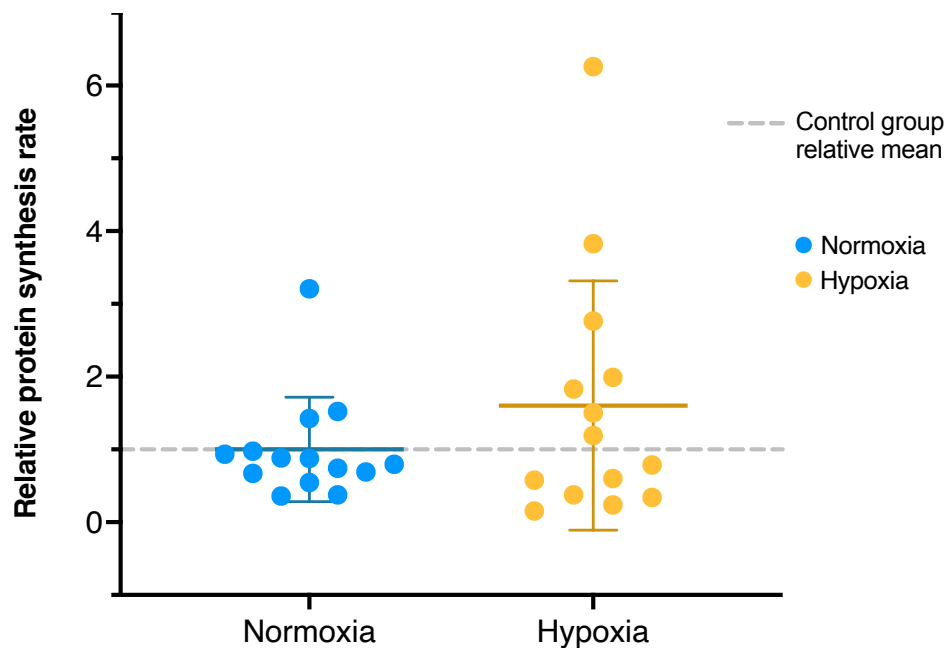


Figure 2.8 – Relative protein synthesis rate (relative PSR) means (\pm SD) in whole elvers exposed to either normoxia or hypoxia, for experiment E2. Dots represent individual fish relative PSR values. Welch's t-test confirmed no significant differences in relative PSR means between treatment groups.

2.5 Discussion

The primary objective of this study was to investigate the physiological responses of young American eel elvers to acute hypoxia in freshwater. Using a combination of respirometry and molecular markers, including AEC, PCr/Cr ratio, lactate concentration, and relative protein synthesis rate, we aimed to gain an integrated view of how this early life stage responds to declining oxygen availability. We initially hypothesized that their small size, associated with high metabolic demands and limited capacity for sustained anaerobic ATP production, would make them intolerant to hypoxia. Results partially support this hypothesis. Our data confirm initial predictions regarding overall stable $\dot{M}O_2$ and relative PSR values between normoxia- and hypoxia-exposed elvers. Furthermore, lactate concentration levels were higher in hypoxia groups, although not always significantly. However, contrary to expectations, AEC and PCr/Cr ratios remained unaltered between treatment groups.

2.5.1 $\dot{M}O_2$ remains largely unaffected during graded hypoxia (E1)

We measured the metabolic rate of young elvers during graded hypoxia, down to 15% air saturation, below which mortality occurred during preliminary trials. At 16 °C, 15% air saturation corresponds to 1.48 mg/L, while 10% equals 0.987 mg/L. Here, young American eel elver tolerance to acute hypoxia seems similar to, if not higher than, many fish species when compared to the theoretical 2 mg/L threshold (Rabalais, 2009). This threshold may not accurately reflect the species-specific physiological tolerance, as hypoxia sensitivity is influenced not only by oxygen concentration but also by factors such as acclimation temperature. Direct comparisons across species should therefore be made with caution. Still, similar to their relative, the short-finned eel elvers (*Anguilla australis*), which has an LC₅₀ of 0.54 mg/L at 15 °C (Landman *et al.*, 2005), American elvers appeared to approach a critical threshold during preliminary trials at 10% minimum air saturation (0.987 mg/L). Although American eel elvers appeared to tolerate acute hypoxia down to 15% air saturation (1.48 mg/L) at 16 °C without major reductions in oxygen consumption, determining their true hypoxia tolerance remains challenging and would require formal LC₅₀ assessment.

Metabolic rate analysis revealed that elvers exhibit an equivocal metabolic response when acutely exposed to graded hypoxia. Although overall analysis using a GAM

did not show a significant treatment effect over time (Fig. 2.1), divergence between groups emerged during the early stages of oxygen decline, particularly at 30% and 25% air saturation, where $\dot{M}O_2$ increased in hypoxia-exposed eels compared to controls (Fig. 2.2). This transient increase in metabolic rate may reflect an initial avoidance response, as the elvers likely attempted to escape the deteriorating oxygen conditions (Domenici *et al.*, 2000; Herbert and Steffensen, 2006), thereby elevating activity and oxygen consumption. The return to control levels under more severe hypoxia (20% and 15%) suggests that the elvers may abandon escape attempts as oxygen availability becomes critically low, possibly shifting to a more passive survival strategy (Selye, 1976; Schreck and Tort, 2016). These findings indicate that metabolic responses in young American elvers are most pronounced during moderate oxygen decline and stabilize as conditions worsen. Thus, eels did not appear to modulate oxygen consumption during acute freshwater hypoxia, neither by reducing activity nor by effectively inducing metabolic depression (Speers-Roesch *et al.*, 2018; Reeve *et al.*, 2022; Ducros *et al.*, 2024).

2.5.2 Molecular metabolic markers quantification (E1 & E2)

2.5.2.1 Energetic status seems to be kept stable

Our results suggest that young elvers maintain a stable energetic status during acute hypoxia exposure, as indicated by unchanged AEC (Fig. 2.3) and PCr/Cr ratios (Fig. 2.5) across treatments. This may indicate a certain degree of tolerance to hypoxia during short-term exposure. While the absolute values were lower than those reported for other fish species, these differences likely reflect variations in body size, developmental stage, and whole-body versus tissue-specific measurements.

The AEC of unstressed organisms typically ranges between 0.87 and 0.94 (Atkinson, 1968; Chapman *et al.*, 1976; Vetter and Hodson, 1982; Giesy, 1988). The whole-body AEC values measured for *A. rostrata* elvers in this study were lower than expected (Fig. 2.3) and below the range reported for other fish species in both normoxia and hypoxia. In normoxia conditions, 0.60 was measured in goldfish liver (*Carassius auratus*; van den Thillart *et al.*, 1980), 0.65 in European eel liver (*Anguilla anguilla*, probably at the yellow stage; van Waarde *et al.*, 1983), and 0.67 in the muscle of largemouth bass (*Micropterus salmoides*; Giesy, 1988). These measurements are the closest to the whole-body eel values observed in this study. Although values obtained from American elvers were

lower than those reported in goldfish, European eel, and largemouth bass, such comparisons must be interpreted cautiously due to differences in body size, developmental stage, and tissue-specific versus whole-body measurements.

Even if the European eel (*Anguilla anguilla*) is the closest species to *Anguilla rostrata* (Nikolic *et al.*, 2020), the much larger size of individuals in the previously mentioned study (~ 80 g, probably at the yellow stage; van Waarde *et al.*, 1983) limits direct comparisons with the young elvers used in our experiments. In that same study, the AEC of *Anguilla anguilla* remained stable during brief, severe hypoxia but declined under anoxia, suggesting that responses may differ with the severity of oxygen deprivation. In our study, AEC values remained consistent across both experiments despite differences in body mass (Fig. 2.3 & 2.4), suggesting that the low values observed in *Anguilla rostrata* elvers may reflect a whole-body response characteristic of this early developmental stage. Alternatively, these values could result from a stress response associated with the experimental conditions or differences in analytical methods. Slightly greater inter-individual variability in normoxic eels was also noted, but further research is needed to confirm whether this reflects a consistent biological pattern.

Similar to the AEC, the PCr/Cr ratio did not differ significantly between treatment groups in either experiment (Fig. 2.5). This contrasts with findings in other species (*Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Sarotherodon mossambicus*, *Carassius auratus*), where a decrease in PCr during hypoxia is often observed while AEC and/or ATP levels remains stable (van Waarde *et al.*, 1983; Ginneken *et al.*, 1995). In our study, *Anguilla rostrata* elvers showed no clear physiological changes in PCr utilization under hypoxic conditions. Unlike for the AEC, the PCr/Cr results from E1 differ more noticeably in overall range compared to those observed in E2 (Fig. 2.5). The differences in PCr/Cr between experiments may reflect the holding conditions in E2, where eels had greater freedom to swim, potentially leading to an overall increase in PCr utilization (Negrete *et al.*, 2024) and a consequently lower PCr/Cr ratio for both normoxia and hypoxia fish.

In addition to high-energy phosphates, we also assessed whole-body lactate concentration to determine whether young elvers activate anaerobic metabolism during acute hypoxia. As expected, lactate levels were significantly higher in hypoxia-exposed eels in E1 (Fig. 2.6 – A), while E2 eels showed a similar, but non-significant, trend (Fig. 2.6 – B).

These findings indicate that young elvers exposed to low oxygen concentrations rely increasingly on anaerobic glycolysis to meet energy demands, despite the absence of changes in AEC or PCr/Cr ratios by the end of the exposure.

The whole-body lactate concentrations observed in this study during hypoxia (pooled E1 and E2 data mean \pm SD = $6.43 \pm 3.75 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) are marginally elevated compared to fish in normoxia (pooled E1 and E2 data mean \pm SD = $3.87 \pm 2.26 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). This suggests that young elvers activate glycolytic pathways under acute hypoxia to maintain their energetic metabolism. Interestingly, the whole-body lactate concentrations observed in this study are remarkably similar to those reported for older eels (*Anguilla anguilla*, probably at the yellow eel stage; ~ 80 g) under severe hypoxia (van Waarde *et al.*, 1983). This consistency suggests that young *Anguilla rostrata* elvers engage in a comparable anaerobic metabolic response, characterized by moderate lactate accumulation, without extreme elevation, reflecting a potentially conserved strategy for coping with acute oxygen limitation in Anguillid eels. This low lactate accumulation combined with their lack of $\dot{M}\text{O}_2$ response reflects a modest transitional physiological adjustment rather than a severe metabolic collapse.

Notably, a strong negative correlation between lactate concentration and PCr/Cr ratio was observed across both normoxic and hypoxic individuals (Fig. 2.7). This pattern is consistent with the expected sequence of metabolic adjustments in fish, where PCr is used first to buffer ATP demand, followed by a shift to anaerobic glycolysis as hypoxia persists (Nilsson and Östlund-Nilsson, 2008; Negrete *et al.*, 2024). The consistency of this relationship across oxygen treatments may reflect subtle baseline metabolic variations or transient behavioral responses, such as increased activity. This reliance on anaerobic pathways, combined with limited acid-buffering capacity, likely defines the size-related physiological limits of young elvers under severe hypoxia and underscores the ecological relevance of hypoxia sensitivity during early life stages.

2.5.2.2 Protein synthesis rate is maintained under stable hypoxia

Protein synthesis is an energetically costly process, often accounting for 20–40% of whole-animal oxygen consumption in fast-growing juvenile fish (Houlihan *et al.*, 1988; Lyndon *et al.*, 1992). In some fish species, hypoxia leads to a reduction in protein synthesis

as a means to conserve energy (Smith *et al.*, 1996; Cassidy *et al.*, 2018; Cassidy and Lamarre, 2019). This strategy seems to be used by some hypoxia-tolerant fish, such as Amazonian cichlids (Cassidy *et al.*, 2018). In this study, young elvers did not appear to adopt this strategy. Relative PSR, measured in E2 fish, showed no significant decrease under hypoxia. In fact, relative PSR values tended to be higher and more variable in hypoxia-exposed individuals compared to normoxic controls (Fig. 2.8). If this apparent increase is biologically meaningful, the exposure to graded hypoxia may have disrupted cellular homeostasis, triggering endoplasmic reticulum stress and activation of the unfolded protein response (Cassidy and Lamarre, 2019). This cellular stress response promotes increased protein synthesis of chaperone proteins involved in maintaining protein folding capacity. Such a mechanism probably contributed to the elevated and more variable relative PSR observed in hypoxia-exposed eels. Further research would be needed to confirm whether these responses reflect an adaptive strategy or a stress-induced dysregulation of protein metabolism in American eel elvers under acute hypoxia.

2.5.3 Conclusion

Together, these findings suggest that young American eel elvers maintain stable metabolic functions when exposed to graded hypoxia, indicating some degree of short-term tolerance, but this could also suggest a limited capacity for plasticity. However, observed mortality at more severe oxygen depletion would seem to hint at a certain degree of physiological limits, suggesting greater vulnerability in early life stages compared to the documented hypoxia tolerance of adults. These results provide a useful foundation for future studies on the ecological consequences of hypoxia exposure in this species, particularly given the increasing intensity and variability of environmental stressors in freshwater habitats.

2.6 Acknowledgements

We acknowledge the generous contribution of our fish by *Atlantic Canada Eels Inc.*, without which this study would not have been possible. We would also like to thank Ben Speers-Roesch and the Department of Fisheries and Oceans Canada for lending us some key equipment components, which proved essential to the experimental procedures. We want to recognize the contribution of Maxime Boudreau with the main programming of the respirometers and gaseous nitrogen injection systems, as well as thank him for his help and availability during troubleshooting calls about coding issues.

2.7 Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

2.8 Author contributions

Conceptualization: A.S.L.-R., S.G.L.; Methodology: A.S.L.-R., L.D., S.G.L.; Formal analysis: A.S.L.-R.; Investigation: A.S.L.-R.; Resources: S.G.L.; Data curation: A.S.L.-R.; Writing – original draft: A.S.L.-R.; Writing – review & editing: A.S.L.-R., L.D., A.C., S.G.L.; Visualization: A.S.L.-R., L.D.; Supervision: S.G.L.; Project administration: S.G.L.; Funding acquisition: S.G.L.

2.9 Funding

A.S.L.-R. was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) graduate scholarship. L.D. was supported by an Acadie-France-Bernard-Imbeault scholarship. S.G.L. was supported by NSERC Discovery Grants and the New Brunswick Innovation Fund.

2.10 Supplementary figures

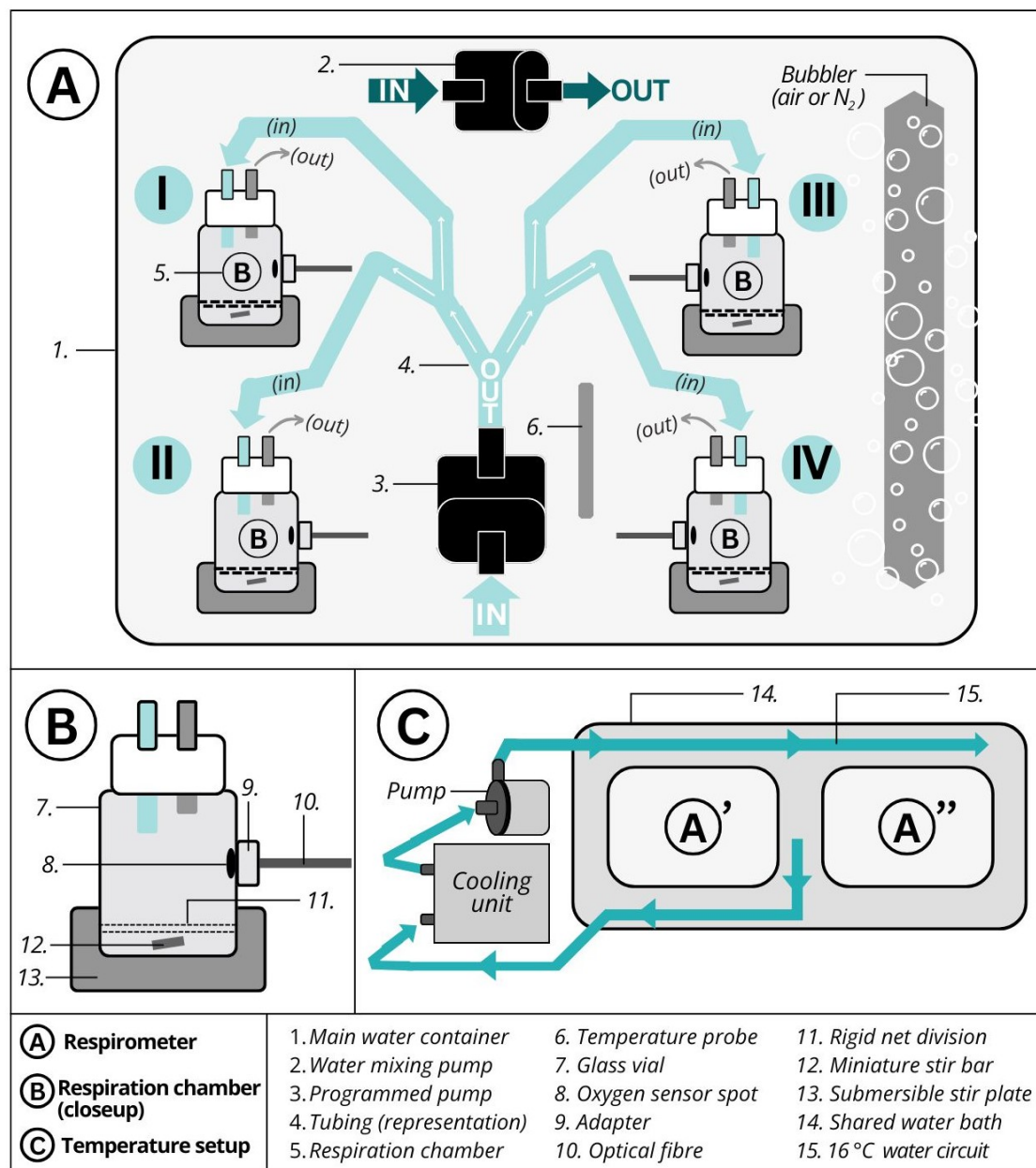


Figure S1 – Custom respirometry system design.

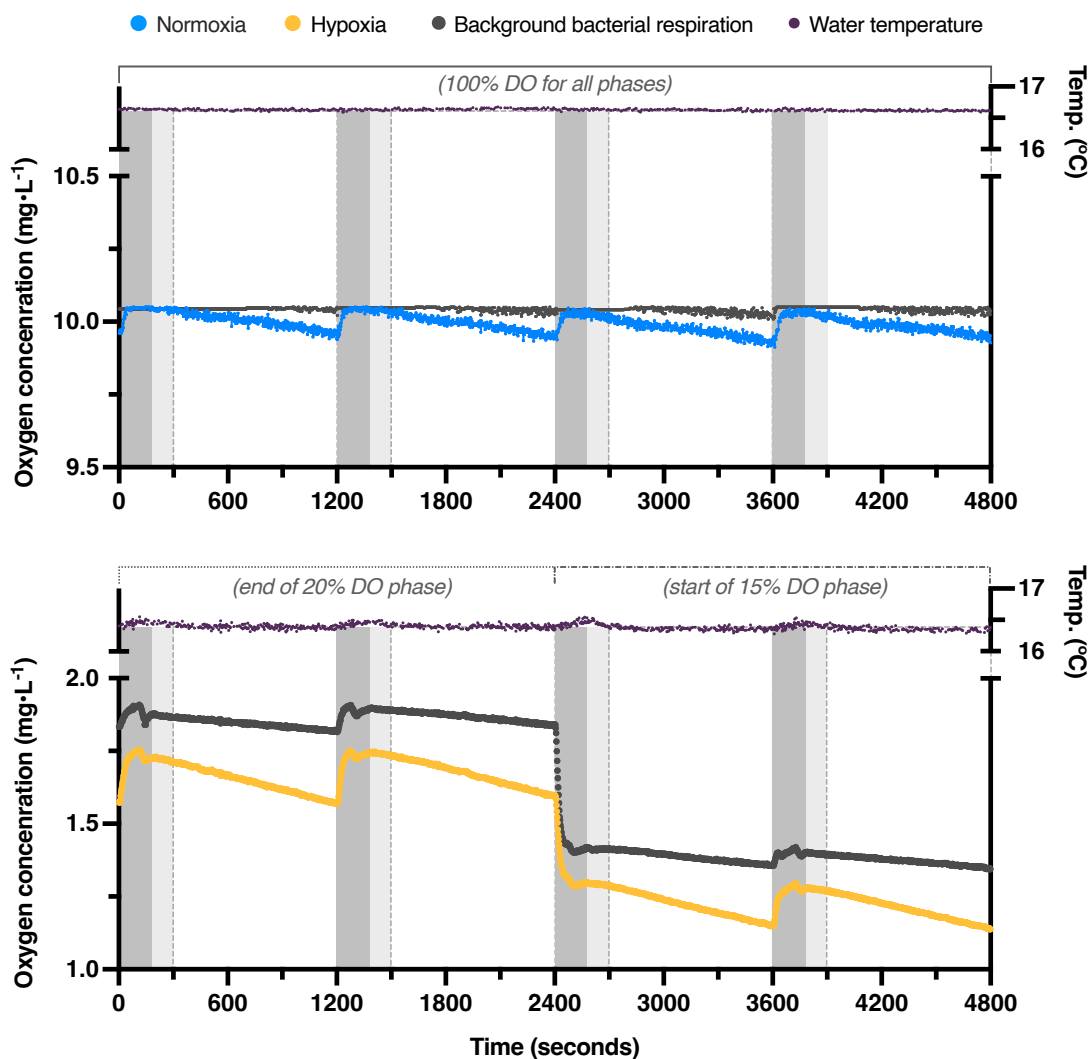


Figure S2 – Typical respiration trace of elvers in either normoxia (top) or hypoxia (bottom), during experiment E1. Hypoxia trace shows two respiration cycles during the end of the 20% phase and the two first respiration cycles during the start of the 15% phase. Normoxia trace shows equivalent cycles in time, but at constant 100% air saturation. Water temperature and background bacterial respiration traces measured at the same time by both respirometers are shown in respective panels.

CHAPITRE III
Discussion générale

3.1 Retour global sur les objectifs

L'objectif principal de cette thèse était de mesurer et de déterminer la réponse des jeunes civelles pigmentées de l'anguille d'Amérique face à l'hypoxie en eau douce. Notre hypothèse principale stipulait que compte tenu leur petite taille, impliquant une forte demande métabolique et une capacité limitée à assurer la production d'ATP à long terme par voie anaérobie, les jeunes civelles pigmentées d'*Anguilla rostrata* (< 7 cm) seraient intolérantes à l'hypoxie. La prédiction P1 prévoyait qu'elles ne parviendraient pas à réguler efficacement leur métabolisme aérobie et que, par conséquent, leur taux métabolique (via $\dot{M}O_2$) ainsi que leur taux de synthèse des protéines post-hypoxie (via PSR relatif) seraient similaires à ceux des groupes en normoxie. Nous nous attendions également, via la prédiction P2, que l'hypoxie agisse au niveau de la gestion énergétique en induisant une altération de la charge énergétique en adénylates (AEC), une diminution du ratio PCr/Cr et une accumulation de lactate.

Les valeurs de $\dot{M}O_2$ et de PSR relatif obtenues concordent avec nos prédictions initiales concernant l'invariabilité entre les poissons exposés à la normoxie et ceux exposés à l'hypoxie. De plus, tel qu'attendu, les concentrations de lactate étaient plus élevées dans les groupes exposés à l'hypoxie, même si elles ne l'étaient de façon significative que pour l'expérience E1. Cependant, contrairement aux attentes de nos prédictions initiales, les ratios d'AEC et de PCr/Cr sont restés inchangés entre les groupes de traitements. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que les jeunes civelles pigmentées d'anguilles d'Amérique présentent un certain degré de tolérance à court terme à l'hypoxie en eau douce en maintenant leur statut énergétique. Cependant, l'absence de régulation du $\dot{M}O_2$ et du PSR relatif suggèrent qu'elles disposent d'une plasticité métabolique vraisemblablement limitée pour faire face à des épisodes hypoxiques plus aigus ou chroniques en nature.

Afin de simplifier la lecture, les termes « jeune civelle pigmentée » et « civelle » seront utilisés de façon interchangeable afin de référer aux anguilles de cette étude, c'est-à-dire des civelles pigmentées s'étant graduellement transformées à partir du stade de civelle transparente depuis peu de temps (< 6 mois depuis l'arrivée en eaux continentales) et ayant débuté le comportement d'alimentation, ainsi que le processus de pigmentation. Toute autre signification du mot « civelle » sera précisée dans le texte.

3.2 Réponse des civelles face à l'hypoxie

3.2.1 Gestion du métabolisme énergétique

Selon les marqueurs analysés dans le cadre de cette étude, les civelles semblent principalement utiliser la glycolyse anaérobie afin de supporter leur métabolisme énergétique face à l'hypoxie. La présence de concentrations de lactate plus élevées chez les civelles des groupes hypoxiques (Fig. 2.6), en plus de la constance des ratios d'AEC et de PCr/Cr après 8 heures d'hypoxie (Fig. 2.3 et 2.5, respectivement), semble démontrer le maintien du statut énergétique grâce à l'activation du métabolisme anaérobie. En parallèle, la respiration mitochondriale a possiblement été réprimée, comme cela a été observé chez les civelles transparentes d'*Anguilla anguilla* (Pierron *et al.*, 2007), mais cette réponse resterait à confirmer chez les civelles pigmentées d'*Anguilla rostrata*.

La corrélation négative observée entre le lactate et le ratio PCr/Cr (Fig. 2.7) correspond à la réponse des ajustements métaboliques attendue chez des poissons. Quand la PCr est d'abord mobilisée pour tamponner la demande en ATP, un passage à la glycolyse anaérobie est mis en œuvre après un certain temps d'exposition à l'hypoxie (Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008; Negrete *et al.*, 2024). La constance de cette relation, observée entre les différents groupes de traitement de notre étude, pourrait refléter de subtiles variations du métabolisme basal ou des réponses comportementales transitoires, telles qu'une activité de nage accrue.

Hormis le recours au métabolisme anaérobie, les civelles ne semblent pas adopter les stratégies couramment observées chez d'autres espèces de poissons en réponse à l'hypoxie. Parmi ces stratégies figurent, par exemple, la modulation de la consommation d'oxygène, notamment par la réduction de l'activité sporadique (Speers-Roesch *et al.*, 2018; Reeve *et al.*, 2022; Ducros *et al.*, 2024) et du taux de synthèse des protéines (Smith *et al.*, 1996; Cassidy *et al.*, 2018; Cassidy et Lamarre, 2019). Nos mesures de respirométrie et de PSR relatif auraient dû détecter ces stratégies si les civelles les avaient déployées. En effet, les valeurs de $\dot{M}O_2$ et de PSR relatif sont demeurées généralement constantes (Fig. 2.1 et 2.8, respectivement), ce qui indique l'absence d'adoption de ces stratégies et, par conséquent, l'absence de dépression métabolique chez nos civelles.

La petite taille des civelles constituait toutefois une contrainte technique, notamment en ce qui concerne la résolution des données de $\dot{M}O_2$ et de PSR relatif.

Cette contrainte technique souligne par ailleurs la nécessité d'une optimisation supplémentaire, notamment pour raccourcir la phase de mesure dans le respiromètre (< 15 min). Une telle amélioration permettrait d'obtenir davantage de valeurs de $\dot{M}O_2$ par heure (> 3), ce qui offrirait une meilleure résolution temporelle (Lighton et Halsey, 2011) et une représentation plus précise de la réponse respiratoire des civelles. Dans le même ordre d'idées, le raffinement de la technique du bain pour l'incorporation des acides aminés (Phe et D5) permettrait de mieux satisfaire les quatre suppositions associées au calcul du K_s (Garlick *et al.*, 1980; Lamarre *et al.*, 2015), renforçant ainsi nos observations et permettant de se passer du recours au PSR relatif comme approximation du K_s .

En ce qui concerne l'interprétation des réponses physiologiques discutées ci-dessus, ainsi que des résultats du Chapitre 2, d'autres facteurs méritent également d'être pris en compte. Tout d'abord, malgré les précautions et les bonnes pratiques mises en œuvre, le passage du milieu naturel au laboratoire constitue un événement particulièrement stressant pour les poissons (Harper et Wolf, 2009), notamment durant les périodes de métamorphose (Barton, 2002). Puisque nos civelles, au stade transparent, ont été pêchées peu après leur arrivée post-migratoire en eau douce et ont vécu au moins deux périodes de transport avant d'être transférées dans les aquariums du laboratoire, un stress important leur a été imposé. À la suite de la période d'acclimatation et de la stimulation du comportement alimentaire en eau douce, les civelles sélectionnées pour les expériences devaient être vives et en santé optimale, afin d'éviter toute condition physiologique préexistante susceptible d'influencer les mesures de leur réponse à l'hypoxie. Ainsi, les individus ayant potentiellement moins bien surmonté l'ensemble des événements stressants avant les expériences, et n'ayant pas été sélectionnés ici, pourraient avoir présenté des réactions physiologiques différentes face à l'hypoxie. Toutefois, en raison du manque de données disponibles sur cette problématique, certaines limites expérimentales ont dû être acceptées afin de permettre l'acquisition d'informations de base.

Par ailleurs, le fait que les valeurs présentées et analysées proviennent exclusivement d'individus ayant survécu aux expériences pourrait avoir introduit un biais dans l'évaluation de la réponse réelle des civelles à l'hypoxie. Lors de l'expérience E2 (hypoxie stable), aucune mortalité liée au protocole n'a été observée. Lors de l'expérience E1 (hypoxie aiguë graduelle), très peu d'individus sont décédés lors

des expériences, qui allaient jusqu'à un minimum de 15 % de saturation en air. Or, 80 % (n = 8/10 individus) des civelles exposées à l'hypoxie lors d'essais préliminaires d'optimisation, qui allaient à un minimum de 10 % de saturation en air, sont décédées. Ce cas de figure démontre que malgré leur apparente stoïcité métabolique face à l'hypoxie, les civelles ont peut-être une certaine difficulté à gérer cet événement stressant et y sont rapidement fatalement vulnérables une fois un certain seuil atteint. Toutefois, il demeure actuellement impossible de déterminer quel facteur, ou quelle combinaison de facteurs, s'est révélé le plus limitant entre le temps cumulé passé en hypoxie, le caractère graduel de l'hypoxie aiguë, ou encore sa descente jusqu'à 10 % de saturation en air.

Finalement, tel qu'évoqué précédemment, les poissons juvéniles sont généralement moins tolérants à l'hypoxie que les adultes de la même espèce (Diaz et Breitburg, 2009). Cette sensibilité accrue découle de leur petite taille et de leur taux métabolique massique plus élevé, deux facteurs qui limitent leur capacité à assurer le soutien prolongé de leur demande énergétique par la voie anaérobie (Nilsson et Östlund-Nilsson, 2008). Nos observations expérimentales, combinées avec les indices laissés par les marqueurs formellement analysés, suggèrent qu'un mécanisme plus prioritaire serait à l'œuvre, soit la réponse comportementale.

3.2.2 Indices de patrons comportementaux chez les civelles

L'analyse globale des marqueurs de cette étude suggère que la disponibilité en oxygène a eu un effet sur les jeunes civelles pigmentées d'anguilles d'Amérique. Les indices fournis par les marqueurs métaboliques, combinés à nos observations expérimentales, suggèrent que la tactique physiologique des civelles face à l'hypoxie est généralement passive, tandis que l'activation du comportement de fuite pourrait constituer une stratégie plus immédiate en réponse à de faibles concentrations en oxygène. Bien que le comportement de fuite n'ait pas été mesuré directement par nos protocoles expérimentaux, il demeure pertinent d'explorer les mécanismes potentiels en jeu, ainsi que les répercussions qu'une telle stratégie, utilisée comme première ligne de défense, pourrait avoir chez les civelles.

Ce type de réponse comportementale pourrait correspondre à la mobilisation du syndrome général d'adaptation (SGA) chez les civelles. Le SGA englobe une cascade de réponses hormonales et comportementales face à un élément stressant (Selye, 1976; Giesy,

1988; Schreck et Tort, 2016). Si l'élément stressant est perçu comme menaçant pour la survie, le SGA est initié et passe par trois stades successifs : (1) l'alerte, qui implique des réactions de combat, de fuite ou d'ajustement (« coping » en anglais); (2) la résistance; et (3) la compensation et/ou éventuellement l'épuisement/la mort (Selye, 1976; Schreck et Tort, 2016).

Lors de l'expérience E1, les civelles ont vraisemblablement perçu le début de l'hypoxie graduelle comme un stress aigu, déclenchant la phase d'alarme, caractérisée par des tentatives d'évitement et, possiblement, par la mobilisation de mécanismes d'ajustement. Au fil du temps, le stade de résistance semble avoir pris le relais, comme en témoigne le retour du $\dot{M}O_2$ à des valeurs comparables à celles observées chez les poissons en normoxie, ainsi que les valeurs inchangées de la charge des adénylates et du ratio PCr/Cr. Vers la fin de l'expérience E1, le stade trois du SGA était probablement en action, tel que suggéré par l'accumulation de lactate, ainsi que par la mortalité observée lors des passages à 10 % de saturation en air durant les essais d'optimisation. Bien que les civelles de l'expérience E2 aient été exposées à une faible saturation en air constante, contrairement à celles de l'expérience E1 qui ont subi une hypoxie progressivement plus aiguë, il est possible qu'une séquence de réponses physiologiques similaire ait également eu lieu. L'absence de phases d'hypoxie progressivement plus aiguës lors de l'expérience E2 pourrait même avoir permis aux civelles de prolonger leur stade d'alarme (fuite/ajustement), en ralentissant leur dépense énergétique et leur consommation d'oxygène. Cette stratégie évoque celle observée chez le hareng de l'Atlantique (*Clupea harengus*), qui augmente sa vitesse de nage en situation d'hypoxie, en réponse à la détresse respiratoire et dans l'effort de rejoindre des conditions environnementales plus favorables (Domenici *et al.*, 2000; Herbert et Steffensen, 2006). Chez l'anguille, une telle réponse de fuite pourrait également être plausible, puisqu'il est établi que les individus adultes émergent parfois de l'eau, notamment pour échapper à des conditions aquatiques défavorables (Tesch, 1977; Redmann *et al.*, 2020).

Une autre stratégie comportementale qui pourrait avoir été adoptée par nos jeunes civelles pigmentées est l'augmentation de l'activité ventilatoire, comme cela a été observé chez les civelles transparentes d'anguilles d'Europe (Pierron *et al.*, 2007). Lorsqu'elles sont exposées à une concentration d'oxygène dissous passant de 21 kPa à 6 kPa, les civelles

transparentes d'Europe (encore à jeun après leur migration) ont augmenté leur fréquence ventilatoire de 142 % (Pierron *et al.*, 2007). En guise de contexte, les pressions d'oxygène testées lors de l'étude de Pierron *et al.* équivalent à un passage en saturation d'air d'environ $\sim 99,99$ % à $\sim 28,57$ % (ou encore $\sim 10,63$ mg/L à $\sim 3,03$ mg/L), ce qui est relativement semblable aux conditions hypoxiques de notre étude. Il est impossible de comparer directement nos résultats avec ceux de Pierron *et al.* (2007), en raison de plusieurs différences méthodologiques : la ventilation n'a pas été mesurée dans notre étude et les paramètres de l'eau étaient différents, en plus du fait que nos jeunes civelles pigmentées appartenaient à une autre espèce et à un stade de vie différent. Néanmoins, il demeure plausible qu'une réaction similaire ait pu se produire. Cependant, si les civelles d'anguilles d'Amérique ont effectivement eu recours à l'hyperventilation pour améliorer leur apport en oxygène, il est surprenant de constater que le $\dot{M}O_2$ n'a pas augmenté de manière significative, étant donné que ce processus est énergétiquement très coûteux (Jones et Schwarzfeld, 1974; Mandic *et al.*, 2020). Puisque la consommation d'oxygène est demeurée constante malgré des concentrations très faibles en oxygène dissous, un mécanisme de compensation alternatif, autre que la répression du K_s , a probablement été activé en parallèle afin de maintenir la stabilité observée du $\dot{M}O_2$. Il resterait à confirmer si les jeunes civelles pigmentées d'*Anguilla rostrata* hyperventilent en condition d'hypoxie et, le cas échéant, quels mécanismes physiologiques compensatoires sont mobilisés.

3.2.3 L'importance des variations inter-individuelles

La variation inter-individuelle était omniprésente dans les données obtenues lors de cette étude. Tel que mentionné lors de l'introduction générale, *Anguilla rostrata* et *Anguilla anguilla* sont maintenant considérées comme étant des espèces catadromes facultatives (Jessop *et al.*, 2002; Daverat *et al.*, 2006; Marohn *et al.*, 2013; Gaillard *et al.*, 2016; Durif *et al.*, 2023). Découlant de cette variabilité du choix de l'habitat, il a été démontré que certains profils/prédispositions distincts sont identifiables chez les civelles transparentes d'*Anguilla anguilla*. Contrairement aux individus qui restent en eau salée, les civelles transparentes d'Europe avec une préférence pour l'eau douce ont des taux de croissances plus lents (Edeline *et al.*, 2005b), un potentiel d'activité locomotrice plus élevé (Edeline *et al.*, 2004, 2005a) et un meilleur indice de condition physique (Edeline *et al.*, 2006).

La compréhension des mécanismes sous-jacents qui régulent ce comportement migratoire demeure partielle, bien que l'activité hormonale thyroïdienne (Edeline *et al.*, 2004) et le statut énergétique (Edeline *et al.*, 2006) seraient impliqués. Étant donné que les civelles de notre étude ont été récoltées au stade transparent dès leur arrivée post-migratoire dans une zone d'eau douce riveraine tidale, il est possible que leur prédisposition naturelle au choix d'habitat ait pu influencer nos résultats. Il se peut qu'ultimement, certaines des civelles de notre étude n'aient pas eu la prédisposition à choisir l'eau douce comme destination finale si elles étaient restées en milieu naturel. D'un autre côté, l'indice de condition physique élevé, résultant des paramètres optimaux de nourriture et de qualité de l'eau en captivité, pourrait avoir artificiellement amplifié leur capacité de tolérance à l'hypoxie en eau douce (Edeline *et al.*, 2006). Vérifier si des individus établis dans différentes zones post-migratoires présentent une variabilité dans leur réponse et leur tolérance à l'hypoxie constituerait donc une piste intéressante.

3.3 L'avenir d'*Anguilla rostrata* face à l'hypoxie

3.3.1 Impact potentiel sur la dynamique de la population

Anguilla rostrata est reconnue comme étant une espèce panmictique (Wirth et Bernatchez, 2003), signifiant que malgré son aire de distribution extrêmement vaste et aux habitats variables, l'espèce en entier doit être considérée (et gérée) comme étant une seule population. Ainsi, si des facteurs stressants tels que l'hypoxie perturbent la disponibilité ou le choix d'habitat post-migratoire prédisposé chez les civelles, c'est l'ensemble de l'espèce qui pourrait en devenir vulnérable.

En plus d'être lié aux prédispositions individuelles, tant physiques que physiologiques, le choix et l'utilisation de l'habitat par les civelles semblent également étroitement associés à la détermination sexuelle des individus. La maturation sexuelle serait liée à l'expression phénotypique, qu'elle soit plastique, génétique ou épigénétique, et modulée par le contexte géographique, ainsi que par les conditions environnementales propres à l'habitat sélectionné par les individus, qu'elles soient stables ou fluctuantes (Tremblay, 2009; Jessop, 2010; Côté *et al.*, 2014). La latitude et la température de l'habitat sélectionné par les civelles pourraient également constituer des marqueurs environnementaux importants du sexe des individus, ainsi que de leur potentiel de vitesse de croissance (Verreault *et al.*, 2009; Jessop, 2010; Côté *et al.*, 2015). La densité d'anguilles

dans un habitat donné pourrait également constituer un indicateur pertinent du sexe des individus, les faibles densités étant généralement associées à une proportion plus élevée de femelles, tandis que les densités plus élevées tendent à favoriser les mâles. Toutefois, cette relation reste à être étudiée plus en profondeur chez *Anguilla rostrata* (Côté *et al.*, 2015).

La répartition sexuelle montre également une prédominance de femelles en eaux douces, avec une présence moins importante en milieux estuariens, où les mâles sont quant à eux presque exclusivement localisés (Vladykov, 1966; Verreault *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2014). En effet, certaines zones d'eaux douces aux latitudes plus nordiques, qui sont parallèlement les lieux demandant les migrations les plus longues, sont systématiquement presque exclusivement colonisées par des civelles se dirigeant vers une maturation sexuelle femelle (Tremblay, 2009; Verreault *et al.*, 2009, 2012; Côté *et al.*, 2015). Une zone importante de ce type est le bassin versant du fleuve du Saint-Laurent (QC), où les femelles qui s'y développent atteignent généralement de grandes tailles et contribuent ainsi de manière significative à la production d'œufs lors de la période de reproduction, une fois le stade argenté atteint (Tremblay, 2009). Les femelles retrouvées plus au sud, notamment dans la région de la baie de Fundy, présentent quant à elles une taille corporelle généralement plus réduite, ce qui se traduit par une biomasse de production d'œufs proportionnellement moins élevée (Vladykov, 1966; Verreault *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2014).

Malheureusement, un déclin majeur du taux de recrutement est observé depuis 1980 dans le bassin versant du fleuve du Saint-Laurent (Wirth et Bernatchez, 2003; Tremblay, 2009; Verreault *et al.*, 2012), ce qui est inquiétant pour cette espèce panmictique. De plus, dans le contexte du changement climatique et de ses effets sur les prédispositions au choix d'habitat du stade civelle (transparente à jeune pigmentée), un recrutement forcé vers des zones plus estuariennes ou bien plus au sud pourrait modifier la dynamique de répartition. Cela risquerait d'augmenter la compétition inter-individuelle pour les ressources et pourrait nuire au rythme habituel de croissance des femelles, qui bénéficient généralement de zones d'habitat moins densément peuplées (Côté *et al.*, 2015).

Cependant, les habitats aquatiques plus au sud (de l'hémisphère nord) sont habituellement affectés plus fortement et plus rapidement par les facteurs stressants, ce qui force déjà certaines espèces de poissons à migrer plus loin que leur distribution habituelle

(Lassalle et Rochard, 2009; Nicolas *et al.*, 2011). Alors, malgré la prédisposition individuelle des anguilles pour un type d'habitat, ces facteurs stressants pourraient forcer des cohortes à migrer plus au nord et peut-être même mener à une densité plus élevée dans ces zones.

Que ce soit en étant forcées à migrer plus vers le nord ou plus vers le sud, les options s'effritent rapidement pour les civelles, en raison de leur préférence stratifiée liée au choix d'habitat de croissance selon le sexe. Le faible taux de recrutement déjà observé dans certains plans d'eau douce, attribuable aux modifications anthropiques de l'habitat et/ou à l'évitement induit par l'intensification des facteurs de stress, s'avère ainsi être un précurseur alarmant pour l'ensemble de l'espèce.

3.3.2 Éléments stressants supplémentaires à considérer

Les perturbations anthropiques sont à l'origine du changement climatique et de l'intensification de nombreux facteurs stressants présents dans les habitats aquatiques (Jensen *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 2016). Dans le cadre de cette étude, l'hypoxie était le facteur de stress au premier plan, mais il reste essentiel de considérer la présence et les interactions de divers éléments stressants pouvant altérer ces milieux (Jackson *et al.*, 2016; Defo *et al.*, 2019).

Comme l'hypoxie, l'hypercapnie est un facteur de stress en lien avec les gaz dissous : il représente une trop forte concentration de CO₂ dissous dans l'eau. L'hypercapnie environnementale est souvent retrouvée en tandem avec l'hypoxie environnementale, puisqu'une diminution importante de l'oxygène causée par la respiration aérobie d'organismes aquatiques (p. ex : bactéries, plantes) est associée à une hausse de CO₂ métabolique expulsé dans l'eau (Jensen *et al.*, 1993). L'hypercapnie cause une acidose du sang, ce qui empêche la réponse efficace des mécanismes d'augmentation de l'hyperventilation et de la hausse de l'affinité du sang pour l'oxygène des poissons face à l'hypoxie (Jensen *et al.*, 1993). Chez l'anguille d'Europe (stade d'anguille jaune; masses = ~ 101 g à 121 g; lieu d'acquisition d'anguilles = élevage au Danemark), il a été démontré que l'hypercapnie nuit à la capacité d'ajustements de la réponse à l'hypoxie, en condition aiguë d'hypoxie et d'hypercapnie combinée (Cruz-Neto et Steffensen, 1997). Selon la même étude, une hypercapnie aiguë seule présenterait un défi régulateur plus important que l'hypoxie seule, pour cette espèce. Par ailleurs, une autre étude a exploré la

tolérance de l'hypercapnie chronique chez l'anguille d'Europe (stade de vie non spécifié, présumé jaune; masse moyenne = 100 g à 300 g; lieu d'acquisition = fournisseurs commerciaux, nord de l'Italie) (McKenzie, 2003). Dans ce cas, l'exposition chronique à l'hypercapnie n'a pas empêché les anguilles de réguler les différents marqueurs examinés. Les auteurs suggèrent que cette capacité pourrait résulter d'une pression de sélection favorisant l'adaptation à cet élément stressant spécifique (McKenzie, 2003). Puisque nos expériences exposaient les civelles à des conditions d'hypoxie sans mesurer ni moduler les concentrations de CO₂ dissous, il serait judicieux d'explorer l'effet de l'hypercapnie en contexte hypoxique, afin de mieux simuler des conditions environnementales réalistes.

En plus de ses effets directs sur le métabolisme des poissons, la présence d'hypoxie dans les habitats aquatiques peut accroître leur vulnérabilité aux parasites et aux infections, en altérant leur capacité de réponse immunitaire (Jensen *et al.*, 1993; Gollock *et al.*, 2005; Abdel-Tawwab *et al.*, 2019). À l'inverse, certains parasites peuvent également interférer avec la réponse des poissons à l'hypoxie. Un tel parasite, *Anguillicola crassus*, est un nématode infectant les espèces d'anguilles du genre *Anguilla*. Originaire d'Asie, ce parasite a été introduit dans les eaux européennes en 1982, puis dans les eaux nord-américaines en 1995 (Barse *et al.*, 2001; Aieta et Oliveira, 2009; Campbell, 2014). Chez *Anguilla anguilla* (présumément au stade jaune), *Anguillicola crassus* amplifierait la réponse du stress à l'hypoxie, en stimulant la production de cortisol et en accablant le métabolisme des poissons infectés (Gollock *et al.*, 2005). La combinaison de l'infection par ce parasite, de l'hypoxie et de températures élevées constitue la source suspectée de certains épisodes de mortalité massive d'anguilles en Europe (Gollock *et al.*, 2005). En Amérique du Nord, *A. crassus* ne semblerait pas infecter les civelles d'*Anguilla rostrata*, mais il est retrouvé dès le stade d'anguille jaune (Barse *et al.*, 2001). À ce jour, aucune étude ne semble avoir évalué les effets combinés de l'infection par *A. crassus* et de l'hypoxie chez *Anguilla rostrata*. Étant donné l'ampleur des effets combinés de l'hypoxie et de ce parasite chez *Anguilla anguilla*, il serait judicieux d'examiner cette interaction chez *Anguilla rostrata*, afin de mieux cerner les risques pour cette espèce.

En parallèle, la présence de contaminants dans les milieux aquatiques peut également compromettre la tolérance des anguilles à l'hypoxie. Au niveau branchial, le cadmium simulerait l'effet de l'hypoxie chez les civelles transparentes d'anguilles

d'Amérique, en épaississant la paroi de l'épithélium des branchies et en réduisant ainsi le potentiel d'échanges gazeux (Pierron *et al.*, 2007). De plus, certains métaux lourds sembleraient s'accumuler dans les mitochondries des anguilles jaunes d'Amérique et d'Europe, ce qui pourrait altérer le bon fonctionnement de cet organite (Rosabal *et al.*, 2015) et constituer un facteur limitant en conditions d'hypoxie.

Enfin, il est crucial de considérer l'effet de la température sur la capacité de résilience de l'anguille en conditions hypoxiques, ainsi que son rôle en tant que facteur de stress environnemental à part entière. Dans notre étude, les civelles étaient exposées à une température estivale modérée (16 °C), stable et bien plus faible que certains pics de température pouvant être atteints dans la région, tel que nous l'avons constaté lors des années précédentes (bassin versant de la rivière Petitcodiac, N.-B., Canada; données non publiées). En tant qu'organismes ectothermes, les poissons présentent un métabolisme directement influencé par la température de leur environnement (Jensen *et al.*, 1993). Cette notion est notamment abordée avec le concept de l'OCLTT (*Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance*), selon lequel la température limite les capacités d'approvisionnement de l'oxygène aux tissus chez les animaux aquatiques (Pörtner *et al.*, 2017). Une hausse de température augmente généralement le taux métabolique des poissons, augmentant par la même occasion la demande en oxygène pour alimenter la dépense d'énergie (Jensen *et al.*, 1993). Face à des températures inhabituelles, l'organisme est également plus à risque de subir les effets indésirables des métaux lourds et des parasites (Defo *et al.*, 2019), ainsi que de subir l'effet de déplacements migratoires saisonniers décalés (trop tôt ou trop tard) chez certaines espèces (Sims *et al.*, 2004; Yu-San Han, 2011; Otero *et al.*, 2014). La température exerce également une influence directe sur la quantité d'oxygène maximale pouvant être dissoute dans l'eau : en chauffant, l'eau perd graduellement son potentiel de concentration maximale d'oxygène dissous (Jane *et al.*, 2021). Alors, seule ou en présence de d'autres facteurs stressants, la température peut rendre plus probable et accentuer les épisodes d'hypoxie en eaux douces, estuariennes et salées.

3.4 Conclusion : les poissons, ça vit dehors

Étant donné leur demande métabolique élevée attribuable à leur petite taille, en plus de leur capacité limitée pour le maintien de la production anaérobie d'ATP, la survie des jeunes anguilles d'Amérique pourrait ultimement dépendre de leur capacité

d'endurance face aux éléments stressants lorsque la fuite n'est pas une option. Nos observations suggèrent que les jeunes civelles pigmentées d'anguilles d'Amérique maintiennent un taux métabolique relativement stable tout en défendant leur statut énergétique, notamment à travers une hausse du métabolisme anaérobie, lors d'épisodes d'hypoxie aiguë en eau douce. Toutefois, une exposition prolongée ou une hypoxie plus sévère pourrait représenter un facteur limitant. En revanche, compte tenu des limites de cette étude et de la diversité des habitats occupés par les sous-populations de l'espèce, des recherches complémentaires seront nécessaires afin de confirmer (ou non) les tendances observées et d'en tirer des conclusions globales robustes. Malgré tout, l'acquisition de ces données constitue une avancée significative dans la compréhension de la réponse des jeunes civelles pigmentées d'anguilles d'Amérique à l'hypoxie en eau douce.

Idéalement, il incomberait de continuer les recherches sur les civelles pigmentées directement dans leur habitat naturel, afin d'obtenir une meilleure évaluation de la menace réelle posée par l'hypoxie environnementale. Étudier la réponse physiologique et comportementale de civelles pigmentées lors des différentes saisons où on peut les retrouver en nature et en présence de combinaisons de facteurs stressants serait également nécessaire. Ajouter un paramètre de variation de l'exposition à l'hypoxie par rapport à l'âge serait aussi pertinent, puisque selon l'intensité et l'ampleur de l'exposition à l'hypoxie, les anguilles seraient peut-être en mesure de développer une meilleure résilience, ou en revanche, deviendraient peut-être plus portées à retourner en eau salée (et y rester), afin de minimiser leur utilisation d'énergie. Ultiment, l'intégration de multiples paramètres stressants serait essentielle afin d'obtenir une compréhension plus exhaustive de la dynamique entre les forces en action dans un contexte naturel.

Lorsque l'on considère l'état de conservation précaire de cette espèce indicatrice, combiné aux impacts prévus du changement climatique et aux modifications anthropiques des habitats naturels, une faible réactivité physiologique à l'hypoxie pourrait éventuellement s'avérer mortelle dans des conditions naturelles. Puisque l'avenir d'*Anguilla rostrata* n'est pas facile à appréhender, j'espère que cette étude s'avérera utile en contribuant à la fondation d'une base de connaissances sur son sujet, ainsi qu'en alimentant les futures questions de recherches visant à appuyer les efforts de conservation de cette espèce à tous ses stades de vie.

RÉFÉRENCES

- Abdel-Tawwab M, Monier MN, Hoseinifar SH, Faggio C (2019) Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiol Biochem* 45: 997–1013.
- Aieta AE, Oliveira K (2009) Distribution, prevalence, and intensity of the swim bladder parasite *Anguillicola crassus* in New England and eastern Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 229–235.
- Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Andersen A, Elie P, Metayer C (1987) The Eel (*Anguilla anguilla* L.) as a Bioindicator of Metal Pollution: Factors Limiting Its Use. *Water Science and Technology* 19: 1229–1232.
- Atkinson DE (1968) Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030–4034.
- Atkinson DE (1977) Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. Academic Press, Inc., New York and London.
- Barse AM, McGuire SA, Vinos MA, Eierman LE, Weeder JA (2001) The Swimbladder Nematode *Anguillicola Crassus* in American Eels (*Anguilla rostrata*) from Middle and Upper Regions of Chesapeake Bay. *Journal of Parasitology* 87: 1366–1370.
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids¹. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517–525.
- Behrens JW, Steffensen JF (2007) The effect of hypoxia on behavioural and physiological aspects of lesser sandeel, *Ammodytes tobianus* (Linnaeus, 1785). *Marine Biology* 150: 1365–1377.
- Blewett TA, Binning SA, Weinrauch AM, Ivy CM, Rossi GS, Borowiec BG, Lau GY, Overduin SL, Aragao I, Norin T (2022) Physiological and behavioural strategies of aquatic animals living in fluctuating environments. *Journal of Experimental Biology* 225: jeb242503.
- Bolliet V, Claveau J, Jarry M, Gonzalez P, Baudrimont M, Monperrus M (2017) Migratory behavior, metabolism, oxidative stress and mercury concentrations in marine and estuarine European glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiology & Behavior* 169: 33–40.
- Both C, Marvelde L te (2007) Climate change and timing of avian breeding and migration throughout Europe. *Climate Research* 35: 93–105.
- Brett JR, Groves TDD (1979) 6 - Physiological Energetics. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR, eds. *Fish Physiology*. Academic Press, pp 279–352.
- Brown CJ, O'Connor MI, Poloczanska ES, Schoeman DS, Buckley LB, Burrows MT, Duarte CM, Halpern BS, Pandolfi JM, Parmesan C, et al. (2016) Ecological and methodological drivers of species' distribution and phenology responses to climate change. *Global Change Biology* 22: 1548–1560.

- Campbell DM (2014) Geographic Distribution and Aspects of the Parasite/Host Relationships of the Invasive Swim Bladder Parasite *Anguillicoloides Crassus* Infecting American Eel (*Anguilla rostrata*) in Mainland Nova Scotia and New Brunswick. Saint Mary's University, Halifax, NS.
- Carter CG, Houlihan DF, Brechin J, McCarthy ID (1993) The relationships between protein intake and protein accretion, synthesis, and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Can J Zool* 71: 392–400.
- Cassidy AA, Driedzic WR, Campos D, Heinrichs-Caldas W, Almeida-Val VMF, Val AL, Lamarre SG (2018) Protein synthesis is lowered by 4EBP1 and eIF2- α signaling while protein degradation may be maintained in fasting, hypoxic Amazonian cichlids *Astronotus ocellatus*. *Journal of Experimental Biology* 221 (2): jeb167601.
- Cassidy AA, Lamarre SG (2019) Activation of oxygen-responsive pathways are associated with altered protein metabolism in Arctic char exposed to hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 222 (22): jeb203901.
- Chabot D, Steffensen JF, Farrell AP (2016) The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology* 88: 81–121.
- Chan DKO (1986) Cardiovascular, respiratory, and blood adjustments to hypoxia in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 2: 179–193.
- Chapman AG, Miller AL, Atkinson DE (1976) Role of the adenylate deaminase reaction in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* 36: 1144–1150.
- Chapman LJ, McKenzie DJ (2009) Chapter 2 Behavioral Responses and Ecological Consequences. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, eds. *Fish Physiology*. Academic Press, pp 25–77.
- COSEWIC (2012) COSEWIC Assessment and Status Report on the American Eel *Anguilla rostrata* in Canada. *Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada*, Ottawa, p xii + 109.
- Côté CL, Castonguay M, Kalujnaia MS, Cramb G, Bernatchez L (2014) In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: a view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *BMC Genomics* 15: 403.
- Côté CL, Pavey SA, Stacey JA, Pratt TC, Castonguay M, Audet C, Bernatchez L (2015) Growth, Female Size, and Sex Ratio Variability in American Eel of Different Origins in Both Controlled Conditions and the Wild: Implications for Stocking Programs. *Transactions of the American Fisheries Society* 144: 246–257.
- Crain CM, Kroeker K, Halpern BS (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* 11: 1304–1315.
- Cruz-Neto AP, Steffensen JF (1997) The effects of acute hypoxia and hypercapnia on oxygen consumption of the freshwater European eel. *Journal of Fish Biology* 50: 759–769.

- Daverat F, Limburg K, Thibault I, Shiao J, Dodson J, Caron F, Tzeng W, Iizuka Y, Wickström H (2006) Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species, *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Mar Ecol Prog Ser* 308: 231–241.
- de Boer J, Dao QT, van Leeuwen SPJ, Kotterman MJJ, Schobben JHM (2010) Thirty year monitoring of PCBs, organochlorine pesticides and tetrabromodiphenylether in eel from The Netherlands. *Environmental Pollution* 158: 1228–1236.
- Defo MA, Gendron AD, Head J, Pilote M, Turcotte P, Marcogliese DJ, Houde M (2019) Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 217: 105347.
- Díaz GU, Audet C, Normandeau E, Venney CJ, Wellband K, Turgeon J, Bernatchez L (2025) DNA methylation patterns linked to salinity and geography in the American eel (*Anguilla rostrata*). *Environ Epigenet* dvaf012.
- Diaz RJ, Breitburg DL (2009) Chapter 1 - The Hypoxic Environment. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, eds. *Hypoxia*. Academic Press, pp 1–23.
- Domenici P, Steffensen JF, Batty RS (2000) The effect of progressive hypoxia on swimming activity and schooling in Atlantic herring. *J Fish Biol* 57: 1526–1538.
- Drouineau H, Durif C, Castonguay M, Mateo M, Rochard E, Verreault G, Yokouchi K, Lambert P (2018) Freshwater eels: A symbol of the effects of global change. *Fish & Fisheries* 19: 903–930.
- Ducros L, Lavoie-Rochon AS, Pichaud N, Lamarre SG (2024) Metabolic rate and mitochondrial physiology adjustments in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) during cyclic hypoxia. *Journal of Experimental Biology* jeb.247834.
- Durif CMF, Arts M, Bertolini F, Cresci A, Daverat F, Karlsbakk E, Koprivnikar J, Moland E, Olsen EM, Parzanini C, et al. (2023) The evolving story of catadromy in the European eel (*Anguilla anguilla*). *ICES Journal of Marine Science* 80: 2253–2265.
- Edeline E, Bardonnat A, Bolliet V, Dufour S, Elie P (2005a) Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Hormones and Behavior* 48: 53–63.
- Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P (2004) Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Mar Ecol Prog Ser* 282: 261–270.
- Edeline E, Dufour S, Elie P (2005b) Role of glass eel salinity preference in the control of habitat selection and growth plasticity in *Anguilla anguilla*. *Mar Ecol Prog Ser* 304: 191–199.
- Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P (2006) Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331: 217–225.

- Environnement Canada (2015) Registre public des espèces en péril — L'anguille d'Amérique Consultations sur l'inscription en vertu de la Loi sur les espèces en péril. <https://sararegistry.gc.ca/default.asp?lang=Fr&n=104010E0-1&peditable=true> (last accessed 23 November 2015).
- Environnement et Changement climatique (2024) Anguille d'Amérique : Vérification des consultations sur l'inscription en vertu de la Loi sur les espèces en péril. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-public-especes-peril/documents-consultation/anguille-amerique-2024.html> (last accessed 14 May 2025).
- Everse J, Kaplan NO (1973) Lactate Dehydrogenases: Structure and Function. In: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 61–133.
- Farrell AP, Richards JG (2009) Defining hypoxia: an integrative synthesis of the responses of fish to hypoxia. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, eds. *Hypoxia*. Academic Press, pp 487–503.
- Forster ME (1981) Oxygen consumption and apnoea in the shortfin eel, *Anguilla australis schmidti*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 15: 85–90.
- Gaillard M, Bernatchez L, Tremblay R, Audet C (2015) Regional variation in energy storage strategies in American glass eels from Eastern Canada. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 188: 87–95.
- Gaillard M, Pavey SA, Côté CL, Tremblay R, Bernatchez L, Audet C (2016) Regional variation of gene regulation associated with storage lipid metabolism in American glass eels (*Anguilla rostrata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 196: 30–37.
- Garlick PJ, McNurlan MA, Preedy VR (1980) A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine. *Biochem J* 192: 719–723.
- Giesy JP (1988) Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Relationship with condition factor and blood cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 90: 367–377.
- Ginneken V van, Thillart G van den, Addink A, Erkelens C (1995) Fish muscle energy metabolism measured during hypoxia and recovery: an in vivo ³¹P-NMR study. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 268 (5): R1178–R1187.
- Gollock MJ, Kennedy CR, Brown JA (2005) European eels, *Anguilla anguilla* (L.), infected with *Anguillicola crassus* exhibit a more pronounced stress response to severe hypoxia than uninfected eels. *Journal of Fish Diseases* 28: 429–436.

- Gouvernement du Canada (2025) Anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) - Recherche d'espèces - Registre public des espèces en péril. *Registre des espèces Canada*. <https://registre-especes.canada.ca/index-fr.html#/especes?sortBy=commonNameSort&sortDirection=asc&pageSize=10&keywords=anguille> (last accessed 14 May 2025).
- Guppy M, Withers P (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews* 74: 1–40.
- Hardie DG (2018) Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *Journal of the Royal Society Interface* 15: 20170774.
- Harper C, Wolf JC (2009) Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR J* 50: 387–396.
- Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* 54: 1015–1069.
- Herbert NA, Skjæraasen JE, Nilsen T, Salvanes AGV, Steffensen JF (2011) The hypoxia avoidance behaviour of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) depends on the provision and pressure level of an O₂ refuge. *Mar Biol* 158: 737–746.
- Herbert NA, Steffensen JF (2006) Hypoxia increases the behavioural activity of schooling herring: a response to physiological stress or respiratory distress? *Mar Biol* 149: 1217–1225.
- Houlihan DF, Hall SJ, Gray C, Noble BS (1988) Growth Rates and Protein Turnover in Atlantic Cod, *Gadus morhua*. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 951–964.
- Houlihan DF, Pannevis M, Heba H (1993) Protein Synthesis in Juvenile Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J World Aquac Soc* 24: 145–151.
- Houlihan DF, Wieser W, Foster A, Brechin J (1992) In vivo protein synthesis rates in larval nase (*Chondrostoma nasus* L.). *Canadian Journal of Zoology*. doi:10.1139/z92-327
- ICES (2011) Report of the 2011 Session of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels. *European Inland Fisheries and Aquaculture Advisory Commission*, Lisbon, Portugal.
- IPCC (2001) Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Itakura H, Wakiya R, Gollock M, Kaifu K (2020) Anguillid eels as a surrogate species for conservation of freshwater biodiversity in Japan. *Scientific Reports* 10: 1–12.
- Iversen NK, McKenzie DJ, Malte H, Wang T (2010) Reflex bradycardia does not influence oxygen consumption during hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Comp Physiol B* 180: 495–502.
- Jackson MC, Loewen CJG, Vinebrooke RD, Chimimba CT (2016) Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global Change Biology* 22: 180–189.

- Jacoby DMP, Casselman JM, Crook V, DeLucia M-B, Ahn H, Kaifu K, Kurwie T, Sasal P, Silfvergrip AMC, Smith KG, et al. (2015) Synergistic patterns of threat and the challenges facing global anguillid eel conservation. *Global Ecology and Conservation* 4: 321–333.
- Jane SF, Hansen GJA, Kraemer BM, Leavitt PR, Mincer JL, North RL, Pilla RM, Stetler JT, Williamson CE, Woolway RI, et al. (2021) Widespread deoxygenation of temperate lakes. *Nature* 594: 66–70.
- Jenny J-P, Francus P, Normandeau A, Lapointe F, Perga M-E, Ojala A, Schimmelmann A, Zolitschka B (2016) Global spread of hypoxia in freshwater ecosystems during the last three centuries is caused by rising local human pressure. *Glob Chang Biol* 22: 1481–1489.
- Jensen FB, Nikinmaa M, Weber RE (1993) Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: Rankin JC, Jensen FB, eds. *Fish Ecophysiology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 161–179.
- Jessop B (2010) Geographic effects on American eel (*Anguilla rostrata*) life history characteristics and strategies. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 67: 326–346.
- Jessop B, Shiao J, Iizuka Y, Tzeng W (2002) Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Mar Ecol Prog Ser* 233: 217–229.
- Jessop B, Shiao J-C, Iizuka Y, Tzeng W-N (2004) Variation in the annual growth, by sex and migration history, of silver American eels *Anguilla rostrata*. *Mar Ecol Prog Ser* 272: 231–244.
- Jones DR, Schwarzfeld T (1974) The oxygen cost to the metabolism and efficiency of breathing in trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration Physiology* 21: 241–254.
- Joyce W, Simonsen M, Gesser H, Wang T (2016) The effects of hypoxic bradycardia and extracellular HCO₃⁻/CO₂ on hypoxic performance in the eel heart. *Journal of Experimental Biology* 219: 302–305.
- Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J (2016). AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* 48, e224.
- Kingsolver JG, Higgins JK, Augustine KE (2015) Fluctuating temperatures and ectotherm growth: distinguishing non-linear and time-dependent effects. *Journal of Experimental Biology* 218: 2218–2225.
- Knowles JR (1980) Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions. *Annual Review of Biochemistry* 49: 877–919.
- Kohlmeier M (2003) Creatine. In: Kohlmeier M, ed. *Nutrient Metabolism*. Academic Press, London, pp 427–432.

- Lamarre SG, Saulnier RJ, Blier PU, Driedzic WR (2015) A rapid and convenient method for measuring the fractional rate of protein synthesis in ectothermic animal tissues using a stable isotope tracer. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 182: 1–5.
- Lamson HM, Jen-Chieh Shiao, Iizuka Y, Wann-Nian Tzeng, Cairns DK (2006) Movement patterns of American eels (*Anguilla rostrata*) between salt- and freshwater in a coastal watershed, based on otolith microchemistry. *Marine Biology* 149: 1567–1576.
- Landman MJ, Heuvel MRVD, Ling N (2005) Relative sensitivities of common freshwater fish and invertebrates to acute hypoxia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 39: 1061–1067.
- Lanning NJ, Looyenga BD, Kauffman AL, Niemi NM, Sudderth J, DeBerardinis RJ, MacKeigan JP (2014) A mitochondrial RNAi screen defines cellular bioenergetic determinants and identifies an adenylate kinase as a key regulator of ATP levels. *Cell Rep* 7: 907–917.
- Lassalle G, Rochard E (2009) Impact of twenty-first century climate change on diadromous fish spread over Europe, North Africa and the Middle East. *Global Change Biology* 15: 1072–1089.
- Lighton JRB, Halsey LG (2011) Flow-through respirometry applied to chamber systems: Pros and cons, hints and tips. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 158: 265–275.
- Liu H, Labonne J, Coste P, Huchet E, Plagnes-Juan E, Rives J, Veron V, Seiliez I, Bolliet V (2019) Looking at the complex relationships between migration behavior and conditional strategy based on energy metabolism in the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Science of The Total Environment* 696: 134039.
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R100–R107.
- Lyndon AR, Houlihan DF, Hall SJ (1992) The effect of short-term fasting and a single meal on protein synthesis and oxygen consumption in cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol B* 162: 209–215.
- Mandic M, Pan YK, Gilmour KM, Perry SF (2020) Relationships between the peak hypoxic ventilatory response and critical O₂ tension in larval and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology* 223: jeb213942.
- Marcinek DJ, Kushmerick MJ, Conley KE (2010) Lactic acidosis in vivo: testing the link between lactate generation and H⁺ accumulation in ischemic mouse muscle. *Journal of Applied Physiology* 108: 1479–1486.
- Marohn L, Jakob E, Hanel R (2013) Implications of facultative catadromy in *Anguilla anguilla*. Does individual migratory behaviour influence eel spawner quality? *Journal of Sea Research* 77: 100–106.

- McKenzie DJ, Taylor EW, Dalla Valle AZ, Steffensen JF (2002) Tolerance of acute hypercapnic acidosis by the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Comp Physiol B* 172: 339–346.
- McKenzie DJ (2003) Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Biology* 206: 1717–1726.
- Morash AJ, Neufeld C, MacCormack TJ, Currie S (2018) The importance of incorporating natural thermal variation when evaluating physiological performance in wild species. *Journal of Experimental Biology* 221: jeb164673.
- Morozov S, McCairns RJS, Merilä J (2019) FishResp: R package and GUI application for analysis of aquatic respirometry data. *Conservation Physiology* 7: 1–13.
- Negrete B, Ackerly KL, Esbaugh AJ (2024) Hypoxia-acclimation adjusts skeletal muscle anaerobic metabolism and burst swim performance in a marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 297: 111734.
- Nelson JA (2016) Oxygen consumption rate v. rate of energy utilization of fishes: a comparison and brief history of the two measurements. *Journal of Fish Biology* 88: 10–25.
- Nicolas D, Chaalali A, Drouineau H, Lobry J, Uriarte A, Borja A, Boët P (2011) Impact of global warming on European tidal estuaries: some evidence of northward migration of estuarine fish species. *Reg Environ Change* 11: 639–649.
- Nikolic N, Liu S, Jacobsen MW, Jónsson B, Bernatchez L, Gagnaire P-A, Hansen MM (2020) Speciation history of European (*Anguilla anguilla*) and American eel (*A. rostrata*), analysed using genomic data. *Molecular Ecology* 29: 565–577.
- Nilsson GE, Östlund-Nilsson S (2008) Does size matter for hypoxia tolerance in fish? *Biological Reviews* 83: 173–189.
- Nilsson GE, Renshaw GMC (2004) Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology* 207: 3131–3139.
- Otero J, L'Abée-Lund JH, Castro-Santos T, Leonardsson K, Størvik GO, Jonsson B, Dempson B, Russell IC, Jensen AJ, Baglinière J-L, et al. (2014) Basin-scale phenology and effects of climate variability on global timing of initial seaward migration of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Global Change Biology* 20: 61–75.
- Owen SF (2001) Meeting energy budgets by modulation of behaviour and physiology in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 128: 629–642.
- Pêches et Océans Canada (2024) Mise à jour sur l'état des pêches de l'anguille d'Amérique et de la civelle dans la région des maritimes et avis scientifique sur les indices régionaux disponibles. *Secr can des avis sci du MPO*.

- Pierron F, Baudrimont M, Gonzalez P, Bourdineaud J-P, Elie P, Massabuau J-C (2007) Common Pattern of Gene Expression in Response to Hypoxia or Cadmium in the Gills of the European Glass Eel (*Anguilla anguilla*). *Environ Sci Technol* 41: 3005–3011.
- Pörtner H-O, Bock C, Mark FC (2017) Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J Exp Biol* 220: 2685–2696.
- Rabalais N, Diaz R, Levin L, Turner R, D G, Zhang J (2010) Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences* 7: 585–619.
- Rabalais NN (2009) Hypoxia. In: Encyclopedia of Ocean Sciences. Elsevier, pp 172–180.
- Redmann E, Sheikh A, Alqahtani A, McCarty-Glenn M, Syed S, Mehta RS, Ward AB (2020) Terrestrial Locomotion in American Eels (*Anguilla rostrata*): How Substrate and Incline Affect Movement Patterns. *Integrative and Comparative Biology* 60: 180–189.
- Reeve C, Rowsey LE, Speers-Roesch B (2022) Inactivity and the passive slowing effect of cold on resting metabolism as the primary drivers of energy savings in overwintering fishes. *Journal of Experimental Biology* 225: jeb243407.
- Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, eds. (2009) Hypoxia. Academic Press, London, UK.
- Roesner A, Mitz SA, Hankeln T, Burmester T (2008) Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*. *The FEBS Journal* 275: 3633–3643.
- Rosabal M, Pierron F, Couture P, Baudrimont M, Hare L, Campbell PGC (2015) Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, and Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquatic Toxicology* 160: 128–141.
- Rosewarne PJ, Wilson JM, Svendsen JC (2016) Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: a student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers: teaching aerobic metabolic scope and hypoxia. *Journal of Fish Biology* 88: 265–283.
- Rummer JL, Binning SA, Roche DG, Johansen JL (2016) Methods matter: considering locomotory mode and respirometry technique when estimating metabolic rates of fishes. *Conserv Physiol* 4. doi:10.1093/conphys/cow008
- Schreck CB, Tort L (2016) 1 - The Concept of Stress in Fish. In: Schreck CB, Tort L, Farrell AP, Brauner CJ, eds. *Fish Physiology*. Academic Press, pp 1–34.
- Selye H (1976) Stress in Health and Disease. Butterworth-Heinemann.
- Shiraishi H, Crook V (2015) Eel Market Dynamics: An Analysis of *Anguilla* Production, Trade and Consumption in East Asia. *TRAFFIC*, Japon.
- Shoubridge EA, Hochachka PW (1980) Ethanol: Novel End Product of Vertebrate Anaerobic Metabolism. *Science* 209: 308–309.
- Sims DW, Wearmouth VJ, Genner MJ, Southward AJ, Hawkins SJ (2004) Low-temperature-driven early spawning migration of a temperate marine fish. *Journal of Animal Ecology* 73: 333–341.

- Smith DG, Duiker W, Cooke IRC (1983) Sustained branchial apnea in the Australian short-finned eel, *Anguilla australis*. *J Exp Zool* 226: 37–43.
- Smith RW, Houlihan DF, Nilsson GE, Brechin JG (1996) Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in crucian carp. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 271: R897–R904.
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797: 1171–1177.
- Speers-Roesch B, Mandic M, Groom DJE, Richards JG (2013) Critical oxygen tensions as predictors of hypoxia tolerance and tissue metabolic responses during hypoxia exposure in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 449: 239–249.
- Speers-Roesch B, Norin T, Driedzic WR (2018) The benefit of being still: energy savings during winter dormancy in fish come from inactivity and the cold, not from metabolic rate depression. *Proc Biol Sci* 285: 20181593.
- Teichert N, Carassou L, Sahraoui Y, Lobry J, Lepage M (2018) Influence of intertidal seascape on the functional structure of fish assemblages: Implications for habitat conservation in estuarine ecosystems. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28: 798–809.
- Tesch FW (1977) *The Eel - Biology and Management of Anguillid Eels*. Chapman and Hall, London, UK.
- Thomas Y, Flye-Sainte-Marie J, Chabot D, Aguirre-Velarde A, Marques GM, Pecquerie L (2019) Effects of hypoxia on metabolic functions in marine organisms: Observed patterns and modelling assumptions within the context of Dynamic Energy Budget (DEB) theory. *Journal of Sea Research* 143: 231–242.
- Treberg JR, Killen SS, MacCormack TJ, Lamarre SG, Enders EC (2016) Estimates of metabolic rate and major constituents of metabolic demand in fishes under field conditions: Methods, proxies, and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 202: 10–22.
- Tremblay V (2009) Reproductive Strategy of Female American Eels Among Five Subpopulations in the St. Lawrence River Watershed. *American Fisheries Society Symposium* 58: 85–102.
- Tsukamoto K, Arai T (2001) Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Mar Ecol-Progr Ser* 220: 265–276.
- Tzeng W-N (2016) Fisheries, Stocks Decline and Conservation of Anguillid Eel. In: Arai T, ed. *Biology and Ecology of Anguillid Eels*, First Edition. *CRC Press*, Florida, pp 291–324.
- van den Thillart G, Kesbeke F, van Waarde A (1980) Anaerobic energy-metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J Comp Physiol B* 136: 45–52.
- van Waarde A, van den Thillart G, Kesbeke F (1983) Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Comp Physiol B* 149: 469–475.

- Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN (2010) Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol* 4: 58.
- Verreault G, Dargere W, Tardif R (2009) American eel movements, growth, and sex ratio following translocation. *Eels at the edges: Science, status and conservation concerns American Fisheries Society, Symposium* 58: 129–136.
- Verreault G, Mingelbier M, Dumont P (2012) Spawning migration of American eel *Anguilla rostrata* from pristine (1843–1872) to contemporary (1963–1990) periods in the St Lawrence Estuary, Canada. *Journal of Fish Biology* 81: 387–407.
- Vetter RD, Hodson RE (1982) Use of Adenylate Concentrations and Adenylate Energy Charge as Indicators of Hypoxic Stress in Estuarine Fish. *Can J Fish Aquat Sci* 39: 535–541.
- Vladykov VD (1966) Remarks on the American eel (*Anguilla rostrata* LeSueur). Sizes of elvers entering streams; the relative abundance of adult males and females; and present economic importance of eels in North America. *SIL Proceedings, 1922-2010* 16: 1007–1017.
- Voutilainen A, Seppänen E, Huuskonen H (2011) A methodological approach to measuring the oxygen consumption profile of six freshwater fish species: Implications for determination of the standard metabolic rate. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 44: 239–250.
- Williams KJ, Cassidy AA, Verhille CE, Lamarre SG, MacCormack TJ (2019) Diel cycling hypoxia enhances hypoxia tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of physiological and metabolic plasticity. *J Exp Biol* 222: jeb206045.
- Wirth T, Bernatchez L (2003) Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy? *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270: 681–688.
- Wood SC, Johansen K (1972) Adaptation to Hypoxia by Increased HbO₂ Affinity and Decreased Red Cell ATP Concentration. *Nature New Biology* 237: 278–279.
- Wuenschel MJ, Able KW (2008) Swimming ability of eels (*Anguilla rostrata*, *Conger oceanicus*) at estuarine ingress: contrasting patterns of cross-shelf transport? *Marine Biology* 154: 775–786.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* 80: 1107–1213.
- Yu-San Han (2011) Temperature-dependent recruitment delay of the Japanese glass eel *Anguilla japonica* in East Asia. *Marine Biology* 158: 2349–2358.

