

Université de Montréal

**L'effet temporel de l'infection parasitaire sur le métabolisme et la tolérance hypoxique  
du crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*)**

*Par*

Rémi Chauvette

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences  
biologiques

Décembre 2023

©Rémi Chauvette 2023

Université de Montréal

Département de sciences biologiques, Faculté des arts et des sciences, Université de Montréal

*Ce mémoire intitulé*

**L'effet temporel de l'infection parasitaire sur le métabolisme et la tolérance hypoxique  
du crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*)**

*Présenté par*

**Rémi Chauvette**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Sophie Breton**

Présidente-rapporteur

**Matthew Regan**

Directeur de recherche

**Sandra A. Binning**

Codirectrice

**Emmanuelle Chrétien**

Membre du jury

## Résumé

Le réchauffement climatique cause plusieurs modifications abiotiques et biotiques dans les milieux naturels. La hausse de la température de l'eau cause une diminution de l'oxygène dissous dans les lacs et augmente la quantité de zone hypoxique observée. Une autre conséquence de la hausse de la température est l'augmentation du métabolisme et de la consommation d'oxygène des espèces ectothermes dont les poissons et les parasites. Le parasitisme est omniprésent dans les réseaux trophiques et a un effet néfaste sur l'hôte affecté. Les parasites et l'hypoxie peuvent limiter la portée aérobie (AS) des poissons pour la réalisation d'activités journalières. Ainsi, cette étude analyse l'effet dans le temps d'une infection de trématodes causant la maladie du point sur le métabolisme et sur la tolérance hypoxique de l'hôte puisque le développement de ces parasites suggère un effet sur le poisson qui varie selon le temps de résidence des parasites. Nous avons utilisé des crapets-soleil (*Lepomis gibbosus*) infectés par ces trématodes comme système modèle. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection parasitaire réduirait la portée aérobie et la tolérance à l'hypoxie des poissons en fonction du temps du développement de l'infection. Afin d'étudier cette relation hôte-parasite, des tests de respirométrie et d'hypoxie critique ont été performés à cinq moments lors des deux premiers mois suivant l'infection. Les traits métaboliques aérobie (taux métabolique standard et maximal, AS), des indices de la tolérance hypoxique et du métabolisme anaérobiques (tension critique d'oxygène, pression partielle d'oxygène entraînant la perte d'équilibre, la concentration de lactate) et le taux d'hématocrite sont les variables analysées à l'aide de la respirométrie et de prélèvements sanguins. Nous démontrons ici que l'infection expérimental de ces trématodes n'affecte ni la portée aérobie ni la tolérance hypoxique et ce indépendamment du temps de développement du parasite. Un faible effet temporel, mais significatif, est observé entre les premiers jours d'expérimentations et les derniers, des différences principalement dues aux faibles différences non significatives des taux métaboliques standards et maximaux. Le stress induit par captivité et l'effet des changements saisonniers sur les taux métaboliques sont possiblement en cause. Pour l'instant, selon les conditions environnementales actuelles, le crapet-soleil démontre une résilience à l'infection parasitaire ainsi qu'à l'hypoxie.

**Mots clés:** hôte-parasite, taux métabolique, hypoxie,  $P_{crit}$ , taux métabolique standard, poisson d'eau douce, *Uvulifer sp.*, *Apophallus sp.*, maladie du point noir

## Abstract

Global warming is causing several abiotic and biotic changes in natural environments. The rise in water temperature causes a reduction in dissolved oxygen in lakes and increases the amount of hypoxic zone observed. Another consequence of rising temperatures is the increased metabolism and oxygen consumption of ectothermic species, including fish and parasites. Parasitism is ubiquitous in food webs and has a detrimental effect on the affected host. Parasites and hypoxia can limit the aerobic range (AS) of fish for daily activities. Thus, this study analyzes the effect over time of a trematode infection causing the blackspot disease on the metabolism and hypoxic tolerance of the host since the development of these parasites suggests an effect on the fish that varies according to the residence time of the parasites. We used sunfish (*Lepomis gibbosus*) infected with these trematodes as a model system. We hypothesized that parasite infection would reduce the aerobic range and hypoxia tolerance of fish as a function of the time of infection development. Respirometry and critical hypoxia tests were performed at five time points during the first two months post-infection to investigate this host-parasite relationship and its impact over time. Aerobic metabolic traits (standard and maximum metabolic rate, aerobic range), indices of hypoxic tolerance and anaerobic metabolism (critical oxygen tension, partial pressure of oxygen leading to loss of equilibrium, lactate concentration) and hematocrit levels were analyzed using respirometry and blood sampling. We demonstrate here that experimental infection with trematodes affects neither aerobic range nor hypoxic tolerance independently of parasite development time. A small but significant temporal effect is observed between the first and last days of experimentation, differences mainly due to small non-significant differences in standard and maximum metabolic rates. This may be due to stress induced by captivity and seasonal changes affecting metabolic rates. For now, considering actual environmental conditions, sunfish show high resiliency to parasitic infection and to hypoxia.

**Keywords:** Host-parasite, metabolic rate, hypoxia,  $P_{crit}$ , standard metabolic rate, freshwater fish, *Uvulifer sp.*, *Apophallus sp.*, blackspot disease

## Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
Remerciements.....	11
Chapitre 1 – Introduction générale .....	12
Les conséquences indirectes des changements climatiques sur les organismes aquatiques .....	13
L’importance de l’oxygène .....	15
La pression critique.....	17
L’impact possible de la combinaison de l’augmentation de zones hypoxiques et de l’augmentation du taux d’infections parasitaires .....	20
Infection expérimentale .....	21
Expérience approfondie et réexplorée .....	21
Objectifs et hypothèses .....	23
Espèce hôte modèle.....	24
Espèce parasite modèle.....	25
Chapitre 2 – Le développement d’infections parasitaires n’affecte pas la portée aérobie et la tolérance hypoxique du crapet-soleil ( <i>Lepomis gibbosus</i> ).....	27
Contribution des co-auteurs : .....	27
Résumé.....	28

Abstract.....	29
Introduction.....	30
Parasite.....	33
Methods.....	33
Fish collection and housing .....	34
Snail collection and experimental infection.....	35
Respirometry and hypoxia tolerance experiments.....	36
Blood sampling and blood analysis .....	38
Metabolic rate and $P_{crit}$ calculations .....	38
Fish dissections .....	39
Data analyses and statistics.....	39
Results.....	41
Metabolic rate and aerobic scope.....	41
Hypoxia tolerance metrics and underlying characteristics .....	43
Discussion.....	46
Metabolic rate and aerobic scope.....	46
Hypoxia tolerance characteristics .....	49
Experimental infection methodology.....	51
Implications/Significance .....	52
Acknowledgements.....	53
Chapitre 3 – Conclusion Générale .....	54
Implication biologique .....	59

Perspectives d'études .....	59
Références.....	62
Annexe .....	83

## Liste des tableaux

Table 2.1 Statistic tests obtained from two-way Anovas for the effect of the treatment group and the day of experiment on SMR, MMR, absolute AS, factorial AS, Pcrit, LOE, lactate and hematocrit and in sunfish from Lake Cromwell ( $N_{\text{treatment}}=43$ ),  $N_{\text{day of experiment}}=9$ .....42

Tableau A.1 Moyenne de la masse des individus infectés et non infectés en fonction du jour d'expérimentation ..... 83

Tableau A.2 Liste exhaustive des résultats des ANOVAs sur toutes les variables étudiées ..... 83



## Liste des figures

Figure 1.1 La consommation d'oxygène d'un poisson en réponse à une situation hypoxique. (adapté de Mandic et Regan 2018).....	18
Figure 1.2 L'impact du parasitisme par <i>Uvulifer ambloplitis</i> sur la consommation d'oxygène du crapet arlequin ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) n=5 en fonction du temps (adapté de Lemly et Esch, 1984) .....	23
Figure 1.3. Illustration du cycle de vie des parasites trématodes <i>Uvulifer sp.</i> et <i>Apophallus sp.</i> .	26
Figure 2.1. Visual representation of the timeline of the capture of the fish and every manipulation made on them during the experimentation.....	36
Figure 2.2. Measurements of standard metabolic rate (A), maximal metabolic rate (B), and calculated absolute (C) and factorial (D) aerobic scopes for pumpkinseed sunfish ( <i>Lepomis gibbosus</i> ) as a function of days post-experimental infection with ( <i>Apophallus sp.</i> and <i>Uvulifer sp.</i> ) (blue bars) or uninfected (grey bars). Bars span from the 25 <sup>th</sup> to the 75 <sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values.....	43
Figure 2.3. Measurements of Pcrit (A) and LOE (loss of equilibrium) for pumpkinseed sunfish ( <i>Lepomis gibbosus</i> ) as a function of days post-experimental infection with ( <i>Apophallus sp.</i> and <i>Uvulifer sp.</i> ) (blue bars) or uninfected treatment (grey bars). Bars span from the 25 <sup>th</sup> to the 75 <sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values.. ..	44
Figure 2.4. Measurements of hematocrit (A) and plasma lactate concentration for pumpkinseed sunfish ( <i>Lepomis gibbosus</i> ) as a function of days post-experimental infection with ( <i>Apophallus sp.</i> and <i>Uvulifer sp.</i> ) (blue bars) or uninfected treatment (grey bars). The method used to estimate hematocrit overestimates the concentration observed. Bars span from the 25 <sup>th</sup> to the 75 <sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values...45	

## Liste des sigles et abréviations

± : plus ou moins

SMR : Taux métabolisme standard

MMR : Taux métabolique maximal

AS : Portée aérobie

P : p-value

$P_{crit}$  : Tension partielle d'oxygène critique

$PO_2$  : Pression partielle d'oxygène dans l'eau

$\dot{M}O_2$  : Taux de consommation d'oxygène

$O_2$  : oxygène

LOE : perte d'équilibre

sec : secondes

cm : centimètres

N : échantillon

h : heure

mg : milligramme

g : gramme

L : litre

ml : millilitre

## Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur Matthew Regan qui a été un scientifique incroyable avec qui discuter, développer et analyser ce projet, mais autant plus une personne exceptionnelle avec qui j'ai pu créer un lien de confiance très solide. Merci pour ton écoute, tes bonnes valeurs et ton ouverture d'esprit. Merci à ma co-directrice Sandra Binning, une grande chercheuse au sourire facile, aux belles valeurs et aux conseils précis. Merci également à tous les membres de la station de biologie des Laurentides, que ce soient les attentions des cuisiniers et cuisinières, les soirées chez Lou ou encore Georges-Étienne Charrette, Louis-Philippe Beauchamp et Gabriel Lanthier pour l'aide pour préparer mes expériences. Merci énormément à mes aides de terrains et de dissections, Laurie Provençal et Esther Lanaspa. Merci à Zach Bélisle et Justin Sabetti pour les coups de mains pour le code.

Merci au département de biologie et aux associations étudiantes de l'AEBUM et de l'AECBUM. M'impliquer au sein de ces associations étudiantes m'a apporté beaucoup d'expériences, d'amis.es et de souvenirs. Je ne serais pas le même et je ne serais sûrement pas un futur maître sans elles !

Merci à Tristan Legault pour les innombrables soirées passées ensemble, merci à Mikael Paquette pour les centaines de chansons qu'on se partage, merci à Maude Giguère pour les sourires et d'être ma personne. Merci à ma famille qui me supporte et me soutient dans tout ce que je fais. Merci à la famille que j'ai et celle que j'ai pu choisir. J'ai hâte de vivre ma vie à vos côtés. Je vous aime !

## Chapitre 1 – Introduction générale

L'augmentation de température de l'eau est l'une des conséquences du réchauffement climatique les plus préoccupantes sur les systèmes aquatiques d'eau douce (IPCC, 2021). Les effets des changements de température font l'objet de plus en plus d'études dans la communauté scientifique (Zhu et al, 2022; Song et al, 2021; Olsvik et al, 2013; Hevrøy et al., 2012). Cependant, les impacts de certaines conséquences indirectes, comme la perte de solubilité de l'oxygène diminuant les concentrations d'oxygène dissous et augmentant la quantité de zones hypoxiques dans les lacs n'ont pas été totalement approfondies à ce jour (Jane et al, 2021). Il est considéré qu'une zone est hypoxique lorsque la concentration en oxygène diminue en dessous de 2 mg/L (Rabalais et al., 2001). Il est attendu que le métabolisme de certaines espèces ectothermes comme les poissons et certains de leurs parasites, augmente avec la température (Clarke et Johnston, 1999). Une augmentation des taux métaboliques entraîne une hausse de la demande en oxygène pour ces individus, ce qui peut être une contrainte (Mallekh et Lagardere, 2002). L'augmentation de température peut augmenter la croissance et le nombre de parasites relâchés lors du développement chez des escargots aquatiques (Macnab et Barber, 2012; Thomas et Blandford, 2003), le premier hôte intermédiaire d'espèces de trématodes parasites (Achiorno et Martorelli, 2016). Une hausse des taux d'infections parasitaires est une menace pour les poissons d'eau douce (Chubb, 1977). Le parasitisme peut engendrer une contrainte sur la physiologie des poissons par l'activation du système immunitaire, ce qui augmente la demande énergétique de l'animal (Schulte et al, 2014). De plus, l'hypoxie peut engendrer une diminution de l'activité bactérienne et de la concentration d'anticorps, rendant les poissons plus sujets aux infections et aux maladies (Pollock et al., 2007). Les conséquences de la combinaison du parasitisme et de l'hypoxie sur la physiologie des poissons sont plutôt méconnues. La concentration d'oxygène en normoxie ne contraint pas les poissons, cependant, l'hypoxie peut engendrer différentes réactions morphologiques, physiologiques et comportementales pour maintenir des taux de consommations d'oxygènes normaux. L'ampleur de l'habileté à résister au manque d'oxygène démontre la tolérance hypoxique d'une espèce (Mandic et Regan, 2018). En théorie, l'augmentation des taux métaboliques avec une infection parasitaire réduirait la tolérance hypoxique des poissons, mais cette théorie n'a pas encore été testée expérimentalement pour l'instant.

L'objectif de cette recherche est d'investiguer l'effet de l'infection parasitaire sur la tolérance hypoxique et sur la portée aérobie, représentant ainsi l'effet sur les taux métaboliques aérobie d'une espèce de poisson native du Québec, le crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*, Linnée 1758). Plus spécifiquement, une infection parasitaire expérimentale fut effectuée sur un groupe de poissons et suivie par plusieurs séquences d'analyse de respirométrie pour tenter de comprendre l'impact de l'infection parasitaire sur la tolérance hypoxique et sur le métabolisme et ses mécanismes sous-jacents. Les expériences ont été faites à cinq moments sur une période de 56 jours suivant l'infection pour analyser l'effet temporel de l'infection.

### *Les conséquences indirectes des changements climatiques sur les organismes aquatiques*

Les changements climatiques entraînent des conséquences planétaires en causant, entre autres, une augmentation de la température moyenne globale. Cette augmentation de température ambiante cause le réchauffement des sources d'eau, spécialement les lacs tempérés comme ceux retrouvés au Québec (Adrien et al., 2009). À la suite de ce changement abiotique, plusieurs conséquences sont à prévoir.

Une première est l'augmentation du nombre et de la superficie des zones hypoxiques dans ces lacs (Jane et al., 2021). L'hypoxie peut également être le prédécesseur de l'anoxie, c'est-à-dire une absence totale d'oxygène. L'oxygène est essentiel pour la grande majorité des espèces animales et pour les lacs en assurant la régulation de la biodiversité, en régulant les émissions de gaz à effets de serre et en maintenant l'équilibre biogéochimique (Richards, 2011). Un contributeur important dans la réduction d'oxygène dissous dans l'eau est la relation inversement proportionnelle entre la température de l'eau et la solubilité de l'oxygène. L'augmentation de la température de l'eau diminue la quantité de molécules d'oxygène présentes dans l'eau (Buentello, 2000). Cette baisse de concentration d'oxygène dissous peut être amplifiée par l'augmentation de nutriments, notamment l'azote et le phosphore, présents dans l'eau, par une augmentation notable de la décomposition de matière ainsi que par une stratification thermique plus importante (Zhu et al, 2011). Plusieurs activités humaines peuvent causer l'augmentation de nutriments se trouvant dans l'eau : l'agriculture, le déversement d'eaux usées et le ruissellement de terrains dénudés de végétation comme les golfs sont quelques-unes des pratiques néfastes pour les écosystèmes

(Nedwell et al., 1999). Étant donné qu'une augmentation de nutriments et de la température de surface peut engendrer un accroissement de la production primaire des phytoplanctons ainsi que des macrophytes, il sera possible d'observer une augmentation de la quantité de matière organique se précipitant vers les profondeurs. Cela engendre plus de décomposition par l'activité bactérienne. L'activité de certaines bactéries utilise l'oxygène dissous dans ses réactions enzymatiques et aide à la désoxygénation de l'eau plus profonde. (Rabalais et al., 2010 et Katsuki et al., 2009). Donc, les animaux vivants dans ces environnements seront exposés plus fréquemment à l'hypoxie. Leur survie dépendra de leur habileté à se disperser vers d'autres milieux et si c'est impossible, de tolérer et survivre aux contraintes imposées par ces conditions hypoxiques.

Un autre des impacts de l'augmentation de la température par suite des changements climatiques est l'augmentation de la prévalence de certaines espèces de parasites puisque leur transmission est parfois favorisée par une hausse de température (Chubb, 1977). Au contraire, certains milieux recensent une perte de biodiversité des parasites avec la hausse de température (Wood et al., 2023). Les parasites, comme plusieurs autres espèces, sont victimes des changements climatiques et sont sujets d'études à cause de leur importance dans les réseaux trophiques (e.g. Marcogliese, 2016; Marcogliese, 2001). Les parasites sont des organismes généralement de petite taille qui vivent sur ou à l'intérieur d'un individu hôte et ayant un impact négatif sous forme de blessure ou de nuisance réduisant le fitness de l'hôte à certains moments de la vie de cet hôte (Poulin et Morand, 2000; Price, 1980). Les parasites sont omniprésents dans les systèmes aquatiques et sont liés à des organismes de différents niveaux trophiques (Friesen et al., 2020) De ce fait, l'intégration des espèces parasites quadruplerait le nombre de liens au sein des réseaux trophiques (Lafferty et al., 2008). Leurs impacts sur le métabolisme, sur la migration, sur la reproduction de leurs hôtes expliquent l'intérêt d'approfondir les connaissances sur ce sujet qui reste assez méconnu encore à ce jour (Binning et al., 2017). Le réchauffement des eaux à travers le globe entraîne des conséquences directes sur l'impact des parasites sur leurs hôtes parce que l'augmentation de température peut entraîner une hausse du métabolisme des parasites et donc une hausse des rythmes de croissance, de reproduction et d'alimentation (Fels et Kaltz, 2006, Kirk et al, 2018). Certains trématodes, dont ceux causant la maladie du point noir, se développent à l'intérieur et sur la peau du poisson et pourraient endommager leur hôte de façon notable. Dans un

milieu plus chaud, leur nombre pourrait devenir supérieur et donc les poissons seraient exposés à plus de maladies et de pathogènes (Lõhmus et Björklund, 2015). Il serait également prévisible pour ces raisons que les parasites aient un impact non seulement sur le métabolisme de leur hôte mais également sur la tolérance hypoxique de ceux-ci (Roberts, 1989, Tort, 2011).

### *L'importance de l'oxygène*

La respirométrie permet d'estimer indirectement l'énergie disponible pour un poisson en mesurant la quantité d'oxygène consommée par celui-ci. Le taux métabolique standard (SMR) est le taux métabolique minimal nécessaire au maintien de la survie d'un individu au repos tandis que le taux métabolique maximal (MMR) est le taux maximal d'énergie disponible aérobiquement pour un même individu (Chabot et al., 2016). Le MMR peut être estimé à partir de la consommation d'oxygène ( $\dot{M}O_2$ ) à la suite d'un effort extrême (Rummer et al., 2016). La différence entre le SMR et MMR permet d'estimer la portée aérobie (AS) d'un individu. La portée aérobie est l'estimation de l'amplitude d'énergie aérobie disponible à la réalisation d'activités physiologiques journalières d'un poisson au-delà de la survie, notamment la digestion, la reproduction et la défense immunitaire (Claireaux et Lefrançois, 2007).

L'oxygène dissous est nécessaire pour tous les poissons présents dans les systèmes d'eau douce ainsi que pour tous les autres organismes aérobies. L'oxygène est absorbé et diffusé au travers des branchies et transporté jusqu'aux mitochondries afin de créer de l'adénosine-triphosphate (ATP). Cette molécule est obtenue par une réaction de phosphorylation oxydative. L'ATP est la source d'énergie principale pour toutes les espèces (Hong et al., 2017). Puisque la synthèse aérobie par la respiration est la route biochimique optimale pour générer les quantités d'ATP nécessaires pour subvenir au coût métabolique des animaux, une déficience d'oxygène dans les milieux naturels causerait un stress et ultimement la mort des espèces faisant face à ce manque (Mandic et Regan 2018). Cette perturbation se traduit de plusieurs façons chez le poisson. D'une part, le changement de concentration d'oxygène entraîne un coût homéostatique supplémentaire pour tenter de pallier le manque d'énergie provenant de source aérobie. Il est nécessaire pour l'individu de tenter d'ajuster les sources et les demandes d'énergie pour maintenir une balance énergétique (Mandic et Regan 2018). D'une autre part, les modifications des interactions et des comportements des

individus dans la chaîne trophique, causées entre autres par la localisation des zones hypoxiques, entraînent également un coût énergétique aux espèces devant se déplacer afin de rester dans des espaces permettant un balancement du budget énergétique (Schulte et al, 2014).

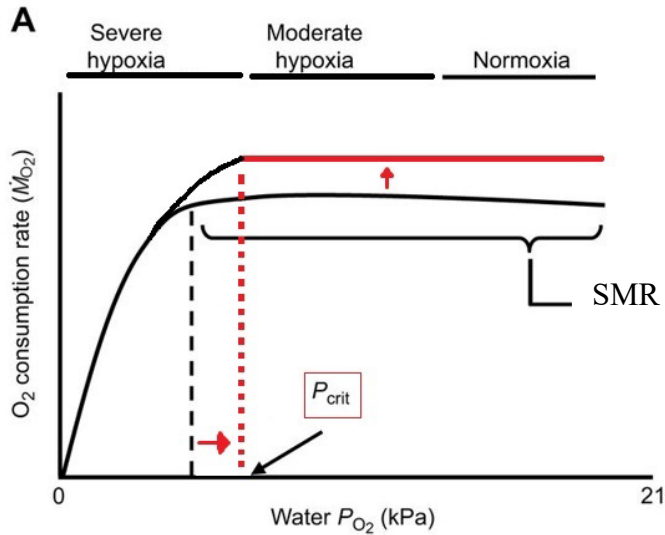
Plusieurs différentes stratégies peuvent être employées par ces espèces pour survivre à ce stress abiotique à court, moyen et long terme. La première stratégie est une tentative d'optimisation des fonctions aérobies grâce à une modification comportementale, morphologique ou physiologique de l'individu pour tenter d'augmenter la quantité d'oxygène récupérée. Un exemple de cette stratégie est le déplacement des individus vers des zones normoxiques pour éviter les milieux hypoxiques (Domenici et al., 2013). Ensuite, une augmentation de la superficie des branchies pour augmenter la surface d'échange grâce au remodelage ou à la plasticité physique peut être observée chez certains poissons. Le carassin commun (*Carassius carassius*) et le poisson rouge (*C. auratus*) sont deux espèces réalisant un remodelage de leurs branchies en situation hypoxique (Dhillon et al, 2013). L'augmentation de surface d'échange augmente la quantité d'oxygène récupéré. En contrepartie, cet effort entraîne une augmentation de la filtration des nutriments et par conséquent les coûts osmorégulateurs augmentent à cause de la prise en charge d'ammonium, de la prise en charge de substrats toxiques et des chances de saignement associés par cet effort (Nilsson et Randall, 2010). Cette stratégie n'est évidemment pas viable à long terme, mais peut permettre à l'individu de produire une quantité suffisante d'énergie pour continuer à réaliser ses activités journalières pendant une certaine période (Nilsson et Randall, 2010). Certaines espèces vont augmenter l'affinité de couplage des hémoglobines avec l'oxygène, une augmentation de l'hématocrite en augmentant le volume de globules rouges dans le sang ou encore une augmentation de l'amplitude et/ou de la fréquence de la ventilation, c'est-à-dire du volume d'eau passant par les branchies et le nombre de respiration par minute respectivement (Mandic et Regan 2018). Cependant, l'augmentation du taux d'hématocrite a pour conséquence d'élever la viscosité du sang, l'influx sanguin a donc plus de résistance lors du transport du sang et nécessite plus d'énergie qu'en temps normaux. (Gallaughier et Farrell, 1998). Pour conclure, ces stratégies permettent de tolérer partiellement l'hypoxie, mais aucune d'entre elles n'est viable à long terme puisque chacune de ces stratégies apporte un coût. L'oxygène est primordial pour toutes les



espèces et l'hypoxie peut causer de lourds dommages ou encore la mort si la période d'exposition est trop longue ou si l'hypoxie est trop sévère pour l'individu (Mandic et Regan 2018).

### *La pression critique*

Une méthode employée fréquemment pour quantifier la tolérance hypoxique des poissons est la détermination de la pression critique d'oxygène ( $P_{crit}$ ) en deçà de laquelle la dépendance envers le métabolisme aérobie devient sévèrement compromise (Mandic et Regan 2018). La tolérance hypoxique d'un animal est plus élevée plus ce  $P_{crit}$  est bas (voir Figure 1.1). Un animal pouvant maintenir son SMR ou un taux métabolique routinier, représentant la consommation d'oxygène et la dépense énergétique en situation régulière, à des concentrations d'oxygène plus basse est nécessairement plus tolérant à l'hypoxie. Donc, un individu avec une meilleure tolérance hypoxique maintiendra un taux métabolique routinier régulier même si les concentrations d'oxygène dans l'environnement ambiant sont plus basses. L'individu plus tolérant à l'hypoxie sera donc moins contraint par les milieux hypoxiques.



**Figure 1.1** La consommation d'oxygène d'un poisson en réponse à une situation hypoxique. (Mandic et Regan 2018)

La réponse aérobie classique d'un poisson face à la diminution de la pression partielle de l'oxygène dans l'eau ( $P_{O_2}$ ). La ligne courbe solide représente le taux de consommation d'oxygène ( $\dot{M}_{O_2}$ ) requis pour supporter le taux métabolique de routine, un poisson peut typiquement maintenir cette  $\dot{M}_{O_2}$  sur un large spectre de concentration d'oxygène. Les concentrations d'oxygène sont associées d'hypoxie sévère de 0 au  $P_{crit}$ , d'hypoxie modérée du  $P_{crit}$  à environ 16 kPa et de normoxie au-delà. La ligne verticale pointillée représente le  $P_{crit}$ , la valeur de  $P_{O_2}$  critique à laquelle l'animal ne pourra plus extraire suffisamment d' $O_2$  pour supporter le  $\dot{M}_{O_2}$  routinier. Les  $P_{O_2}$  sous la  $P_{crit}$  sont sévèrement hypoxiques et vont compromettre les voies aérobie de synthèse d'ATP. À ces concentrations, le poisson dépend donc de plus en plus de la synthèse d'ATP provenant des voies anaérobies ou de la dépression métabolique. Les lignes rouges représentent les prédictions quant à la hausse du taux métabolique standard (SMR) et de hausse attendues du  $P_{crit}$ .

Lorsque le  $P_{crit}$  est atteint, le poisson devra donc compter sur ses mécanismes anaérobies pour pallier le manque de synthèse d'énergie via la voie aérobie ou encore diminuer la consommation d'ATP pour équivaloir la baisse de synthèse de cette molécule énergétique. (Mandic et Regan 2018). Une stratégie commune lorsque la concentration ambiante se trouve en dessous de la pression critique est l'utilisation de réactions anaérobies pour produire de l'énergie grâce à la glycolyse. Il est possible d'identifier certaines molécules indicatrices de ces réactions. Un des

constituants produits lors de ces réactions est le lactate et il est possible de détecter sa concentration dans le sang. Cela permet de quantifier la part des réactions anaérobies lors d'un stress hypoxique. La glycolyse anaérobie peut aider à maintenir un approvisionnement énergétique pour les efforts soutenus, mais requiert par la suite une régénération de ces sources énergétiques qui agissent comme des fonds de stockage (Rees et al., 2009). De plus, ces réserves ne sont pas très conséquentes, cette stratégie est donc limitée très rapidement. Elle permet aux espèces de résister à court terme à des zones hypoxiques. Si une espèce fait face à une exposition hypoxique trop sévère, la glycolyse ne permettra pas un apport suffisant d'ATP et la survie de l'espèce dépendra de son habilité à réduire sa consommation d'ATP via une dépression métabolique (Hochachka et Somero, 2002). Lors de conditions hypoxiques extrêmes ou prolongées où un individu se trouve en dessous de son  $P_{crit}$ , celui-ci peut atteindre la limite de son potentiel de survie et atteindre un état de perte d'équilibre précédant la mort (sensu *loss of equilibrium*; LOE) (Almeida-Val et al. 2000). La pression partielle d'oxygène à laquelle un individu atteint le LOE est nécessairement plus faible que sa valeur de  $P_{crit}$ . Le LOE représente la variable ultime de la mesure de la tolérance hypoxique, car en dessous de cette valeur, un individu ne pourra pas employer la voie aérobie, la voie anaérobie ou encore la dépression métabolique pour survivre (Ultsch et Regan, 2019).

Dans notre étude, nous avons utilisé le SMR comme taux métabolique de référence pour nos calculs de  $P_{crit}$ . Bien que le taux métabolique de routine soit parfois utilisé à cette fin, le  $P_{crit}$  calculé à l'aide du SMR revêt une importance physiologique, écologique et méthodologique pour trois raisons principales. Premièrement, à un  $P_{crit}$  basé sur le SMR, l'AS du poisson est à zéro après avoir diminué progressivement depuis la normoxie, ce qui signifie qu'à cette  $PO_2$ , tout processus au-delà des fonctions de maintenance ne peut être alimenté que par la glycolyse anaérobie (Claireaux et Chabot, 2016). Deuxièmement, en dessous du  $P_{crit}$ , maintenir l'équilibre énergétique nécessite une dépendance accrue à la glycolyse anaérobie et/ou le déclenchement d'une dépression métabolique régulée, indiquant que la vie au niveau ou en dessous du  $P_{crit}$  est finalement insoutenable (Mandic et Regan, 2019). Et troisièmement, le SMR est une mesure de  $\dot{M}O_2$  plus reproductible et fiable que le  $\dot{M}O_2$  de routine, qui est intrinsèquement variable (Chabot et al., 2016), ce qui fait du SMR un taux de référence plus efficace. Pour ces raisons, la plupart des

chercheurs dans le domaine considèrent désormais le SMR comme le taux de référence optimal pour le calcul du  $P_{crit}$  (Ultsch et Regan, 2019).

*L'impact possible de la combinaison de l'augmentation de zones hypoxiques et de l'augmentation du taux d'infections parasitaires*

Comme mentionné plus tôt, les poissons expérimentent plus de stress environnemental avec les changements climatiques. Étant des espèces ectothermes, des températures d'eaux plus hautes vont augmenter naturellement les taux métaboliques des organismes. De plus, d'avantage de zones hypoxiques vont être créées puisque la disponibilité en oxygène diminue proportionnellement avec la hausse de la température de l'eau. Il est prouvé qu'une faible concentration en oxygène dans l'eau est un facteur environnemental très stressant pour la majorité des espèces et ce, encore plus spécialement l'été dans des lacs peu profonds ou dans les zones eutrophes (Lenihan et al., 2001). Puisque les poissons subiront plus de stress environnementaux, ceux-ci auront peut-être une résistance plus faible face aux pathogènes et aux agents infectieux. (Mikheev et al., 2014). Certaines stratégies utilisées par les poissons pour faire face à l'hypoxie peuvent additionnellement les exposer à un risque plus élevé de parasitisme. Mikheev et al. (2014) étudiaient des juvéniles de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposés à des cercaires de *Diplostomum pseudospathaceum*. Ils ont trouvé que les poissons en situation hypoxique avaient une plus grande amplitude de ventilation et que plus celle-ci augmente, plus l'exposition aux parasites augmente, causant une plus grande probabilité d'infections du poisson. De surcroît, le parasitisme peut entraîner un coût au niveau de l'activation du système immunitaire du poisson. Ceci entraîne des réactions physiologiques très coûteuses en énergie (Kirk et al., 2018; Levet et al., 2023). Étant donné que l'hypoxie entraîne un stress énergétique sur le poisson, il est attendu que les poissons soient moins tolérants à l'hypoxie lorsque l'infection bat son plein, puisque moins d'oxygène sera disponible par synthèse provenant des voies aérobies. La demande énergétique du système immunitaire pourrait également contraindre énergétiquement les mécanismes physiologiques qui s'activent lors d'un stress hypoxique et par le fait même augmenter la valeur de  $P_{crit}$  de l'individu. Il est pertinent d'utiliser l'infection expérimentale pour tenter de mesurer l'impact du développement parasitaire sur le métabolisme et la tolérance hypoxique des poissons puisqu'elle permettra de mesurer l'impact du début à la fin du développement des parasites chez l'hôte.

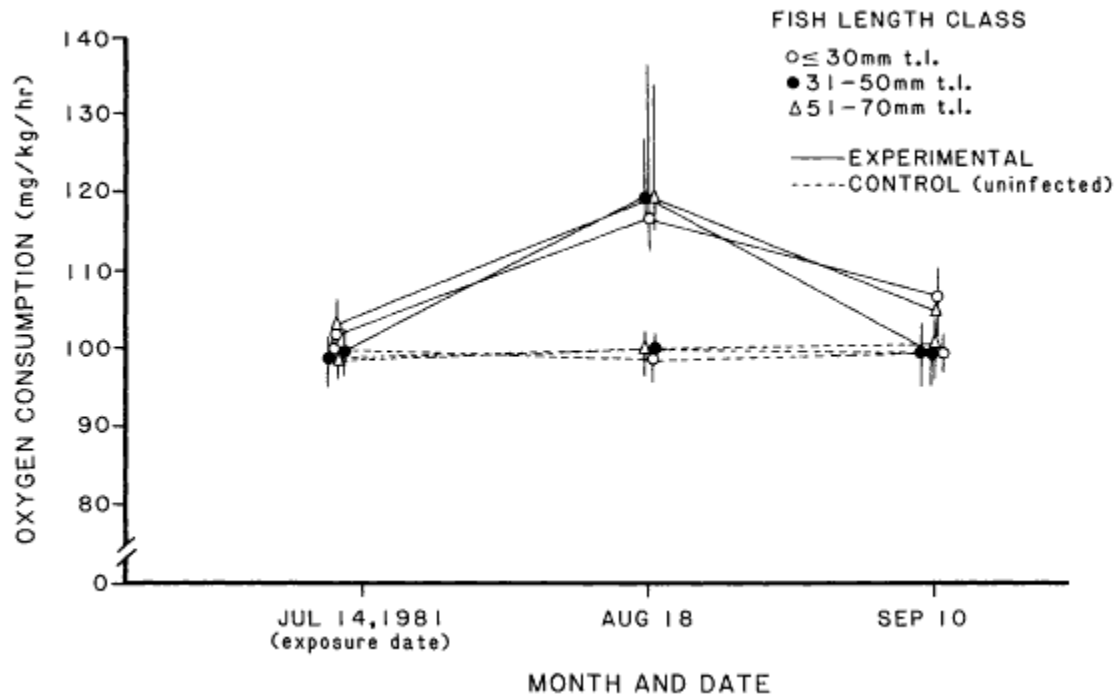
### *Infection expérimentale*

L'infection expérimentale en laboratoire est une technique utilisée dans les études portant sur les parasites pour quantifier l'impact de l'infection (Sagonas et al., 2020; Kaufmann et al., 2014). Ces infections présentent des caractéristiques communes lorsqu'effectuées en milieu contrôlé. Le dénombrement exact du nombre de parasites et le temps d'exposition sont deux critères importants, mais qui varient d'une étude à l'autre en fonction de l'hôte ainsi que du type de parasites. Dans l'étude de Lemly et Esch de 1984, les poissons furent en exposition pendant deux, quatre, six ou huit heures et étaient exposés à cinq *Helisoma trivolvis*, une espèce d'escargot aquatique sécrétant des cercaires. L'aquarium utilisé était de six litres. Une autre étude sur le barbeau de rivière (*Ictalurus punctatus*) démontre une infection concluante de cinq poissons d'eau douce par le trématode *C. formosanus*. Le protocole établit une exposition de deux à trois minutes des poissons aux escargots relâchant des métacercaires infectieuses. Un aquarium de deux litres fut utilisé (Andrew et al., 2002). Une autre expérience relate un relâchement de 840 à 8940 de cercaires par jour de *P. minimum centrarchi*, un trématode de la même sous-classe (Digenea) qu'*Apophallus sp.* Ces cercaires sont infectieuses jusqu'à 24h à partir d'une eau à une température de 18°C (Hoffman, 1958). Il est également possible de faire une infection expérimentale en exposant les poissons en prélevant des cercaires ou métacercaires (Anderson et al., 1978; Donthaisong et al., 2015; Hoffman, 1958; Karvonen et al., 2004). Cette méthode présente l'avantage de connaître le nombre exact d'agents infectieux.

### *Expérience approfondie et réexplorée*

En 1984, un article publié par Lemly et Esch mettait en place une infection expérimentale. L'infection avec le parasite *Uvulifer ambloplitis* a été un succès et des tests de respirométrie ont été effectués en plus de tests sur la composition physique, la condition corporelle et la composition lipidique des poissons infectés, le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*). Les tests de respirométrie ont été faits à trois moments sur une période de presque deux mois et démontrent des taux métaboliques standards plus élevés chez le groupe expérimental que le groupe contrôle après un mois d'infection et un quasi-retour aux valeurs de SMR enregistrées au moment de l'infection après deux mois (voir figure 1.2) (Lemly et Esch, 1984).

La théorie de cette expérience a contribué à l'élaboration de mon projet, mais un nouvel angle est proposé. Cette étude se concentrera sur l'impact du parasitisme sur la tolérance hypoxique du crapet-soleil et ses mécanismes sous-jacents pour tenter de déterminer l'importance du système aérobie et anaérobie en situation hypoxique. Pour déterminer certaines valeurs, spécialement le  $P_{crit}$ , les valeurs de SMR seront nécessaires. Le MMR et l'AS seront également mesurés pour quantifier la partie aérobie de l'expérience et pouvoir comparer ces données avec les résultats de Lemly. Certaines améliorations à ces expériences seront observables dans le projet proposé ici. Premièrement, une analyse de la tolérance hypoxique grâce à l'obtention du  $P_{crit}$ , de la  $PO_2$  du LOE et de variables représentant l'importance de certains mécanismes physiologiques sous-jacents comme l'accumulation de lactate dans le sang et l'hématocrite a été réalisée. Deuxièmement, des techniques modernes de respirométrie intermittente, standardisées selon Killen et al. (2021) ont été effectuées. Finalement, un meilleur suivi de l'infection expérimentale a été fait en mesurant les variables 5 fois en 56 jours au lieu de trois fois en 2 mois, de plus les groupes expérimentaux sont plus grands (n=9 dans cette expérience, n=5, Lemly et Esch, 1984).



**Figure 1.2** L'impact du parasitisme par *Uvulifer ambloplitis* sur la consommation d'oxygène du crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*)  $n=5$  en fonction du temps (reproduit à partir de Lemly et Esch, 1984). Trois classes de poissons ont été séparées en fonction de leur taille totale (inférieure ou égale à 30mm, de 31 à 50 mm et de 51 à 70mm). La ligne pointillée représente les poissons du groupe sans infection tandis que la ligne pleine représente la consommation d'oxygène du groupe expérimental infecté.

## Objectifs et hypothèses

L'objectif de ce projet est d'en premier lieu d'utiliser une infection expérimentale pour réussir à mesurer l'impact du parasitisme sur la tolérance d'hypoxique et sur le métabolisme, à travers l'étude de la portée aérobie du crapet-soleil. L'hypothèse est que le parasitisme des trématodes, des parasites communs du crapet-soleil, a une relation positive sur le métabolisme du poisson, une infection plus grande engendrerait donc un SMR plus élevé. Les coûts engendrés par l'infection parasitaire, que ce soit l'activation du système immunitaire, le stress de l'infection, ou les coûts physique des parasites sur le poisson (Bashir Tanoli et Tinsley, 2014), augmenteraient le SMR du poisson et ceux-ci auraient une moins grande portée aérobie. L'hypothèse est que le parasitisme, en augmentant le taux métabolique, aura un impact négatif sur la tolérance hypoxique des poissons. Il est attendu que le parasitisme du crapet-soleil réduise sa tolérance hypoxique en augmentant la

quantité d'oxygène nécessaire pour compenser le coût du parasitisme (Nilsson, 2010). Le poisson atteindrait donc sa  $P_{crit}$  à une concentration partielle d'oxygène plus élevée que sans parasitisme. Le dernier objectif est de découvrir l'importance de l'impact parasitaire en fonction du temps suivant l'infection. L'hypothèse est que l'impact de l'infection serait à son maximum après 2 et 3 semaines d'infection puisque l'enkystement réduit le coût engendré par les parasites car ceux-ci se retrouvent en état de dormance (Berra et Au, 1978). Suivant ce maximum, le SMR devrait commencer à réduire pour retourner aux valeurs pré-infections (Lemly et Esch, 1984). Les poissons devraient également avoir une tolérance hypoxique se rétablissant aux valeurs de  $P_{crit}$  pré-infections. L'infection serait plus coûteuse que la charge parasitaire étant donné que nombre de points noirs semblent ne pas avoir d'impact significatifs sur le taux métabolique dans plusieurs cas malgré une tendance négative (Guitard, 2021; observation personnelle lors de stage de recherche, 2021).

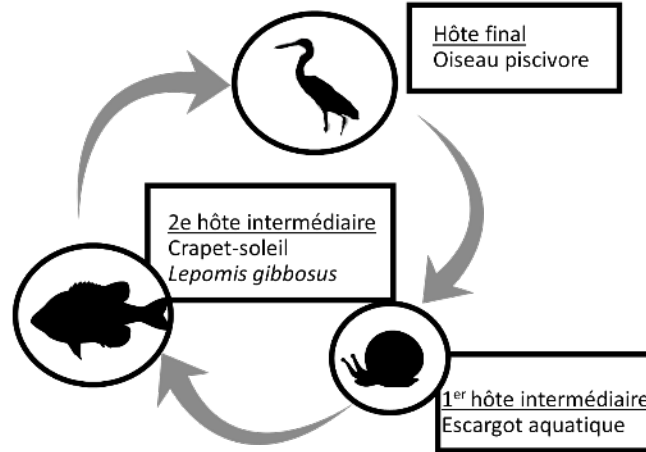
#### *Espèce hôte modèle*

L'espèce hôte utilisée pour ce projet d'infection sera le crapet-soleil. Ce poisson d'eau douce est abondant et provient de la famille des Centrachidae et originaire de l'est de l'Amérique du Nord (Scott et Crossman, 1974). Ce poisson est présent dans un grand nombre de lac au Québec et est sujet à l'infection de plusieurs espèces de parasites dont les trématodes causant la maladie du point noir, la maladie sujette de ce projet. Ce poisson est effectivement abondant à la Station de biologie des Laurentides de l'université de Montréal où se sont déroulées les manipulations et les expériences. Les poissons présents dans le lac Cromwell ont beaucoup de parasites et sont donc exposés à un coût parasitaire en milieu naturel. De plus, ce lac gèle l'hiver donc une hypoxie hivernale est fort probablement vécue par les espèces y vivant. Cela augmente l'intérêt de réussir à mesurer le coût métabolique que l'infection parasitaire engendre sur le crapet-soleil et l'effet sur la tolérance hypoxique de ceux-ci. Cependant, il est possible qu'une coévolution ait lieu entre les parasites et les crapets-soleil, les rendant plus résilient à l'infection parasitaire. Ce poisson est généraliste et consomme des macro-invertébrés (Robinson et al., 1993). Le crapet-soleil est une proie pour certains poissons piscivores comme les achigans à petite et grande bouche (*Micropterus salmoides* et *Micropterus dolomieu*) (Wilson et al., 1993) et pour certains oiseaux piscivores comme le martin-pêcheur (*Megaceryle alcyon*) et le grand héron (*Ardea herodias*).



### *Espèce parasite modèle*

La maladie du point noir est très présente dans les écosystèmes aquatiques retrouvés au Québec ou encore en Amérique du Nord (Lane et Morris, 2000). *Uvulifer sp* (Hughes, 1927) et *Apophallus sp.* sont deux trématodes causant la maladie du point noir dans les lacs québécois. Ces parasites ont des cycles de vie complexe. Les œufs sont relâchés après une reproduction sexuelle chez un oiseau piscivore, que ce soit le martin-pêcheur ou le grand héron (Lemly et Esch, 1984). Les œufs des parasites sont relâchés par le système excréteur des oiseaux dans l'eau et se déplacent librement jusqu'à ce que ceux-ci infectent un escargot aquatique (Planorbidae, Lymnaeidae ou Hydrodiidea) où débute une nouvelle phase du développement du parasite. Une reproduction asexuée a lieu dans l'escargot. Au courant des jours suivant, les parasites sont relâchés en cercaires dans l'eau. Ensuite, ils vont infecter un deuxième hôte intermédiaire, le crapet-soleil, l'achigan à petite bouche ou la perchaude (*Perca flavescens*) (Esch et Huffines, 1973; Lane et Morris, 2000; Margolis & Arthur, 1979). Les cercaires mûrissent et deviennent des métacercaires, ceux-ci réaliseront un enkystement en formant une protection lipidique. Le traitement immunitaire du poisson enkyste également le parasite enkysté et mélanise la bulle lipidique (Hunter et Hamilton, 1941). Le cycle de vie est complété si le poisson se fait manger par son hôte final, un oiseau piscivore où la reproduction sexuée se produit et où le cycle recommence (Lemly et Esch, 1984) (voir figure 1.3). Chez le crapet-soleil les kystes se trouvent généralement sur la surface du poisson, majoritairement sur les nageoires ou encore dans les muscles de l'individu. Une mélanisation du kyste va être faite par la réaction immunitaire du crapet-soleil en plus de la formation d'une couche de tissus conjonctifs autour du kyste en question (Hunter et Hamilton, 1941).



**Figure 1.3.** Illustration du cycle de vie des parasites trématodes *Uvulifer sp.* et *Apophallus sp.*

## **Chapitre 2 – Le développement d’infections parasitaires n’affecte pas la portée aérobique et la tolérance hypoxique du crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*)**

### **Contribution des co-auteurs :**

- Rémi Chauvette : Conception du projet d’étude, travaux terrain, analyse et traitement des données, rédaction
- Sandra Ann Binning : Conception du projet d’étude, révision du manuscrit, supervision
- Matthew D. Regan : Conception du projet d’étude, financement du projet d’étude, révision du manuscrit, supervision

### **Parasite infection has little impact on aerobic scope of activity and hypoxia tolerance in pumpkinseed sunfish during cyst development (*Lepomis gibbosus*)**

Rémi Chauvette<sup>1,2,±</sup>, Sandra A. Binning<sup>1,2</sup>, Matthew D. Regan<sup>1</sup>

±Author for correspondence ([remi.chauvette@umontreal.ca](mailto:remi.chauvette@umontreal.ca))

<sup>1</sup>Département de sciences biologiques, Université de Montréal, 1375 Avenue Thérèse-Lavoie-Roux, H2V 0B3, QC, Canada

<sup>2</sup>Ressources aquatique Québec (RAQ), Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER), 310 All. des Ursulines, Rimouski, G5L 2Z9, Qc, Canada

Target journal: *Canadian Journal of Zoology*

## Résumé

Les températures des milieux d'eau douce augmentent de concert avec les températures atmosphériques, ce qui élève les demandes en oxygène des poissons résidents tout en réduisant simultanément les niveaux d'oxygène dissous dans l'eau. Ces phénomènes limitent la portée aérobie (AS) des poissons pour la réalisation d'activités et les rendent plus susceptibles à l'hypoxie. Le risque d'infection parasitaire qui, bien que courant chez les poissons, est prévu d'augmenter à mesure que les températures croissantes augmentent les taux métaboliques des parasites et de leurs hôtes intermédiaires. Étant donné que l'infection parasitaire peut déclencher une réponse immunitaire coûteuse en énergie et qu'elle dépend du temps de résidence du parasite chez l'hôte, cela pourrait également avoir un impact sur l'AS et la tolérance à l'hypoxie, bien que cela n'ait jamais été étudié. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection parasitaire réduirait la portée aérobie et la tolérance à l'hypoxie des poissons en fonction du temps du développement de l'infection. Pour tester cette hypothèse, nous avons infecté expérimentalement des crapets-soleil (*Lepomis gibbosus*) avec des trématodes parasites provoquant la maladie du point noir, une infection courante chez les poissons centrarchidae. Ensuite, à cinq moments au cours des 56 jours suivant l'infection, nous avons effectué des tests de respirométrie pour mesurer le métabolisme et la tolérance à l'hypoxie, pour estimer les taux métaboliques standards et maximaux, l'AS, la tension d'oxygène critique au et la  $PO_2$  de la perte d'équilibre au niveau de l'organisme, ainsi que des variables sous-jacentes liées à l'hypoxie, telles que le lactate plasmatique et l'hématocrite au niveau sanguin. Dans l'ensemble, nos résultats ont révélé que l'infection expérimentale par les trématodes avait peu d'effet sur le métabolisme et la tolérance à l'hypoxie des crapets-soleil par rapport aux poissons non-infectés. L'exception était une différence faible mais significative de l'AS, liée au temps post-infection mais pas à l'infection parasitaire en soi, possiblement causée par la captivité. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que le crapet-soleil pourrait se révéler résilient aux infections parasitaires et à l'augmentation de zones hypoxiques, conséquences prévues avec l'augmentation des températures des milieux d'eau douce.

Mots clés: hôte-parasite, taux métabolique, hypoxie,  $P_{crit}$ , taux métabolique standard (SMR), Poisson d'eau douce, *Uvulifer sp.*, *Apophallus sp.*, maladie du point noir

## Abstract

Water temperatures in freshwater ecosystems are rising concurrent with rising atmospheric temperatures, elevating the oxygen demands of resident fishes while simultaneously reducing dissolved oxygen levels in the water. These phenomena constrain the fish' aerobic scope (AS) for activity and render them more susceptible to hypoxia. Compounding this challenge is the risk of parasite infection, which, although common in fishes, is projected to increase as rising temperatures enhance the metabolic and reproductive rates of many parasites and their intermediate hosts. Because parasite infection can trigger an energetically costly and time-dependent immune response in the host, this could further impact AS and hypoxia tolerance, though this has never been investigated. We hypothesized that parasite infection reduces the AS and hypoxia tolerance of fishes in a time-dependent manner. To test this hypothesis, we experimentally infected pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) with a trematode parasite causing blackspot disease, a common infection among centrarchid fishes. Then, at five points over 56 post-infection days, we made respirometry-based estimates of metabolism and hypoxia tolerance, namely standard and maximal metabolic rates, AS, critical oxygen tension and PO<sub>2</sub> of loss-of-equilibrium, as well as underlying hypoxia-related variables including plasma lactate and hematocrit. Overall, our results revealed that experimental trematode infection had little effect on the metabolism and hypoxia tolerance of pumpkinseed compared with controls. The exception was a small but significant difference in AS, which was related to time post-infection but not parasite infection *per se*, and likely caused by an effect of habituation to laboratory conditions and/or changes in body mass through time. Together, our results suggest that pumpkinseeds may prove resilient to parasite and prevalence of hypoxia that are projected to accompany rising water temperatures.

**Keywords:** Host-parasite, metabolic rate, hypoxia, P<sub>crit</sub>, standard metabolic rate (SMR), freshwater fish, *Uvulifer sp.*, *Apophallus sp.*, blackspot disease

## Introduction

As atmospheric temperatures rise, so too are those of the world's freshwater systems (IPCC, 2021). This presents resident ectothermic animals such as fishes with two challenges, as higher water temperatures simultaneously reduce dissolved oxygen levels and elevate the fishes' metabolism and thus demands for oxygen (Beamish et Mookherjee, 1964; Brett, 1972; Chabot et al., 2016). Together, these two phenomena constrain the fishes' aerobic scopes (AS) for activity and make them more susceptible to hypoxia, a reality becoming more prevalent in freshwater systems due not only to rising water temperatures, but also increased eutrophication caused by agricultural runoff (Buentello, 2000; Jane et al, 2021; Rabalais et al., 2010).

Compounding the increase of hypoxia in freshwater lakes is the risk of parasite infection. Parasites have a net negative impact on host fitness (Poulin and Morand, 2000; Price, 1980). Also, they are ubiquitous in aquatic systems and a regular part of life for freshwater fishes and understanding the role that infection has on host resilience to other global-change stressors is critical (Hoffman, 2019). It is not known exactly how rising temperatures may affect parasites and the burden they place on their hosts, in part due to the complexity of some host-parasite interactions (Marcogliese, 2016; Marcogliese, 2001). Higher temperatures can lead to higher infection rates (Chubb, 1977), due in part to higher rates of parasitic metabolism, growth, reproduction and feeding (Brooks and Hoberg 2007; Cable et al. 2017; Fels and Kaltz, 2006; Kirk et al., 2018). Fishes may therefore face increasing burdens of parasite infection as aquatic temperatures rise (Löhmus and Björklund, 2015). Conversely, climate-change induced increases in temperature have been related to decreases in parasite biodiversity through time (Wood et al., 2023). Since climate change is likely to disrupt host-parasite interactions it is increasingly important to understand the combined effects of infection and abiotic stress on hosts.

Parasite infection often leads to a host immune response which can result in inflammation and/or deployment of antibodies. These are some of the known strategies to counter a parasitic infection, but some mechanism involved are hard to identify with certainty and these vary across species (Nadler et al, 2021; Woo, 1992). However, while this immune response generally helps limit negative impacts of the infection, it is also energetically costly (Levet et al., 2023; Otalora-

Ardila et al., 2016, Owen-Ashley, 2007). This could raise metabolic rate above standard levels, which would subsequently elevate the fish's demand for oxygen and thus potentially render it more susceptible to hypoxia. This may be especially challenging for fish under projected future scenarios, when oxygen demands are already elevated due to higher water temperatures that simultaneously reduce dissolved oxygen levels and potentially increase parasite transmission (Buentello, 2000, Chubb, 1977, Schulte et al, 2014). Thus, to better predict how fishes may respond to their changing environments, it is useful to have a better understanding of how parasite infection affects their hypoxia tolerance.

Two highly prevalent parasites in temperate freshwater systems across North America is *Uvulifer ambloplitis* and *Apophallus* sp. (Lanthier, personal communication 2020), which causes the blackspot disease in the host fish. These trematodes have a complex life cycle with three hosts. After asexual reproduction in aquatic snails, they are shed in the water and the cercariae can infect a couple of different species, one of them being the pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*, Linné, 1758). Development inside the fish can last up to 25 days, after which the parasites enter a dormant encysted phase awaiting their host to get eaten by their final host, a piscivorous bird. It has been shown that fish infected with *Uvulifer ambloplitis* have reduced body condition, increased winter mortality, and reduced body lipids (Lemly and Esch 1984; Hamilton and Hunter 1941). It has also been shown that the metabolic rate of infected fish increases during the development of the parasite, peaking after 14 days and returning to baseline values two months following infection (Lemly and Esch, 1984).

The objective of this study was to determine the effect of time of trematodes' development on the host hypoxic tolerance and aerobic scope of activity, two metabolic characteristics that could be impacted by parasite infection. To achieve this objective, we compared pumpkinseed sunfish that were experimentally infected with *Uvulifer ambloplitis* and *Apophallus* sp., with a group of sham-infected fish. The experimental infection protocol was based on similar experimental infections using similar species (Levet et al., in prep; Lemly and Esch, 1984). We quantified hypoxia tolerance by measuring the critical oxygen tension ( $P_{crit}$ ) and the  $PO_2$  at which the fish lost equilibrium (LOE), as well as variables related to underlying mechanisms. Measuring  $P_{crit}$  required careful measurements of standard metabolic rate (SMR), representing minimal energy

spent by an individual to stay alive using intermittent flow respirometry, which were coupled with measurements of maximal metabolic rate (MMR), representing the maximum energy spent during intense stress to calculate aerobic scope of activity. Given the evidence indicating that the metabolic cost of parasite infection in this species is time-dependent, we performed all measurements at five different points following experimental infection, ranging from 3 days to 56 days post-infection. Together, our experimental design allowed us to determine how parasite infection affects the fish's capacity to tolerate hypoxia and retain aerobic scope of activity, and how these effects vary with time. We hypothesized that parasite infection reduces the hypoxia tolerance and aerobic scope of fish by increasing the SMR in a time-dependent manner, with maximum effect at approximately 28 days post-infection and a return to baseline levels by 56 days post-infection.



## Methods

### *Study species*

The host species used in this infection project is the pumpkinseed sunfish. This freshwater fish is abundant and is part of the Centrarchidae family and is from the eastern part of North America (Scott and Crossman, 1974). This fish is present and an active part of the trophic chain in many lakes of Quebec. This fish is subject to the trematode infection of *Apophallus sp.* and *Uvulifer ambloplitis*, causing the blackspot disease and are expected to cause a negative impact on the fitness of the infected individual (Lemly and Esch, 1984, Guitard et al., 2022). Fish were captured from Lake Cromwell (Quebec). This eutrophic lake contains organic matter and shows signs of seasonal hypoxic areas (Mélançon et al. Unpublished). Fish from that lake present a lot of natural infection, the blackspots being visible on the fins, the gills, the skin and even the eyes. The pumpkinseed is therefore an interesting species to observe the impact of the blackspot since it overcomes the cost of natural infection in the wild. It is possible to measure the degree of infection non-invasively by counting the blackspots present on the fish.

### *Parasite*

Two parasitic trematodes found in temperate lakes across North America, *Uvulifer ambloplitis* (Hughes, 1927) and *Apophallus sp.*, cause black spot disease in the fishes they infect. Development of the blackspot takes up to 25 days, where maximum physiological cost is observed in the host (Lemly and Esch, 1984). Through their feeding on the fish and the damage they cause when encysting on the fins, skin and muscle, these parasites ultimately cause a loss of body mass (Hunter and Hunter, 1938), body condition, lipid stores, as well as reduced winter survivability (Lemly and Esch, 1984). The fish counters this infection by launching an immune response that stimulates surrounding tissues to produce pathologic quantities of intracellular melanin via rapidly duplicating melanophore cells. These inflammatory macrophages melanise the cyst of the parasite, leading to the visible black spots which give the disease its name (Dönges, 1967, Xia et al., 2021). The two trematodes causing the black spot disease have a complex life cycle needing a total of 3 hosts and a change of ecosystem for the sexual reproduction. Eggs are released in lakes after sexual reproduction in their final host, a fish-eating bird (e.g. great blue heron, *Ardea herodias*,

kingfishers, *Megaceryle alcyon*). The first free living stage is when the miracidia larvae infect aquatic snails. Asexual reproduction in those snails will lead to the shedding of cercariae, the second free living stage that will infect the fishes. The cercariae will develop and create a cyst in the fish skin or muscles after approximately 21 days (Berra and Au, 1978). Once the fish is eaten by a piscivorous bird, the final host reached; the cycle is completed. The black spot disease has been the subject of some research where increase of oxygen consumption, negative impacts on body condition and winter survivability (Lemly and Esch, 1984) weight loss (Hunter and Hunter, 1938) and death (Krull, 1934, Kennedy 1975).

### *Fish collection and housing*

A total of 90 of pumpkinseed sunfish were collected by baited minnow traps in Lake Cromwell (45.59231°N, -73.59565°W) on June 21<sup>st</sup> and 22<sup>nd</sup>, 2022 from the Station de biologie des Laurentides (SBL, Quebec; 45.98898°N, -74.00013°W). These individuals measured between 5 to 8 centimeters (mean mass: 3.8g ± 5.7, mean standard length 3.8 cm ± 1,2) with some visible black spots (Trematoda: *Apophallus sp.* and *Uvulifer ambloplitis* min-max: 0-324; median: 17, both sides of the fish were accounted for). Fish were transported to the laboratory facilities within one hour of capture and received a salt bath quarantine treatment (3 g/L) over 7 days to reduce fungal and/or bacterial infections. The water was changed twice a day. Two doses of praziquantel treatment (2 mg/L) were also performed as a bath for two periods of 24 hours to eliminate unencysted helminths. The second treatment was done 6 days after the first one (see Fig.1.1 for visual representation of the manipulation timeline).

Fish were housed in 3 tanks (78.74 x 44.45 x 40cm, 66L) separated with a partition to ensure group stability (n = 15 per group, 30 fish per tank). A flow-through system pumped water from Croche lake (45.99003°N, -74.00567°W), which is adjacent to the facilities at the SBL. Water was kept at approximately 20°C during the whole housing period. The water went through a sand filter and was sterilized with ultraviolet light, with Geekpure 0.5-1 GPM UV water system of a 6W force. Every morning, each fish group was fed with 10 to 12 grams of frozen bloodworms. The tanks were cleaned approximately 1 hour after feeding to remove any excess food and excrement. Plastic plants and PVC tubes were added in the tanks to serve as refuge. The light cycle in the

laboratory mimicked natural late-summer sun cycle of 10 hours of darkness and 14 hours of light and was reduced during the summer to mimic natural sun cycle. Three individuals died during captivity before they were tested in respirometers leaving the total number of fish tested as 43 infected and 44 uninfected individuals.

After 11 days of acclimatization, fish were weighed, measured, and uniquely identified with a three-colour code using visual implant elastomer tags (VIE; Northwest Marine Technology) implanted on each side of the dorsal fin using a 29G needle. The fish were manipulated in individual plastic bags filled with water. Trematodes causing black spots were counted on both sides of the fish's body and on its fins. After another 10 days of acclimatization, the experimental infection was conducted (see Fig.1.1). Fish were randomly assigned to experimental and control groups, and randomly assigned to 3 different group, A, B, and C containing each 15 infected and 15 uninfected fishes. Since 6 respirometers were available, 3 infected and 3 uninfected fish were tested per day. 6 fishes from the three groups were used on three staggered days to have 9 fish from the infected and from the uninfected group for each day of experimentation.

#### *Snail collection and experimental infection*

Aquatic snails (*Amnicola limosa*) were caught with a dipnet in Lake Cromwell either by filtering the mud or by shaking the stems of water lilies. They were put in a small beaker with 250 to 450 mL of water from the same aquarium system as described above. Two days before the first day of infection, 250 snails were collected, followed by 200 on the day before the experimental infection. Approximately 200 snails were caught during the first two days of infection to assure a great amount of cercaria, for a total of 850 aquatic snails. The water temperature was increased to 25-27°C to induce the snails to shed trematode cercaria (Hoffman, 1958, Poulin, 2006, and Rondelaud et al., 2013). On the day of infection, thirty-one L plastic containers were filled with 700mL of lake filtered water at 20°C. We collected 675 cercaria from the snail water using a microscope. These were equally divided into 15 different containers (n= 45 per container). 15 fish from the infection group were individually put in one of the containers containing the cercaria for 8 hours. A control group of 15 fishes were also individually put in a container free of cercaria for 8 hours. The water of all 30 containers was oxygenated for 1 minute every 1h30. Fishes were put

back in their tanks after. This process was repeated 3 days in a row to stagger the infection of group A, B, C as mentioned before.

*Respirometry and hypoxia tolerance experiments*

A series of whole-animal respirometry experiments were performed on five different groups of fish at five time points following their experimental infection for the infected fish or the uninfected group: 3, 14, 28, 42 and 56 days post-exposure. Fish were euthanized after their experiment. These experiments lasted ~24 h and included measurements of maximal metabolic rate (MMR), standard metabolic rate (SMR), critical oxygen tension ( $P_{crit}$ ) and  $PO_2$  of loss-of-equilibrium (more details below).



<ul style="list-style-type: none"> <li>• c = capture</li> <li>• sb = salt bath</li> <li>• Pz = Praziquantel treatment</li> <li>• t = tagging</li> <li>• i = experimental infection</li> <li>• R = respirometry experiment</li> </ul>	<p>Each infection and respirometry was done on 3 staggered groups composed of 15 infected fishes and 15 uninfected fish</p> <p>N=9 per day of experiment</p>
--	--

**figure 2.1.** Visual representation of the timeline of the capture of the fish and every manipulation made on them during the experimentation.

Metabolic rate was estimated via oxygen uptake rate ( $\dot{M}O_2$ :  $mg\ O_2\ hr^{-1}$ ) using intermittent-flow respirometry. Two identical experimental water baths (78.74 x 44.45 x 40 cm, 66 L) filled with 40 L of water were connected to a centralized water bath containing 50 L of water that was oxygenated and temperature-regulated at  $23 \pm 0.5^\circ C$  in an air-conditioned room and heated with a submersible fish tank water heater with a thermostat. The same UV-filtered lake water that supplied the holding tanks was used for the water baths, albeit with an additional UV filtered using Geekpure 0.5-1 GPM UV water system of a 6W force. The two first tanks contained three resting chambers made

from Perspex cylinders (16 x 6 cm). The chambers were opaque excepting for a viewing window located on top. A ratio of 1:200 to 1:100 was respected for fish mass versus chamber volume. These chambers were individually connected to a closed water circuit (491ml; volume includes recirculation tubes) with a recirculation pump. Fiber optic O<sub>2</sub> probes (Firesting 4-channel O<sub>2</sub> meter, PyroScience, GmbH, Aschen, Germany; sample rate 0.33 s<sup>-1</sup>) were connected to each recirculating circuit. Probes were calibrated before each set of 3 days of experimentation. Each chamber circuit, made of vinyl tubing, had a flush pump connected to a digital timer programmed to a 10 min cycle that involved 6 min flush period and 4 min static period. Normoxia was reached after 1 min of the flush period.  $\dot{M}O_2$  could thus be calculated from the rate of oxygen decline during the 4 min static period (more details below) excluding the first and last 30s, after which the chamber was flushed with oxygenated water for 6 min. Background oxygen consumption was measured for 30 minutes before and after each experiment and subsequently subtracted from the  $\dot{M}O_2$  values, representing approximately 3 consumptions slopes pre and post trials. All materials were cleaned after every set of 3 days experiment using 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mixed with warm water and left to dry in direct sunlight.

Fish were fasted for 24 hours prior to respirometry experiments to ensure they were in a post-absorptive state (Clark et al., 2013). Experiments began with MMR measurements, where MMR was elicited using an established protocol (Roche et al., 2013; Guitard et al., 2022; Thambithurai et al., 2022) in which the fish was chased by hand in a circular chase arena (48 x 41 cm, height x diameter, 67 L) for 3 min. If the fish began to fatigue, soft tail pinches were used to continue swimming for the entire 3 min. Following the chase, the fish was air-exposed for 1 min (Roche et al., 2013) and then transferred to a respirometry chamber, which was quickly sealed (<15 s). The chamber remained closed for 10 min to enable MMR calculations (details below), and then was set to its 10 min flush-static cycle for the following 16 to 22 h to enable SMR measurements. Photoperiod mimicked natural summer and late summer sun cycle. At this point, the chamber was sealed without flushing indefinitely to enable PO<sub>2</sub> to gradually fall from normoxia towards the PO<sub>2</sub> of LOE, a process that took between 1.5 hours and 5 hours depending on the fish's  $\dot{M}O_2$  uptake and from which P<sub>crit</sub> could later be calculated (details below). The point of LOE was identified as the PO<sub>2</sub> at which the fish lost vertical equilibrium in the respirometry chamber for 10s.

### *Blood sampling and blood analysis*

After LOE was noted, the fish was quickly removed from the respirometer and anaesthetized in a 1% eugenol solution for 5 to 10 seconds, based on the fish response to physical touch. Its blood was collected from the dorsal aorta using a heparinized syringe and 28G needle. One drop of the blood was immediately used to measure blood lactate concentration following acute hypoxic stress using a Lactate Scout handheld lactate analyzer (EKF Diagnostics, Cardiff, UK). The remaining blood volume was collected in 1.5 ml Eppendorf tubes and immediately centrifuged at 5000 g for 10 min to separate plasma and packed red blood cells. Photos of the centrifuged blood were taken and later analyzed using v0.5.7 Image J (Rasband, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, 2018) to determine hematocrit (Fernandes et al., 2019; Thompson et al., 2016), a black and white filter was applied to have a clear distinction between the plasma and the blood cells. We circled the area of blood cells and divided by the full area of the blood and multiplied by 100 to get the hematocrit percentage. Owing to the use of microcentrifuge tubes instead of hematocrit tubes, our hematocrit values are higher than those observed in other experiments on pumpkinseed fish (Borowiec et al., 2016; Davies et al., 2011), but they are consistent and comparable within this study. Additionally, owing to difficulties with blood collection, only three individuals were successfully sampled for infected and uninfected groups on Day 3. Following blood collection, the fish was euthanized in a 3% eugenol solution for 15 seconds and then frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$  until later dissection.

### *Metabolic rate and $P_{crit}$ calculations*

MMR, SMR and background consumption rates were measured in R Studio v.2023.03.0+386 (R Foundation for Statistical Computing 2023). Oxygen uptake ( $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) was estimated using the slopes obtained from the linear regression between time and oxygen concentration. The first and last 30 seconds were excluded from the 4 minutes of closed chambers to ensure water was well-mixed and to reduce variability. All the closed chambers slopes for the 16-22 hours were calculated for each individual and the lowest 0.1 quantile was used to estimate SMR (minimum 70 slopes) (Reemeyer and Rees, 2019). The highest rate of oxygen consumption was calculated over 60s following the chase trial, excluding the first 30 seconds, that rate was used to estimate MMR

(Harianto et al. 2019). Absolute AS was calculated as the difference between MMR and SMR, and factorial AS was calculated by dividing MMR by SMR (Clark et al., 2013).

$P_{crit}$  was calculated from the  $\dot{M}O_2$  versus water  $PO_2$  curves generated during the progressive hypoxia exposures as  $PO_2$  fell from normoxia to  $PO_2$  of LOE. The data points for these curves were calculated as the mean  $\dot{M}O_2$  value for each minute of data collection, plotted as a function of the median water  $PO_2$  value over that same minute. An individual's  $P_{crit}$  was calculated using its SMR as a benchmark  $\dot{M}O_2$ , where the  $P_{crit}$  was identified as the first  $\dot{M}O_2$  data point that was 4% lower than the SMR value. This method was based on the mean variability around the SMR values, and the methods reported in McBryan et al. (2015).  $P_{crit}$  was initially expressed as an oxygen concentration ( $mg\ O_2\ L^{-1}$ ) and then converted to partial pressure (kPa) using the Loligo online oxygen converter (Loligo Systems Aps, Denmark, 2023) with the median temperature of each hypoxic experiment, the atmospheric pressure at the station (~400 m altitude) and the oxygen concentration obtained. LOE was converted to kPa using this same method.

### *Fish dissections*

In September 2022, frozen fish were thawed and measured for mass, length, and parasite load. A count for blackspots and cysts on the fin and on both sides of the fish was done. Liver, spleen, and the digestive tract were dissected and inspected under a dissecting microscope to assess endoparasite presence and skeletal muscle were dissected to assess cyst presence.

### *Data analyses and statistics*

All data were analyzed with Graphpad Prism 10 v.10.1.0 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), 2023). Two-way ANOVA's were used to analyse the two main effects of treatment and time post infection (in this order) on different response variables. An interaction between these factors was also included in all models.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant in these tests. SMR and MMR values were mass-specific for each individual.

$$\frac{\dot{M}O_2}{mass} = mass\ specific\ \dot{M}O_2$$

SMR,  $P_{crit}$  and lactate concentration did not meet variance assumption of the model. A  $\log_2$  transformation was performed and models were run on the transformed data. MMR, AS, factorial AS, LOE and hematocrit met the assumptions of the ANOVA. When there was a significant effect of time post-infection, a Tukey post-hoc multiple comparison was performed.



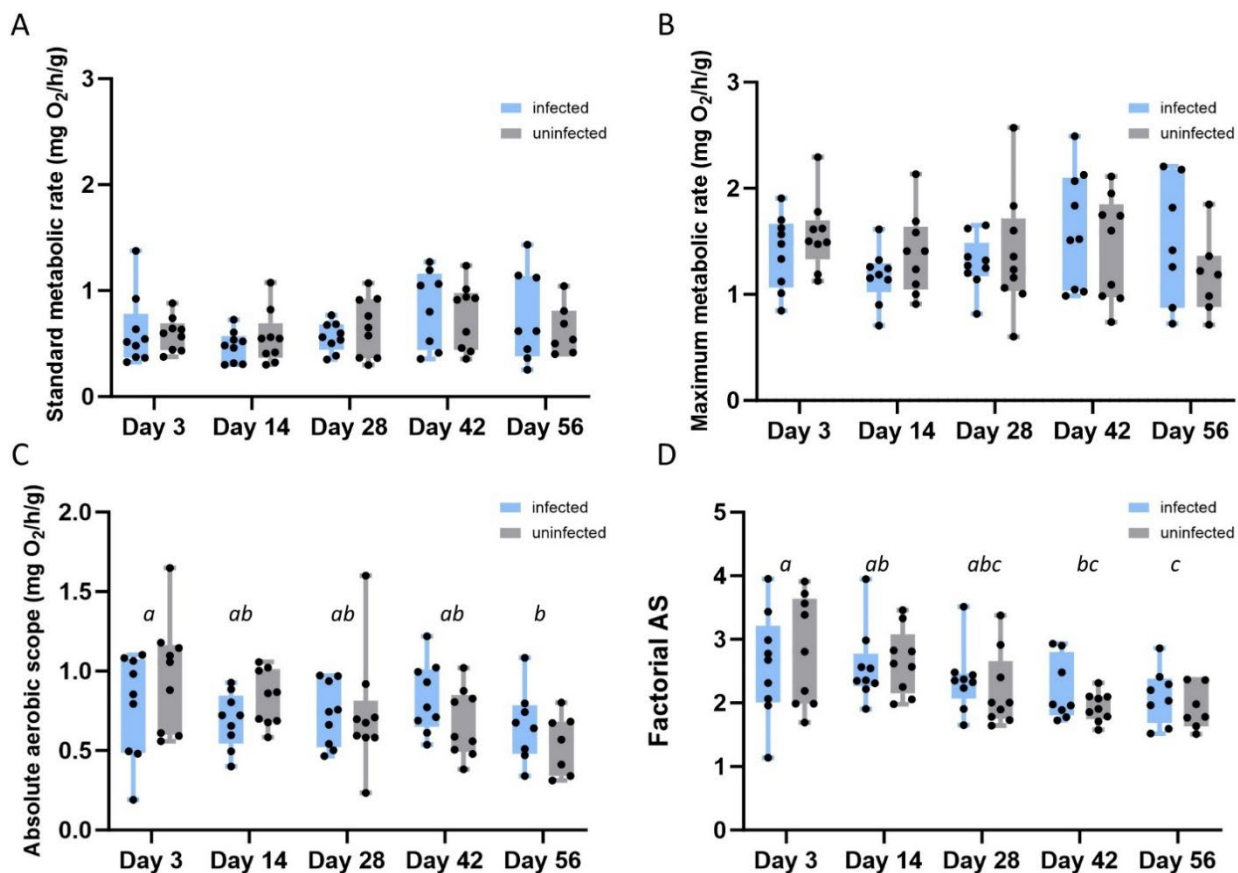
## Results

### *Metabolic rate and aerobic scope*

Standard metabolic rate was not affected by infection treatment (Table I,  $P=0.81$ ) or days post-exposure (Table I,  $P=0.077$ ), where mean SMR across all post-exposure sample days for the infected fish was  $0.64 \pm 0.31 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ , as for the uninfected fish was  $0.65 \pm 0.26 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$  (Fig. 2.1A). Similarly, MMR was not affected by either infection treatment (Table I,  $P=0.92$ ) or days post-exposure (Table I,  $P=0.31$ ), where mean MMR across all post-exposure sample days for the infected fish was  $1.39 \pm 0.42 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ , and for the uninfected fish was  $1.42 \pm 0.46 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$  (Fig. 2.1B). Absolute and factorial AS were not affected by infection treatment (Fig. 2.1C; Table I,  $P=0.31$  for absolute AS,  $P=0.31$  for factorial AS), but they were affected by days post-exposure, where absolute AS mean for all fishes on Day 56 was significantly lower than on Day 3 (Fig. 2.1C) and factorial AS means for all fishes on Day 56 and on Day 42 were significantly lower than the mean on Day 3 (Table I,  $P_{3\text{vs}42} = 0.017$ ,  $P_{3\text{vs}56}=0.010$ ). In addition, Day 42 was significantly lower than the factorial AS of Day 14 (Fig 2.1D, Table I,  $P_{14\text{vs}56}=0.031$ ).

Table 2.1 Results of two-way Anovas testing the effect of the treatment group and the day of experiment on SMR, MMR, absolute AS, factorial AS, Pcrit, LOE, Lactate and Hematocrit and in sunfish from Lake Cromwell ( $N_{\text{treatment}}=43$ ,  $N_{\text{day of experiment}}= 9$ )

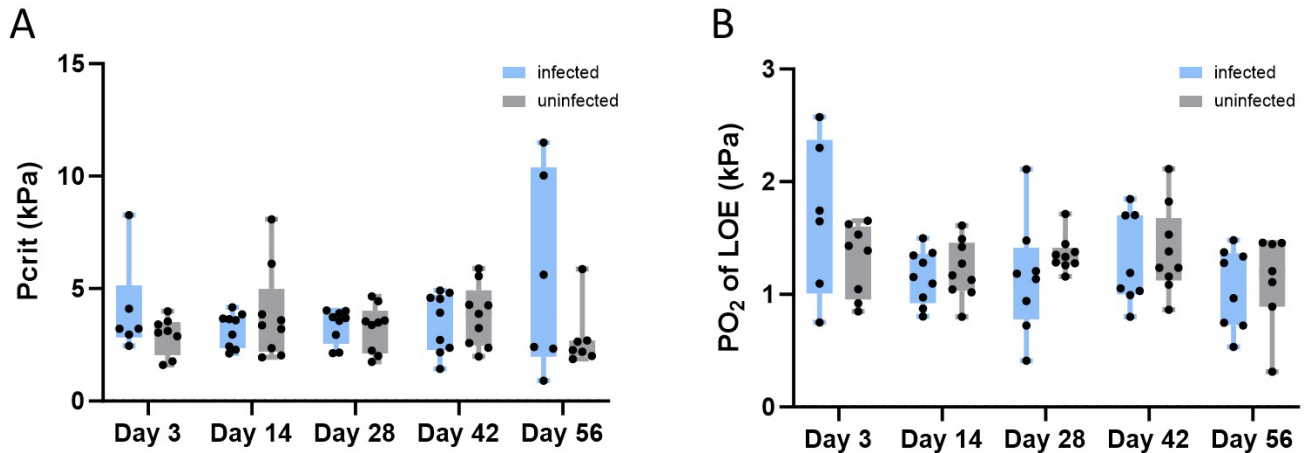
	DF	F-value	P-value
<b>SMR</b>			
Interaction	4	0,202	0,937
Treatment	1	0,056	0,814
Day of experiment	4	2,202	0,077
<b>MMR</b>			
Interaction	4	1,218	0,31
Treatment	1	0,008	0,929
Day of experiment	4	1,128	0,35
<b>Absolute AS</b>			
Interaction	4	1,609	0,181
Treatment	1	0,029	0,864
Day of experiment	4	2,519	<b>0,048</b>
			<b>Day 3 vs. Day 56</b>
			<b>0,02</b>
<b>Factorial AS</b>			
Interaction	4	0,549	0,7
Treatment	1	0,288	0,593
Day of experiment	4	4,883	<b>0,002</b>
			<b>Day 3 vs. Day 42</b>
			<b>0,017</b>
			<b>Day 3 vs. Day 56</b>
			<b>0,01</b>
			<b>Day 14 vs. Day 56</b>
			<b>0,031</b>
<b>Pcrit</b>			
Interaction	4	0,962	0,434
Treatment	1	1,169	0,283
Day of experiment	4	0,072	0,99
<b>LOE</b>			
Interaction	4	1,259	0,294
Treatment	1	0,014	0,908
Day of experiment	4	2,371	0,061
<b>Hematocrit</b>			
Interaction	4	0,136	0,969
Treatment	1	0,478	0,492
Day of experiment	4	3,863	0,008
			<b>Day 3 vs. Day 56</b>
			<b>0,034</b>
			<b>Day 28 vs. Day 56</b>
			<b>0,01</b>
<b>Lactate</b>			
Interaction	4	0,261	0,902
Treatment	1	0,039	0,844
Day of experiment	4	1,242	0,301



**Figure 2.2.** Measurements of standard metabolic rate (A), maximal metabolic rate (B), and calculated absolute (C) and factorial (D) aerobic scopes for pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) as a function of days post-experimental infection with (*Apophallus sp.* and *Uvulifer sp.*) (blue bars) or uninfected (grey bars). Bars span from the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values.

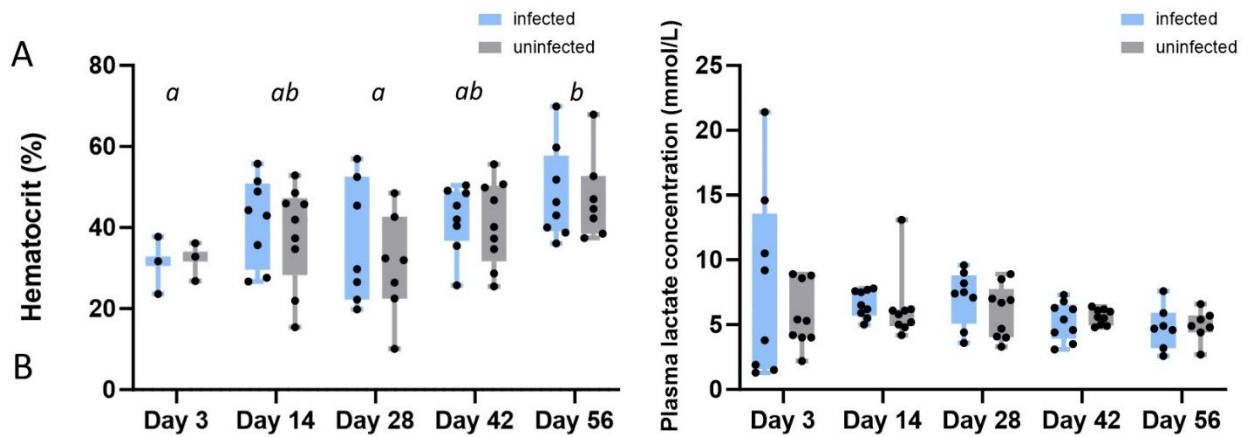
### *Hypoxia tolerance metrics and underlying characteristics*

$P_{crit}$  was not affected by infection treatment (Figure 2.3.A,  $P=0.28$ ) or by day of exposures (Figure 2.3.A,  $P=0.99$ ) and mean values for all post-exposure sample days from the infected group was  $3.83 \pm 2.04$  kPa and  $3.39 \pm 1.39$  kPa for the uninfected group. Similarly, the PO<sub>2</sub> of LOE was not affected by infection treatment (Figure 2.3.B,  $P=0.13$ ) or by days post-exposure (Figure 2.3.B,  $P=0.76$ ).



**Figure 2.3.** Measurements of  $P_{crit}$  (A) and LOE (loss of equilibrium) for pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) as a function of days post-experimental infection with (*Apophallus sp.* and *Uvulifer sp.*) (blue bars) or uninfected treatment (grey bars). Bars span from the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values.

Hematocrit was not affected by infection treatment (Figure 2.4.A,  $P=0,49$ ), however a significantly higher mean was observed at Day 56 compared with Day 3 (Figure 2.4.A,  $P=0,034$ ) and Day 28 (Figure 2.4.B,  $P=0,010$ ). Plasma lactate concentration was not affected by infection treatment (Table I,  $P=0.84$ ) or days post-exposure (Table I,  $P=0.30$ ; Fig 2.4 B).



**Figure 2.4.** Measurements of hematocrit (A) and plasma lactate concentration for pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) as a function of days post-experimental infection with (*Apophallus sp.* and *Uvulifer sp.*) (blue bars) or uninfected treatment (grey bars). The method used to estimate hematocrit overestimates the concentration observed. Bars span from the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile and whiskers span maximum and minimum values. Black circles represent individual values.

## Discussion

We hypothesized that parasite infection will reduce the hypoxia tolerance and aerobic scope (AS) of fish by increasing the SMR. We tested this hypothesis by experimentally infecting pumpkinseed sunfish, a freshwater species native to eastern North America, with trematodes (*Apophallus sp.* and *Uvulifer ambloplitis*) causing the blackspot disease and comparing characteristics related to energy metabolism and hypoxia tolerance to those of fish from an uninfected control group at five time points up to 56 days following infection. This hypothesis predicted that infection, through activation of an immune response, would increase oxygen demand in infected individuals, raising their SMR and subsequently their  $P_{crit}$  values, thereby reducing their hypoxia tolerance. Furthermore, because MMR was expected to be unaffected by infection, the elevated SMR would reduce the AS for activity among infected individuals. Based on previous results (Lemly and Each 1984), we predicted these effects to peak approximately 25 days post-infection and return to baseline levels by 56 days post-infection. However, contrary to these predictions, we found that neither parasite infection nor time post-infection significantly affected any of our measured variables. The exception was AS and hematocrit, where we found a few small effects of time but not parasite infection.

### *Metabolic rate and aerobic scope*

We found that SMR was unaffected by infection treatment and days post-exposure. This was contrary to our hypothesis, which predicted SMR would increase in the infected fish until the point of encystment around day 28 (Berra and Au, 1978; Lemly and Esch, 1984), at which point the immune response and its associated metabolic cost would decrease, thereby returning SMR to typical baseline levels. This did not occur in our fishes. Instead, SMR remained consistent throughout the 56 days post-infection for both our infected and control groups. A possible reason for this observation may involve a reallocation of resources in the infected individuals. Whole-body SMR is a highly complex phenotype made manifest by myriad underlying processes spanning multiple levels of biological organization. This is made more complex by parasite infection, which triggers an immune response and elevated stress levels (Allan et al., 2020). To help power this response to infection, energy resources could be redirected from other processes.

For example, parasite infection in fishes has been shown to reduce energy-intensive processes such as growth, locomotion, and activity levels (Schultz et al., 2006; Slavik et al., 2017). In this study, slight but non-significant differences in mass were observed throughout different experimental time groups, mass being slightly lower in group 42 and 56 than precedent groups (Table A1). The whole-animal respirometry used in this study is unable to determine which underlying processes the oxygen taken up by the animal is supporting. However, it is possible that, in our infected fish, the energy supplying these or other processes contributing to SMR was redirected towards an immune response, especially during the early phases of infection when stress levels and the immune response are typically highest (Bullard and Overstreet, 2008; Emly and Esch, 1984; Nardocci et al., 2014). Another possible contributor is stress, which in fishes has been shown to suppress the immune response to infectious diseases in aquaculture (Nardocci et al., 2014). Even though short-term stress induced from parasitic infection can be beneficial for the hosts' ability to counter the infection, it is difficult to identify the effects of different source of stress on parasite-related immune responses, some of which can become chronic. It is possible that stress in our fish induced from captivity and from the experimental manipulation may have caused chronic stress, which has been observed to suppress the immune response (Barber, 2007, Fast et al., 2008). Furthermore, pumpkinseed are social fish, therefore they can experience stress when they are in small groups. After day 42, only three fish remained per tank, and because of mortality, some fish ended up being alone until the experimentation on day 56. Stress from isolation might have been experienced by these fish (Blanckenhorn, 1992). In any case, the complexity of SMR coupled with the complexity of parasite infection may underlie the variable metabolic responses observed among parasite-infected fishes, with some displaying increased SMR (Hvas and Bui, 2022; Bashir-Tanoli and Tinsley, 2014), others displaying decreased SMR (Caballero et al., 2015; Ryberg et al., 2020), and, in our case, no change in SMR.

Experimental infection with trematodes did not affect MMR. Like with SMR, MMR responds variably to parasite infection, with some studies showing a decrease in MMR due to organ damage and increased osmotic regulation efforts (e.g. Bruneaux et al., 2017; Careau et al., 2012; Hvas et al., 2017), others showing an increase in MMR thought to offset the costs of immune responses to preserve AS (e.g. Hvas and Bui, 2022; Bonneaud et al., 2016), and still others show no effect of

infection on MMR (e. g. Hahn et al., 2018; Thambithurai et al., 2022). This variability in the effect of infection on MMR is likely due to the parasite-specific effects on hosts. For example, parasites that are associated with reduced MMR tend to infect host internal organs. In salmonids, *Tetracapsuloides bryosalmonae* infection causes proliferative kidney disease, significantly decreasing MMR (Bruneaux et al., 2017). Parasitic infections with no apparent effect on host' MMR tend to be an indicator of the host resiliency to parasite infection and manage to preserve AS (Hahn et al., 2018; Thambithurai et al., 2022). In our case, the black spot disease did not impact MMR. Black spots encyst predominantly in muscle or epithelium tissues (personal observation), with minimal damage to other internal organs. The severity of infection could also help explain discrepancies in the literature. Indeed, the intensity of black spot infection in our study (median of 26 blackspots per infected fish) was much lower than that reported in previous studies on the same populations (median counts of 115 Thambithurai et al., 2022). A threshold value of 50 blackspot has been found as the parasite load where a negative effect on metabolic rates is observed (Lemly and Esch, 1984) Thus, despite the lack of effects on MMR observed here, it is possible that higher infection loads and/or different known locations of possible encysment (e.g., gills) could negatively impact MMR. Gills impairment due to parasite infection could compromise the ability of the animal to retrieve oxygen from its environment and increase MMR as a potential compensatory response to the infection as seen in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) infecting juvenile brown trout (*Salmo trutta*) (Filipsson et al., 2017).

Consistent with the lack of effect on SMR and MMR but contrary to what our hypothesis predicted, AS was unaffected by infection treatment and largely unaffected by days post-exposure, though there were some subtle yet consistent effects of time. Specifically, AS, both absolute and factorial, tended to decrease slightly over time, with fish at Day 56 post-exposure displaying lower AS than fish at Day 3 post-exposure. This effect was observed in both infected and uninfected fish, though more pronounced for uninfected fish, and is the result of a gradual yet statistically non-significant increase in SMR and decrease in MMR over the 56 days. It is possible that fish loose AS the longer they spend in captivity. In laboratory condition, fish have restricted swimming space, are fed at predictable times and therefore they do not need to spend energy foraging and are not frequently subject to environmental stressors (e.g. predators, wind-driven waves, currents) that



require movement (Houlihan and Mathers, 1985; Palstra and Planas, 2011). In the wild, fish spend energy and exercise regularly through these routine efforts, enabling them to maintain high performance and AS. Long period spent in captivity can reduce these training effects on individuals and reduce their AS (Turko et al., 2023; Wegner et al., 2018; Sneddon et al., 2016). Another possible reason for these changes could be due to seasonal effects. For example, while water temperature was maintained at 20°C over the 56 days, the photoperiod in the laboratory followed the natural photoperiod between late July and mid-September. Photoperiod is among the most important factors influencing the biological rhythms of freshwater fish (Hontela and Stacey, 1990; Oliveira et al., 2009). However, for pumpkinseed, SMR tends to decrease as the photoperiod shortens from summer to fall (Evans, 1984), which is the opposite of what we observed. Interestingly, body mass, lightly decreased gradually over the 56 days, although this trend was not statistically significant (see A1). Body mass has a large influence on metabolic rate, with lighter individuals having a higher mass-specific SMR (Killen et al., 2016; Killen et al., 2010). Thus, it is possible that the gradually decreasing average of body mass used on different fish group from different day of experimentation led to gradually increasing mass-specific SMR values.

#### *Hypoxia tolerance characteristics*

We measured hypoxia tolerance using two common metrics,  $P_{crit}$  and  $PO_2$  of LOE.  $P_{crit}$  is the lowest  $PO_2$  at which the fish can maintain SMR aerobically and thus represents the combined effect of multiple mechanisms related to aerobic metabolism to tolerate hypoxia (Ultsch and Regan, 2019).  $PO_2$  of LOE, which is always lower than  $P_{crit}$ , is the  $PO_2$  at which the fish loses dorso-ventral equilibrium in the water column and thus represents the most hypoxic  $PO_2$  that the fish can tolerate using not only the aerobic mechanisms captured by  $P_{crit}$ , but also its capacities for anaerobic glycolysis and metabolic depression (Ultsch and Regan, 2019). Thus, the two metrics are related but different.

Contrary to what our hypothesis predicted but consistent with our SMR results,  $P_{crit}$  was unaffected by infection treatment and days post-exposure. In other words, all fish regardless of infection status or time could maintain SMR aerobically down to the same hypoxic  $PO_2$ , meaning they had similar capacities to take up and use oxygen in hypoxic water. An example of a

contributor to this is hematocrit, a proxy for red blood cells count and hemoglobin concentration in the blood, thus representing the capacity to transport and deliver oxygen to the tissues (Borowiec et al., 2015). Elevated hematocrit levels are associated with improved capacities to transport oxygen and mitigate the effect of hypoxia (Dabruzzi and Bennet, 2014; Nilsson, 2007). We observed no differences in hematocrit between our infected and uninfected groups, which is consistent with their similar average  $P_{crit}$  values. The main factor driving the lack of difference in  $P_{crit}$ , however, was the lack of difference in SMR among our infection and time groups. Resting rates of metabolism, be they SMR or RMR, are major influencers of  $P_{crit}$  in fishes, where lower resting metabolic rates inherently beget lower  $P_{crit}$  values (Pörtner and Lannig, 2009; Mandic et al., 2009; Roger et al., 2016; Ultsch and Regan, 2019). In other words, higher oxygen demands are more difficult to maintain in  $O_2$ -poor water than are lower oxygen demands. Thus, the similar SMR values of our fish across the different treatment groups is consistent with their similar  $P_{crit}$  values.

As well as displaying similar  $P_{crit}$ , all fish regardless of time or infection status displayed similar  $PO_2$  of LOE, indicating parasite infection did not impact their tolerance of severe (i.e., sub- $P_{crit}$ ) hypoxia. As mentioned above, survival at sub- $P_{crit}$   $PO_2$  requires a reliance on anaerobic glycolysis. A metric of this reliance is the concentration of lactate in the blood because, as the end-product of anaerobic glycolysis, lactate's accumulation in the blood is directly proportional to reliance on anaerobic glycolysis. Given this and the fact that all our fish displayed similar values for  $P_{crit}$  and  $PO_2$  of LOE, one would predict a similar accumulation of lactate (Virani and Rees, 2000; Milligan and Wood, 1986), and this is indeed what we observed. In other words, parasite infection seemingly did not affect the fish's capacity to employ anaerobic metabolism in severe hypoxia. However, it is possible that infection impacted the amount of time tolerated at sub- $P_{crit}$   $PO_2$ , as the time to reach LOE from  $P_{crit}$  varied depending on each individual's  $\dot{M}O_2$ . It is also possible that different types of parasite infection could influence the use of anaerobic glycolysis. The liver, which is important for glycogen storage and lactate processing (Sheridan, 1988; Melo et al., 2016), is an organ that can be directly impacted by parasites. For example, the cestode *Proteocephalus ambloplitis* (bass tapeworm) is an endoparasite that infects the liver of freshwater fishes, including pumpkinseed (R.C., personal observations; Bosschaerts et al., 2009; Daly et al.,

2006; Guitard et al, 2022), causing the liver to be damaged, swollen and filled with parasite. In theory, this could reduce the liver's capacities for glycogen storage and/or gluconeogenesis, thus reducing the overall capacity for anaerobic glycolysis and diminishing hypoxia tolerance as a result. But this has not yet been studied.

#### *Experimental infection methodology*

Although there are many biological reasons that can explain the lack of differences in aerobic metabolic traits observed between infected and uninfected groups, it is possible that, to some extent, our results are influenced by the experimental infection protocol. This protocol, in terms of the number of cercaria used and the time each fish spent in the presence of the cercaria, was developed based on previous experimental parasite infection protocols that have been shown to be successful for the same species of parasite. These protocols used *Uvulifer ambloplitis* and/or *Apophallus* on the same fish *Lepomis gibbosus* (Levet et al., in prep) or a congeneric species; *Lepomis macrochirus* (Lemly and Esch, 1984). It is possible that, had we used more cercaria and/or left the fish in the presence of the cercaria for longer, the infection load would have been higher. The potential effects of infection on the measured variables might have been more visible since the results from Lemly and Esch (1984) showed an effect of parasite load on metabolic traits with a cercaria threshold of 50. It would be useful to quantify infection load among our fishes, but this is not possible in part because accurately generating a pre-experimental infection count on our wild-caught fish is difficult. Even though praziquantel was used before the experimental infection and is reported to be highly effective against endoparasite (Hoai and Van, 2014), praziquantel is mostly effective on parasite in development and not encysted parasite. Because of the latency of the cyst development of these trematodes, we are not able to establish the efficiency of the praziquantel treatment against trematode in the process of encysting or already encysted. It is therefore harder to quantify how successful the experimental infection was and establish a parasite count, especially on early post infection time groups. It would be necessary to duplicate this protocol on fish known to be parasite-free at the time of exposure to reliably quantify experimental infection load.

### *Implications/Significance*

In the context of global change, our results provide evidence that pumpkinseed may harbour some resilience to projected simultaneous increases in parasite infection and hypoxia prevalence. The generality of this resilience will of course be influenced by factors such as parasite species, infection load and hypoxia dynamics. It will also be influenced by water temperature, which was held constant in our study even though it is increasing globally. Temperature has a direct impact on oxygen availabilities in lakes, on ectotherms whether its the parasite, the aquatic snails, or the fish, on the limnology of the lakes and more. Thermal tolerance can affect positively (McBryand et al., 2016) or negatively hypoxia tolerance of fish (Evans, 1984). Predicting the effect of parasitic infection to the complex link between thermal tolerance and hypoxia tolerance is difficult with our actual knowledge. Further research including the impact of temperature on hypoxia tolerance and the extra layer of impact from a parasitic infection would be interesting future research. They would be necessary before concluding that pumpkinseed sunfish are unattainable from climate changes impacts.

## **Acknowledgements**

We acknowledge the traditional lands of the Kanien'kehá: ka, Omàmiwinini, and Anishinabewaki First Nations on which the field and laboratory work for this project took place. We thank the staff of the Station de biologie des Laurentides (SBL) de l'Université de Montréal, Gabriel Lanthier, George-Étienne Charette and Louis-Philippe Beauchamp for helping with experimental set-up. We thank Laurie Provençal, Esther Lanaspá for help on the field and for the dissection.

RC is funded by the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies, the J.A. DeSève Foundation. SAB is funded by NSERC Discovery and the Canada Research Chair Programs. MDR is funded by NSERC, the Canadian Space Agency and the Canada Foundation for Innovation.

## Chapitre 3 – Conclusion Générale

Les recherches effectuées dans ce projet permettent d'avancer nos connaissances sur certains des enjeux vécus par le crapet-soleil. Le réchauffement climatique entraîne de nombreuses conséquences directes par la hausse des températures, mais également indirectes par l'augmentation des taux métaboliques d'espèces ectothermes ou encore l'augmentation de zones hypoxiques dans les lacs. Les parasites, des espèces omniprésentes dans les réseaux trophiques, sont également affectés par ces changements, il est donc nécessaire de continuer à étudier les relations hôtes-parasites pour mieux comprendre ces réseaux. Nos résultats sont prometteurs quant à la stabilité de la relation entre les trématodes causant la maladie du point noir et le crapet-soleil. La résilience des crapets-soleil face à certaines des conséquences du changement climatique semble prometteuse, mais les milieux naturels en continuel changement rendent nécessaires des recherches complémentaires.

Le premier but de ce projet était de vérifier l'hypothèse stipulant que l'infection parasitaire aurait un impact négatif sur la tolérance hypoxique et sur la portée aérobie, donc le métabolisme aérobie, et que cet effet serait fluctuant selon le temps post-infection. Cette hypothèse a été testée en réalisant des expériences de respirométrie 5 fois sur une période de 56 jours le SMR, le MMR et également l'AS sur un groupe de poissons infectés expérimentalement et sur un groupe de poisson non-infectés.

Nous nous attendions à mesurer une hausse du taux métabolique standard du crapet-soleil à cause de l'infection expérimentale, dès le 3<sup>e</sup> jour post-infection et atteignant un maximum après 25 jours suivant l'infection. Le taux métabolique attendu au jour 3 aurait été plus élevé que sans infection à cause du stress dû à l'infection et de la réaction immunitaire initiale du poisson causée par celle-ci (Allan et al., 2020). Par la suite, le développement des cercaires, entraînant des dommages physiques et une activation du système immunitaire de l'hôte, causerait une augmentation du SMR atteignant un maximum après soit 14 ou 28 jours. Le taux métabolique des individus infectés redescendrait par la suite au jour d'expérimentation 42 et 56 une fois que les parasites sont dans un état de dormance, enkystés (Hunter et Hamilton, 1941). Ces prédictions n'ont pas été observées, aucun effet de l'infection parasitaire n'a été observé sur le métabolisme,

et ce peu importe le nombre de jours post-infection L'absence de différences significatives entre les taux métaboliques selon le temps post-infection est probablement due à la complexité des mécanismes sous-jacents de l'allocation d'énergie, qui diffère entre les individus d'une même population dû aux différences inter-individuelles (Berra et Au, 1978). Une allocation différente d'énergie dans certains processus biologiques peut s'avérer difficilement identifiable. Une autre explication possible de l'absence de différence entre le SMR des groupes infectés et non infectés est le stress, qui aurait pu survenir chez les individus pendant la captivité, indépendamment de leur statut infectieux. Par exemple, l'alimentation en groupe peut déclencher une réponse de stress chez les poissons (Barber, 2007). Des études antérieures comparant des poissons infectés dans leur habitat naturel par rapport à des poissons en laboratoire ont montré une réduction de la condition corporelle et/ou des taux de croissance parmi les individus infectés en laboratoire (Gauldie et Jones, 2000 ; Ward et al., 2005). Aucune différence significative de masse ou de croissance n'a été observée dans cette étude (Tableau A1). Le stress de la captivité pourrait entraîner, à long terme, un stress chronique et ainsi supprimer la réponse immunitaire. Les niveaux de SMR seraient élevés en raison du stress nutritionnel induit par la captivité, mais aucune augmentation due à l'infection ne serait observée, et par conséquent, aucune différence ne serait observée entre les poissons infectés et non infectés (Barber, 2007; Fast et al., 2008).

Aucun effet du parasitisme n'a également été observé quant au taux métabolique maximal comme le stipulait notre hypothèse. Nous suspectons alors une absence d'impact de ces parasites sur la cascade de transport de l'oxygène dans l'individu lui permettant de produire, transporter et stocker de l'oxygène. Nous suspectons également une absence de dommage des trématodes sur les organes vitaux du crapet-soleil, car ce sont pour ces raisons dans la littérature que les parasites causent une diminution sur le taux métabolique maximal (Bruneaux et al., 2017; Careau et al., 2012).

La portée aérobie n'a pas été affectée par l'infection parasitaire, mais un petit effet significatif du temps démontre une portée aérobie légèrement plus faible pour le jour d'expérimentation 56 que pour les jours d'expérimentation 3 et 14. Ceci est contraire à ce que nous nous attendions puisqu'une élévation prévue du SMR jumelée à une absence d'effet sur le MMR était attendue. Ce qui correspond à une baisse de l'AS normal. Nos résultats démontrent que le parasitisme n'affecte

pas le SMR ni le MMR donc n'affecte pas l'AS. Il est invariablement préférable pour une espèce de préserver son AS afin de maintenir un niveau d'activité régulier et contribuer à sa croissance et sa reproduction (Bruneaux et al., 2017; Guderley et Pörtner, 2010). L'absence d'effet du parasitisme sur l'AS démontre la capacité énergétique de l'hôte pour contrer l'infection parasitaire en investissant de l'énergie dans la réponse immunitaire (Castro et al., 2013). La baisse observée du AS lors des jours d'expérimentations tardifs dans la saison peut être expliquée par le changement de saison. Le jour 56 d'expérience ayant lieu en mi-septembre, des diminutions des taux aérobies sont à prévoir avec la fin de l'été et l'approche de l'hiver à cause de la différence de la photopériode (Hontela et Stacey, 1990; Oliveira et al., 2009; Evans, 1984). La capacité d'un individu à répondre à une infection parasitaire semble dépendante de la portée aérobie de celui-ci. La préservation de l'AS observé dans notre étude démontre probablement l'habilité des poissons infectés à contrer l'infection parasitaire en activant leur système immunitaire. Néanmoins, une limite d'interprétation est présente à cause de l'incapacité à vérifier l'amplitude de l'efficacité de l'infection expérimentale dû aux complications du dénombrement de la charge parasitaire avant et après le traitement parasitaire. Cependant, plusieurs recherches suggèrent que des réponses physiologiques et comportementales peuvent être observées après une exposition de parasites, que celle-ci soit concluante ou non (Lopes, 2023; Vindas et al., 2022; Lopes, 2022).

Le deuxième but de ce projet était de vérifier l'hypothèse stipulant que l'effet du parasitisme diminuerait la tolérance hypoxique. Cette hypothèse a été testée en réalisant des expériences d'hypoxie critique en mesurant les valeurs de  $P_{crit}$  et la  $PO_2$  du LOE sur un groupe de poissons infectés expérimentalement et sur un groupe de poisson non-infectés expérimentalement cinq fois sur une période de 56 jours.

Ces deux variables sont interreliées, mais différentes. Le  $P_{crit}$  témoignant la limite du système aérobie et LOE la limite du mécanismes anaérobies. Ces variables sont importantes quant à la glycolyse anaérobie et la dépression métabolique (Ultsch et Regan, 2019). Au contraire de mon hypothèse, mais en concordance avec nos résultats quant au SMR,  $P_{crit}$  n'a pas été affecté ni par l'infection expérimentale ni par la durée post-infection. En d'autres mots, l'expérimentation n'a pas eu d'effet et les individus ont su maintenir le SMR aérobiquement jusqu'à la même concentration partielle d'oxygène en situation hypoxique. Un indicateur pour cette observation est



le taux d'hématocrite représentant le compte de globules rouges et la concentration d'hémoglobine dans le sang, directement proportionnel à la capacité de transport et de délivrer l'oxygène aux tissus (Borowiec et al., 2015). De haut taux d'hématocrite témoignent d'une capacité forte de ce transport d'oxygène et mitigent les effets de l'hypoxie (Dabruzzi et Bennent, 2014; Nilsson, 2007). Aucune différence du taux d'hématocrite n'a été observée entre les poissons infectés et non-infectés. Le facteur le plus influençant quant à l'absence de différence significative du  $P_{crit}$  entre les groupes expérimentaux est l'absence de différence de SMR entre les individus infectés et non-infectés. L'effet du SMR est indéniable sur le  $P_{crit}$  puisqu'un SMR plus faible diminue nécessairement la valeur de  $P_{crit}$  (Pörtner et Lannig, 2009; Metic et al., 2009; Roger et al., 2016; Ultsch et Regan, 2019). En d'autres mots, il est moins limitant d'avoir une faible demande en oxygène dans des milieux pauvres en oxygène que d'avoir une forte demande.

En plus de valeur de  $P_{crit}$  semblables entre les groupes, les valeurs de  $PO_2$  of LOE étaient également similaires démontrant que l'infection n'a pas eu d'impact sur la tolérance à des concentrations critiques (sous- $P_{crit}$ ) d'hypoxie. Cette tolérance dépend uniquement de la glycolyse anaérobie. Un indicateur de ce mécanisme est la concentration de lactate s'accumulant dans le sang, puisque le lactate est un dérivé proportionnel de la glycolyse anaérobie. Des valeurs de LOE semblables devraient donc induire des valeurs de lactate semblables (Virani et Rees, 2000; Milligan et Wood, 1986) et c'est ce qui a été observé. L'infection parasitaire n'a donc pas impacté la capacité d'un individu à employer son métabolisme anaérobie à des concentrations d'hypoxie sévère. Ces résultats sont supportés par les valeurs de  $P_{crit}$  et de LOE observées chez le crapet-soleil et dans la littérature (Crans et al., 2015). Ces valeurs sont très faibles et témoignent d'une grande résistance du crapet-soleil face à l'hypoxie et également face au parasitisme. L'une des raisons du développement de cette tolérance chez cette espèce est probablement liée aux hivers nord-américains. Ces hivers froids recouvrent de glace plusieurs des lacs logeant le crapet-soleil. Cette plaque de glace limite les échanges gazeux avec l'atmosphère, diminuant les taux d'oxygène des lacs. Ceci est encore plus vrai pour les lacs eutrophes où la décomposition des plantes diminue également les taux d'oxygènes (Davis et al., 2020). Cette hypoxie saisonnière explique partiellement la capacité des crapets-soleil à tolérer l'hypoxie (Vornanen et al. 2009, Yang, 2022).

Une autre stratégie utilisée par certains poissons d'eau douce pour faciliter leur survie à des valeurs  $PO_2$  inférieures au  $P_{crit}$  est la dépression métabolique, qui consiste en une réduction significative du taux métabolique et du métabolisme en dessous du SMR par le biais de réductions de l'utilisation de l'énergie au niveau cellulaire (van Ginneken et van den Thillart, 2009 ; Richards, 2009 ; Regan et al., 2017). Cela permet au poisson de mieux équilibrer les taux d'utilisation de l'énergie avec les taux réduits de prélèvement d'énergie inhérents à une hypoxie sévère. Ce ne sont pas toutes les espèces de poissons qui sont capables d'induire des états durables de dépression métabolique, et le crapet-soleil n'a jamais été étudié à cet égard. Les espèces capables de dépression métabolique ont tendance à être indigènes d'environnements hypoxiques particulièrement sévères (Mandic et Regan, 2019), y compris les lacs qui gèlent en hiver (Vornanen et al., 2009 ; Regan et al., 2017b), similaires aux milieux naturels du crapet-soleil en Amérique du Nord. Il est donc possible que cette espèce puisse induire une dépression métabolique en cas d'hypoxie sévère, mais cela n'a jamais été étudié, tout comme l'effet de l'infection parasitaire sur la capacité à utiliser la dépression métabolique. Ce sont des domaines intéressants pour des recherches futures.

Un autre facteur pertinent concerne la réponse métabolique et la tolérance à l'hypoxie des parasites eux-mêmes, ainsi que de leurs autres hôtes intermédiaires. Les cycles de vie des parasites sont complexes et impliquent plusieurs hôtes, et ceux-ci peuvent également être affectés par l'hypoxie. Certains états libres du parasite et les parasites enkystés ont déjà montré une évolution pour résister à un environnement hypoxique (Tarbia et al., 2016 ; Goto et al., 2013). En revanche, certains parasites mettent plus de temps à éclore et ont un développement larvaire plus long dans des conditions hypoxiques (Fischer, 1963). Certaines recherches utilisent les parasites ou les hôtes intermédiaires comme bioindicateurs pour établir le stress environnemental des poissons. Certains parasites ou hôtes intermédiaires démontrent une sensibilité plus élevée aux facteurs de stress environnementaux que leurs hôtes (Landsberg et al., 1998). Le déplacement des escargots aquatiques pourrait être un facteur important affectant les cycles des parasites. De nombreux parasites à cycle complexe ont des escargots aquatiques comme hôtes intermédiaires. Des études ont montré que la charge parasitaire chez les poissons était proportionnelle à la répartition des escargots dans le lac. Certains escargots moins tolérants à l'hypoxie se retrouvent que dans des parties plus normoxiques des lacs, causant une absence de parasitisme lié à ces escargots dans les

zones hypoxiques où ceux-ci ne se retrouvaient pas. Ainsi, être tolérant à l'hypoxie pourrait évoluer pour devenir un trait avantageux pour les poissons afin d'éviter certains parasites (Landsberg et al., 1998).

### *Implication biologique*

Dans le contexte des changements climatiques actuels, les résultats de mon projet sont prometteurs quant à la résilience du crapet-soleil dans les lacs tempérés en ce qui concerne la tolérance à l'hypoxie et la tolérance aux infections parasitaires. Leur tolérance à l'hypoxie s'explique partiellement à cause d'expositions prolongées à l'hypoxie pendant l'hiver, un changement saisonnier provoquant des modifications hypoxiques dans les lacs (Magnuson et al., 1985 ; Greenbank, 1945 ; Hasler et al., 2009). Les valeurs de tolérance à l'hypoxie du crapet-soleil dans cette étude suggèrent une capacité à maintenir un SMR bas sous stress hypoxique et infectieux, ce qui est rassurant quant à leur capacité à survivre dans un environnement en rapide changement.

Cependant, les crapets-soleils, comme la plupart des espèces de poissons, sont généralement infectés par plusieurs espèces de parasites simultanément, et nos résultats ne peuvent pas nécessairement être généralisés à l'ensemble de ces infections ou à leurs effets combinés, qui pourraient être négatifs (Okon et al., 2023 ; Kotob et al., 2017). Ils ne peuvent pas non plus nécessairement être généralisés à différentes espèces hôtes. La complexité des interactions hôte-parasite, associée aux effets projetés d'un climat plus chaud sur la densité de parasites aquatiques et d'autres phénomènes connexes, justifie la nécessité d'études supplémentaires dans ce domaine.

### *Perspectives d'études*

Afin de bien identifier la précarité des crapets-soleil face aux parasites et la tolérance hypoxique, plusieurs expériences pourraient être réalisées dont une qui modifierait la température d'exposition lors des expérimentations de l'eau, maintenue constante dans notre étude, puisqu'elle augmente mondialement et risque d'avoir un impact sur les variables métaboliques mesurées dans cette étude (Jung et al., 2020 ; Diaz et Breitburg, 2009). La température a un impact direct sur la disponibilité de l'oxygène dans les lacs, sur les ectothermes que ce soit le parasite, les escargots

aquatiques ou les poissons, sur la limnologie des lacs, et bien plus encore. La tolérance thermique peut avoir un impact positif (McBryan et al., 2016) ou négatif sur la tolérance à l'hypoxie des poissons (Evans, 1984). Prédire l'effet de l'infection parasitaire sur le lien complexe entre la tolérance thermique et la tolérance à l'hypoxie est difficile avec nos connaissances actuelles. Des expériences entraînant des stress thermaux à courts termes lors de tests de respirométrie et de tests de tolérance hypoxique seraient intéressantes, ou encore une des acclimations à des températures différentes avant de faire les tests de respirométrie et de tolérance hypoxique seraient intéressantes. Des expériences d'acclimation de températures étudiant les seuils critiques de la température des crapets-soleil ont déjà été réalisées, mais sans observer la tolérance hypoxique (De Bonville et al., 2023).

La tolérance hypoxique présentée par les crapets-soleil est, comme mentionnée plus tôt, partiellement dû à l'exposition hypoxique chronique lors de l'hiver (Evans, 1984, Magnuson et al., 1985; Greenbank, 1945). Pour mesurer la plasticité que les crapets-soleil ont pour répondre à un stress hypoxique, une acclimation à différentes concentrations d'oxygène pour des périodes prolongées apporterait plusieurs réponses sur certains mécanismes sous-jacents de la tolérance hypoxique. Chez certaines espèces, l'acclimation à l'hypoxie permet une survie prolongée à des stress hypoxiques critiques (Rees et al., 2001) et entraîne différentes modifications chez différentes espèces. La modification de structure et métabolisme des muscles squelettiques chez la tanche (Johnston et Bernard, 1982), le changement à l'activité enzymatique et aux propriétés respiratoires sanguines chez le choquemort (Greaney et al., 1980) ou encore l'augmentation de la superficie des branchies chez le poisson rouge (Mitrovic et al., 2009) sont toutes des modifications causées par l'acclimation à l'hypoxie. Identifier la présence de modifications de la sorte chez le crapet-soleil serait intéressant.

Comme mentionné plus tôt, établir un compte de l'intensité parasitaire des poissons avant une infection expérimentale est un défi. Il serait très intéressant de réaliser des reproductions en laboratoire afin de produire une lignée de poisson d'une famille génétiquement semblable aux poissons retrouvés en milieu naturel exempte de toute infection parasitaire. Ce processus a déjà été fait dans d'autres relations parasites-hôtes (Becker et al., 2013; Gobbin et al., 2021; King et al., 2009). En ayant une absence complète d'infection sur la F1 utilisée, l'intensité de l'infection

parasitaire pourrait être quantifiée parfaitement et c'est la seule façon de s'assurer d'une quantification pré-infection parfaite et nulle. L'effet observé serait hors de tout doute dû au parasitisme, malgré qu'il y aurait une perte de la pertinence biologique de cette étude étant expérimentalement contrôlée.

Une autre facette de l'infection qui serait intéressante à explorer est au niveau de la génétique jouant un rôle probablement fort important dans la réaction immunitaire d'un individu. De plus, à la station de biologie des Laurentides, un lac en amont du lac Cromwell, le lac Triton, présente des crapets-soleil complètement exempts de point noir. L'absence de cette maladie est probablement due à une absence d'escargots aquatiques dans ce lac, indicateur de l'infection du deuxième hôte dans le cycle de vie complexe de ces trématodes (Letsberg et al., 1998). Effectuer une infection expérimentale identique à ces deux populations et analyser la génétique derrière les résultats de l'infection par dénombrement des kystes de trématodes serait intéressant pour obtenir une idée d'une possible plasticité immunitaire et de l'évolution de certains traits responsables de la résilience aux infections parasitaires et aux maladies. Ces aspects sont généralement étudiés chez des espèces captives en aquaculture (Ovenden et al., 2015). Leur identification permettrait de vérifier si une sélection priorisant la tolérance aux parasites comme observé chez certaines espèces de poissons, est également observée chez certaines populations du crapet-soleil (Bishop et Woolliams 2014; Holm et al., 2015).

Nos résultats permettent d'établir plusieurs hypothèses quant à ces possibles projets sur l'effet du parasitisme et de la tolérance hypoxique du crapet-soleil. Ce mémoire a permis d'entamer le portrait des effets du parasitisme sur la tolérance hypoxique en lien avec les conséquences du changement climatique sur le crapet-soleil, une espèce d'une haute importance dans les lacs tempérés d'Amérique du Nord.

## Références

- Allan, B. J., Illing, B., Fakan, E. P., Narvaez, P., Grutter, A. S., Sikkel, P. C., ... & McCormick, M. I. (2020). Parasite infection directly impacts escape response and stress levels in fish. *Journal of experimental biology*, 223(16), jeb230904.
- Achiorno, C. L., & Martorelli, S. R. (2016). Effect of temperature changes on the cercarial-shedding rate of two trematodes. *Iheringia. Série Zoologia*, 106.
- Almeida-Val VMF, Val AL, Duncan WP, Souza FCA, Paula-Silva MN, Land S (2000) Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp Biochem Physiol B* 125:219–226
- Anderson, R. M., Whitfield, P. J., & Dobson, A. P. (1978). Experimental studies of infection dynamics: infection of the definitive host by the cercariae of *Transversotrema patialense*. *Parasitology*, 77(2), 189-200.
- Andrew J. Mitchell, Andrew E. Goodwin, Melissa J. Salmon & Thomas M. Brandt (2002) Experimental Infection of an Exotic Heterophyid Trematode, *Centrocestus formosanus*, in Four Aquaculture Fishes, *North American Journal of Aquaculture*, 64:1, 55-59, DOI: [10.1577/1548-8454\(2002\)064<0055:EIOAEH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2002)064<0055:EIOAEH>2.0.CO;2)
- Barber, I. (2007). Parasites, behaviour and welfare in fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3-4), 251-264.
- Bashir-Tanoli, S. and Tinsley, M. C. (2014). Immune response costs are associated with changes in resource acquisition and not resource reallocation. *Funct. Ecol.* 28, 1011–1019
- Beamish, F. W. H., & Mookherjee, P. S. (1964). Respiration of fishes with special emphasis on standard oxygen consumption: I. Influence of weight and temperature on respiration of goldfish, *Carassius auratus* L. *Canadian Journal of Zoology*, 42(2), 161-175.
- Becker, J. A., Tweedie, A., Gilligan, D., Asmus, M., & Whittington, R. J. (2013). Experimental infection of Australian freshwater fish with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV). *Journal of Aquatic Animal Health*, 25(1), 66-76.

- Berra, T. et Au, R.-J. (1978). Incidence of Black Spot Disease in Fishes in Cedar Fork Creek, Ohio. *The Ohio Journal of Science*, 78, 318-32
- Binning, S. A., Shaw, A. K., & Roche, D. G. (2017). Parasites and host performance: incorporating infection into our understanding of animal movement. *Integrative and Comparative Biology*, 57(2), 267-280.
- Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2014). Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock science*, 166, 190-198.
- Blanckenhorn, W. U. (1992). Group size and the cost of agonistic behavior in pumpkinseed sunfish. *Ethology ecology & evolution*, 4(3), 255-271.
- Blader, I. J., & Saeij, J. P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Apmis*, 117(5-6), 458-476.
- Bonneaud, C., Wilson, R. S. and Seebacher, F. (2016). Immune-challenged fish up-regulate their metabolic scope to support locomotion. *PLoS ONE* 11, e0166028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166028>
- Borowiec, B. G., Crans, K. D., Khajali, F., Pranckevicius, N. A., Young, A., & Scott, G. R. (2016). Interspecific and environment-induced variation in hypoxia tolerance in sunfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 198, 59-71.
- Borowiec, B. G., Darcy, K. L., Gillette, D. M., & Scott, G. R. (2015). Distinct physiological strategies are used to cope with constant hypoxia and intermittent hypoxia in killifish (*Fundulus heteroclitus*). *The Journal of experimental biology*, 218(8), 1198-1211.

- Bosschaerts, T., Guilliams, M., Stijlemans, B., De Baetselier, P., & Beschin, A. (2009). Understanding the role of monocytic cells in liver inflammation using parasite infection as a model. *Immunobiology*, 214(9-10), 737-747.
- Brady, D. C., Targett, T. E., & Tuzzolino, D. M. (2009). Behavioral responses of juvenile weakfish (*Cynoscion regalis*) to diel-cycling hypoxia: swimming speed, angular correlation, expected displacement, and effects of hypoxia acclimation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(3), 415-424.
- Brett, J. R. (1972). The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates. *Respiration physiology*, 14(1-2), 151-170.
- Brooks, D. R., & Hoberg, E. P. (2007). How will global climate change affect parasite–host assemblages?. *Trends in parasitology*, 23(12), 571-574.
- Bruneaux, M., Visse, M., Gross, R., Pukk, L., Saks, L. and Vasemägi, A. (2017). Parasite infection and decreased thermal tolerance: impact of proliferative kidney disease on a wild salmonid fish in the context of climate change. *Funct. Ecol.* 31, 216–226.
- Buentello, J. A., Gatlin III, D. M., & Neill, W. H. (2000). Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 182(3-4), 339-352.
- Bullard, S. A., & Overstreet, R. M. (2008). Digeneans as enemies of fishes. *Fish diseases*, 2, 817-976.
- Caballero, I. C., Sakla, A. J., Detwiler, J. T., Gall, M. Le, Behmer, T. and Criscione, C. D. (2015). Physiological Status Drives Metabolic Rate in Mediterranean Geckos Infected with Pentastomes. *PLoS One* 10, 1–14
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A. R., Morgan, E. R., Murray, K., ... & Booth, M. (2017). Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1719), 20160088.



- Careau, V., Garant, D. and Humphries, M. M. (2012). Free-ranging eastern chipmunks (*Tamias striatus*) infected with bot fly (*Cuterebra emasculator*) larvae have higher resting but lower maximum metabolism. *Can. J. Zool.* 421, 413–421.
- Castro, V., Grisdale-Helland, B., Jørgensen, S.M., Helgerud, J., Claireaux, G., Farrell, A.P. et al. (2013) Disease resistance is related to inherent swimming performance in Atlantic salmon. *BMC Physiology*, 13, 1.
- Chabot, D., Steffensen, J. F., & Farrell, A. P. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 81-121.
- Chubb, J. C. (1977). Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes Part I. Monogenea. *Advances in parasitology*, 15, 133-199.
- Claireaux, G., & Chabot, D. (2016). Responses by fishes to environmental hypoxia: integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 232-251.
- Clarke, A., & Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of animal ecology*, 68(5), 893-905.
- Crans, K. D., Prankevicius, N. A., & Scott, G. R. (2015). Physiological tradeoffs may underlie the evolution of hypoxia tolerance and exercise performance in sunfish (Centrarchidae). *Journal of Experimental Biology*, 218(20), 3264-3275.
- Dabruzzi, T. F., & Bennett, W. A. (2014). Hypoxia effects on gill surface area and blood oxygen-carrying capacity of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Fish physiology and biochemistry*, 40, 1011-1020.
- Daly, J. J., Keller, R. J., & DeYoung, B. (2006). Hyperinfection with the Bass Tapeworm, *Proteocephalus ambloplites* (Cestoda), in the Black Basses *Micropterus punctulatus* and *M. dolomieu* from Certain Arkansas Reservoir Lakes. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 60, 171-172.

- Davies, R., Moyes, C. D., & Wang, Y. S. (2011). Intra-and inter-specific variation in metabolic gene expression in relationship to environmental hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 159(1), 25-31.
- Davis, M. N., McMahon, T. E., Cutting, K. A., & Jaeger, M. E. (2020). Environmental and climatic factors affecting winter hypoxia in a freshwater lake: evidence for a hypoxia refuge and for re-oxygenation prior to spring ice loss. *Hydrobiologia*, 847(19), 3983-3997.
- De Bonville, J., Côté, A., & Binning, S. A. (2023). Thermal tolerance and survival are modulated by a natural gradient of infection in differentially acclimated hosts. *bioRxiv*.
- Diaz, R. J., & Breitburg, D. L. (2009). The hypoxic environment. *Fish physiology*, 27, 1-23. Academic Press.
- Dhillon, R. S., Yao, L., Matey, V., Chen, B. J., Zhang, A. J., Cao, Z. D., ... & Richards, J. G. (2013). Interspecific differences in hypoxia-induced gill remodeling in carp. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86(6), 727-739.
- Domenici, P., Herbert, N. A., Lefrançois, C., Steffensen, J. F., & McKenzie, D. J. (2013). The effect of hypoxia on fish swimming performance and behaviour. *Swimming physiology of fish: Towards using exercise to farm a fit fish in sustainable aquaculture*, 129-159.
- Dönges, J. (1967). Parasitär induzierte Melaninbildung in Fischen. *Z. F. Parasitenkunde* 29, 310–312 <https://doi.org/10.1007/BF00259982>
- Donthaisong, C., Arunsan, P., Suwannatrai, K., Prasopdee, S., Kulsantiwong, J., Wongmaneeprateep, S., ... & Tesana, S. (2015). Reprint of “Experimental infection of *Opisthorchis viverrini* cercariae to the cyprinid fish, *Barbonymus gonionotus*”. *Acta tropica*, 141, 253-257.
- Esch, G. W. and Huffines, W. J. (1973). Histopathology associated with endoparasitic helminths in bass. *J. Parasitol.* 59, 306–313

- Evans, D. O. (1984). Temperature independence of the annual cycle of standard metabolism in the pumpkinseed. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113(4), 494-512.
- Farrell, A. P., & Richards, J. G. (2009). Defining hypoxia: an integrative synthesis of the responses of fish to hypoxia. In *Fish physiology* 27, 487-503. Academic Press.
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., & Afonso, L. O. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish & shellfish immunology*, 24(2), 194-204.
- Fels D, Kaltz O. (2006) Temperature-dependent transmission and latency of *Holospora undulata*, a micronucleus-specific parasite of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*;273(1589):1031–1038. pmid:16627290
- Fernandes, S. C., Baillargeon, K. R., & Mace, C. R. (2019). Reduction of blood volume required to perform paper-based hematocrit assays guided by device design. *Analytical Methods*, 11(15), 2057-2063.
- Filipsson, K., Brijs, J., Näslund, J., Wengström, N., Adamsson, M., Závorka, L., ... & Höjesjö, J. (2017). Encystment of parasitic freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) larvae coincides with increased metabolic rate and haematocrit in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research*, 116, 1353-1360.
- Fisher, R. C. (1963). Oxygen requirements and the physiological suppression of supernumerary insect parasitoids. *Journal of Experimental Biology*, 40(3), 531-540.
- Friesen, O. C., Goellner, S., Poulin, R., & Lagrue, C. (2020). Parasites shape community structure and dynamics in freshwater crustaceans. *Parasitology*, 147(2), 182-193.
- Gauldie, R. W., & Jones, J. B. (2000). Stocks, or geographically separated populations of the New Zealand orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*, in relation to parasite infestation, growth rate, and otolith shape. *Bulletin of marine science*, 67(3), 949-971.

- Gallaugher, P. and Farrell, A. P. (1998). Hematocrit and blood oxygen-carry capacity. *Fish Physiology*, 17 (ed. S. F. Perry and B. L. Tufts), 185-227. San Diego, CA: Academic Press.
- Gobbin, T. P., Tiemersma, R., Leone, G., Seehausen, O., & Maan, M. E. (2021). Patterns of ectoparasite infection in wild-caught and laboratory-bred cichlid fish, and their hybrids, implicate extrinsic rather than intrinsic causes of species differences in infection. *Hydrobiologia*, 848, 3817-3831.
- Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K., & Kita, K. (2013). Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum*—A parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. *Gene*, 516(1), 39-47.
- Gradito, M (2023). Effets d'une infection parasitaire sur la condition corporelle et les traits de personnalité du crapet- soleil (*Lepomis gibbosus*). Mémoire. Université de Montréal
- Greaney, G. S., Place, A. R., Cashon, R. E., Smith, G., & Powers, D. A. (1980). Time course of changes in enzyme activities and blood respiratory properties of killifish during long-term acclimation to hypoxia. *Physiological Zoology*, 53(2), 136-144.
- Greenbank, J., (1945). Limnological conditions in ice-covered lakes, especially as related to winter-kill of fish. *Ecological Monographs* 15: 343–392.
- Guderley, H. & Pörtner, H.O. (2010) Metabolic power budgeting and adaptive strategies in zoology: examples from scallops and fish. *Canadian Journal of Zoology*, 88, 753–763.
- Guitard, J. J., Chrétien, E., De Bonville, J., Roche, D. G., Boisclair, D., & Binning, S. A. (2022). Increased parasite load is associated with reduced metabolic rates and escape responsiveness in pumpkinseed sunfish. *Journal of Experimental Biology*, 225(15), jeb243160. <https://doi.org/10.1242/jeb.243160>

- Guitard, J. (2021). Effets physiologiques de l'infection parasitaire chez le crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*). Mémoire présenté pour la maîtrise en Sciences Biologiques. Université de Montréal. Faculté des arts et des sciences. Montréal.
- Hahn, S., Bauer, S., Dimitrov, D., Emmenegger, T., Ivanova, K., Zehtindjiev, P., & Buttemer, W. A. (2018). Low intensity blood parasite infections do not reduce the aerobic performance of migratory birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1871), 20172307.
- Hariato, J, Carey, N, Byrne, M.(2019) respR—An R package for the manipulation and analysis of respirometry data. *Methods Ecol Evol.*; 10: 912–920. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13162>
- Hasler, C. T., C. D. Suski, C. D. Hanson, S. J. Cooke & B. L. Tuft, (2009). The influence of dissolved oxygen on winter habitat selection by largemouth bass: an integration of field biotelemetry studies and laboratory experiments. *Physiological and Biochemical Zoology* 82: 143–152.
- Hevrøy EM, Waagbo R, Torstensen BE, Takle H, Stubhaug I, Jorgensen SM, Torgersen T, Tvenning L, Susort S, Breck O, Hansen T: (2012) Ghrelin is involved in voluntary anorexia in Atlantic salmon raised at elevated sea temperatures. *Gen Comp Endocrinol*, 175: 118-134. 10.1016/j.ygcen.2011.10.007.
- Hoai, T. D., & Van, K. V. (2014). Efficacy of praziquantel against external parasites infecting freshwater fish. *J Sci Dev*, 12(5), 711-719.
- Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. New York: Oxford University Press.
- Hoffman, G. L. (2019). *Parasites of North American freshwater fishes*. Cornell University Press.

- Hoffman, GL. (1958). Experimental studies on the cercaria and metacercaria of a strigeoid Trematode, *Posthodiplostomum minimum* *Exp Parasitol.* ;7(1):23-50. doi: 10.1016/0014-4894(58)90004-3. PMID: 13501233.
- Holm, H., Santi, N., Kjøglum, S., Perisic, N., Skugor, S., & Evensen, Ø. (2015). Difference in skin immune responses to infection with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) of families selected for resistance and susceptibility. *Fish & shellfish immunology*, 42(2), 384-394.
- Hong, H., Regenstein, J. M., & Luo, Y. (2017). The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1787-1798.
- Hontela, A., & Stacey, N. (2019). Cyprinidae. In *Reproductive seasonality in teleosts* (pp. 53-78). CRC press.
- Houlihan, D. F., & Mathers, E. (1985). Effects of captivity and exercise on the energetics of locomotion and muscle of *Carcinus maenas* (L.). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 92(2-3), 125-142.
- Hunter, G. W., and J. M. Hamilton. (1941). Studies on host-parasite reactions to larval parasites. IV. The cyst of *Uvulifer ambloplitis* (Hughes). *Trans. Am. microsc. Soc.* 60: 498-507.
- Hunter, G.W. III and W.S. Hunter. (1938). Studies on host reactions to larval parasites. I. The effect on weight. *Journal of Parasitology* 24:477-481
- Hvas, M., & Bui, S. (2022). Energetic costs of ectoparasite infection in Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 225(1), jeb243300.
- Hvas, M., Mæhle, S., Oppedal, F., Wright, D. W. and Karlsbakk, E. (2017). The gill parasite *Paramoeba perurans* compromises aerobic scope, swimming capacity and ion balance in Atlantic salmon. *Conserv. Physiol.* 5, 1–12.

- IPCC, 2021: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.
- Jane, S. F., Hansen, G. J. A., Kraemer, B. M., et al. (2021). Widespread deoxygenation of temperate lakes. *Nature*, 594(7861), 66-70. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03550-y>
- Jerde, C. L., Kraskura, K., Eliason, E. J., Csik, S. R., Stier, A. C., & Taper, M. L. (2019). Strong evidence for an intraspecific metabolic scaling coefficient near 0.89 in fish. *Frontiers in Physiology*, 10, 1166.
- Jobling, S., & Tyler, C. R. (2003). Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology*, 126(7), S103-S107.
- Johnston, I. A., & Bernard, L. M. (1982). Ultrastructure and metabolism of skeletal muscle fibres in the tench: effects of long-term acclimation to hypoxia. *Cell and Tissue Research*, 227, 179-199.
- Jung, E. H., Brix, K. V., Richards, J. G., Val, A. L., & Brauner, C. J. (2020). Reduced hypoxia tolerance and survival at elevated temperatures may limit the ability of Amazonian fishes to survive in a warming world. *Science of the Total Environment*, 748, 141349.
- Karvonen, A., Seppälä, O., & Valtonen, E. T. (2004). Parasite resistance and avoidance behaviour in preventing eye fluke infections in fish. *Parasitology*, 129(2), 159-164.
- Kaufmann, J., Lenz, T. L., Milinski, M., & Eizaguirre, C. (2014). Experimental parasite infection reveals costs and benefits of paternal effects. *Ecology letters*, 17(11), 1409-1417.

- Katsuki, K., Seto, K., Nomura, R., Maekawa, K., & Khim, B. K. (2009). Effect of human activity on Lake Saroma (Japan) during the past 150 years: evidence by variation of diatom assemblages. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81(2), 215-224.
- Kennedy, C.R. (1975). *Ecological animal parasitology*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Killen, S. S., Christensen, E. A., Cortese, D., Závorka, L., Norin, T., Cotgrove, L., ... & McKenzie, D. J. (2021). Guidelines for reporting methods to estimate metabolic rates by aquatic intermittent-flow respirometry. *Journal of Experimental Biology*, 224(18), jeb242522.
- Killen SS, Glazier DS, Rezende EL, Clark TD, Atkinson D, Willener AS, Halsey LG. (2016) Ecological Influences and Morphological Correlates of Resting and Maximal Metabolic Rates across Teleost Fish Species. *Am Nat*;187(5):592-606. doi: 10.1086/685893. Epub. PMID: 27104992.
- Killen, S. S., Atkinson, D., & Glazier, D. S. (2010). The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. *Ecology letters*, 13(2), 184-193.
- Killen, S. S., Marras, S., Ryan, M. R., Domenici, P. & McKenzie, D. J. (2012b). A relationship between metabolic rate and risk-taking behaviour is revealed during hypoxia in juvenile European sea bass. *Functional Ecology* 26, 134–143.
- King, T. A., van Oosterhout, C., & Cable, J. (2009). Experimental infections with the tropical monogenean, *Gyrodactylus bullatarudis*: Potential invader or experimental fluke?. *Parasitology International*, 58(3), 249-254.
- Kirk D, Jones N, Peacock S, Phillips J, Molnar PK, Krkosek M, (2018) Empirical evidence that metabolic theory describes the temperature dependency of within-host parasite dynamics. *PLoS Biol.*;16(2):e2004608. pmid:29415043



- Krull, W. H. (1934). *Cercaria bessiae* Cort and Brooks, 1928, an injurious parasite of fish. *Copeia*, (2), 69-73.
- Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., & El-Matbouli, M. (2017). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary research*, 47(1), 1-12.
- Lahti, K., Huuskonen, H., Laurila, A. & Piironen, J. (2002). Metabolic rate and aggressiveness between brown trout populations. *Functional Ecology* 16, 167–174.
- Landsberg, J. H., Blakesley, B. A., Reese, R. O., McRae, G., & Forstchen, P. R. (1998). Parasites of fish as indicators of environmental stress. *Environmental Monitoring and Assessment*, 51, 211-232.
- Lane, R. L. and Morris, J. E. (2000). Biology, prevention, and effects of common grubs (digenetic trematodes) in freshwater fish. *Tech. Bull. Ser.* 115, 1–6
- Lefebvre, F., Fazio, G., & Crivelli, A. J. (2012). *Anguillicoloides crassus*. In *Fish parasites: pathobiology and protection* , 310-326. Wallingford UK: CABI.
- Lehmann, T. (1993). Ectoparasites: direct impact on host fitness. *Parasitology today*, 9(1), 8-13.
- Lemly, D. A. and Esch, G. W. (1984). Effects of the Trematode *Uvulifer ambloplitis* on Juvenile Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*: Ecological Implications. *Am. Soc. Parasitol.* 70, 475–492.
- Lenihan HS, Peterson CH, Byers JE, Grabowski JH, Thayer GW, Colby DR. (2001) Cascading of habitat degradation: Oyster reefs invaded by refugee fishes escaping stress. *Ecol Appl.* 11, 3:764-782
- Levet, M., Binning, S.A., Killen, S.S. (in preparation), Les effets de l'infection sur les mécanismes physiologiques et le comportement chez les poissons téléostéens

- Levet, M., Roche, D. G., Killen, S. S., Colosio, S., Bshary, R., Miest, J. J., & Binning, S. A. (2023). Energetic costs of mounting an immune response in a coral reef damselfish (*Pomacentrus amboinensis*). *Canadian Journal of Zoology*, (ja).
- Logan, A., Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2005). The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology*, 130(6), 637-642.
- Lõhmus, M., & Björklund, M. (2015). Climate change: what will it do to fish—parasite interactions?. *Biological Journal of the Linnean Society*, 116(2), 397-411.
- Loligo Systems, (2023), Denmark, <https://www.loligosystems.com/resources/online-oxygen-converter/>
- Lopes, P. C. (2022). Anticipating infection: How parasitism risk changes animal physiology. *Functional Ecology*
- Lopes, P. C. (2023). Responding to infection affects more than just the host. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Magnuson, J. J., Beckel, A. L., Mills, K., & Brandt, S. B. (1985). Surviving winter hypoxia: behavioral adaptations of fishes in a northern Wisconsin winterkill lake. *Environmental Biology of Fishes*, 14, 241-250.
- Mallekh, R., & Lagardere, J. P. (2002). Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of the turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. *Journal of Fish Biology*, 60(5), 1105-1115.
- Marcogliese, D. J. (2016). The distribution and abundance of parasites in aquatic ecosystems in a changing climate: more than just temperature. *Integrative and comparative biology*, 56(4), 611-619.

- Marcogliese, D. J. (2001). Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Canadian Journal of Zoology*, 79(8), 1331-1352.
- Margolis, L., & Arthur, J. R. (1979). Synopsis of the parasites of fishes of Canada. *Bulletin (Fisheries Research Board of Canada)*, 199.
- Macnab, V., & Barber, I. (2012). Some (worms) like it hot: fish parasites grow faster in warmer water, and alter host thermal preferences. *Global Change Biology*, 18(5), 1540-1548.
- McBryan, T. L., Healy, T. M., Haakons, K. L., & Schulte, P. M. (2016). Warm acclimation improves hypoxia tolerance in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, 219(4), 474-484.
- Melo, J. F. B., Lundstedt, L. M., Inoue, L. A. K., Metón, I., Baanante, I. V., & Moraes, G. (2016). Glycolysis and gluconeogenesis in the liver of catfish fed with different concentrations of proteins, lipids and carbohydrates. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 1251-1258.
- Metcalfe, N. B., Valdimarsson, S. K., & Morgan, I. J. (2003). The relative roles of domestication, rearing environment, prior residence and body size in deciding territorial contests between hatchery and wild juvenile salmon. *Journal of Applied Ecology*, 40(3), 535-544.
- Metcalfe, N. B., Van Leeuwen, T. E., & Killen, S. S. (2016). Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance?. *Journal of fish biology*, 88(1), 298-321.
- Mikheev VN, Pasternak AF, Valtonen ET, Taskinen J. (2014) Increased ventilation by fish leads to a higher risk of parasitism. *Parasit Vectors*.7(281). pmid:249547035960738

- Milligan, C. L., & Wood, C. M. (1986). Tissue intracellular acid-base status and the fate of lactate after exhaustive exercise in the rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 123(1), 123-144.
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., ... & Fernández, R. (2014). Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & shellfish immunology*, 40(2), 531-538.
- Nadler, L. E., Bengston, E., Eliason, E. J., Hassibi, C., Helland-Riise, S. H., Johansen, I. B., ... & Hechinger, R. F. (2021). A brain-infecting parasite impacts host metabolism both during exposure and after infection is established. *Functional Ecology*, 35(1), 105-116.
- Nedwell, D. B., Jickells, T. D., Trimmer, M., & Sanders, R. (1999). Nutrients in estuaries. *Advances in Ecological Research*, 29, 43-92.
- Nilsson, G. E. (2007). Gill remodeling in fish—a new fashion or an ancient secret?. *Journal of experimental Biology*, 210(14), 2403-2409.
- Norton J, Rollinson D, Lewis JW (2005) Epidemiology of *Anguillicola crassus* in the European eel (*Anguilla anguilla*) from two rivers in southern England. *Parasitology* 130: 679–686.
- O'Dwyer, K., Dargent, F., Forbes, M. R. and Koprivnikar, J. (2020). Parasite infection leads to widespread glucocorticoid hormone increases in vertebrate hosts: a meta-analysis. *J. Anim. Ecol.* 89, 519-529. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13123>
- Okon, E. M., Okocha, R. C., Taiwo, A. B., Michael, F. B., & Bolanle, A. M. (2023). Dynamics of co-infection in fish: A review of pathogen-host interaction and clinical outcome. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 100096.
- Oliveira, C., Vera, L. M., López-Olmeda, J. F., Guzmán, J. M., Mañanós, E., Ramos, J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Monthly day/night changes and seasonal daily rhythms of sexual steroids in Senegal sole (*Solea senegalensis*) under natural fluctuating or controlled

- environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(2), 168-175.
- Olsvik, P. A., Vikeså, V., Lie, K. K., & Hevrøy, E. M. (2013). Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *BMC genomics*, 14(1), 1-21.
- Ovenden, J. R., Berry, O., Welch, D. J., Buckworth, R. C., & Dichmont, C. M. (2015). Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. *Fish and Fisheries*, 16(1), 125-159.
- Palstra, A. P., & Planas, J. V. (2011). Fish under exercise. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 259-272.
- Pollock, M. S., Clarke, L. M. J., & Dubé, M. G. (2007). The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environmental Reviews*, 15(NA), 1-14.
- Pörtner, H. O., & Lannig, G. (2009). *Fish Physiology*, 27, Hypoxia.
- Poulin, R. (2006). Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132(1), 143-151. doi:10.1017/S0031182005008693
- Poulin, R. and Morand, S. (2000). The Diversity of Parasites. *Q. Rev. Biol.* 75, 277–293.
- Price, P. W. (1980). *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton (NJ): *Princeton University Press*
- Rabalais, N. N., Diaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D., & Zhang, J. (2010). Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*, 7(2), 585-619.
- Rabalais, N. N., Turner, R. E., & Wiseman Jr, W. J. (2001). Hypoxia in the Gulf of Mexico. *Journal of environmental quality*, 30(2), 320-329.
- Rasband, W.S., (2018) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>,
- Reemeyer, Jessica E, Rees Bernard, B. (2019); Standardizing the determination and interpretation of  $P_{crit}$  in fishes. *J Exp Biol*; 222 (18): jeb210633. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.210633>

- Rees, B. B., Sudradjat, F. A., & Love, J. W. (2001). Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *Journal of Experimental Zoology*, 289(4), 266-272.
- Rees B. B., Boily P, and Williamson L. A. C. (2009) *Advances in Physiology Education* 33:1, 72-77
- Regan, M. D., Gill, I. S., & Richards, J. G. (2017). Calorespirometry reveals that goldfish prioritize aerobic metabolism over metabolic rate depression in all but near-anoxic environments. *Journal of Experimental Biology*, 220(4), 564-572.
- Regan, M. D., Gill, I. S., & Richards, J. G. (2017b). Metabolic depression and the evolution of hypoxia tolerance in threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Biology letters*, 13(11), 20170392.
- Richards, J. G. (2010). Metabolic rate suppression as a mechanism for surviving environmental challenge in fish. *Aestivation: Molecular and physiological aspects*, 113-139.
- Richards JG: (2011) Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J Exp Biol.*, 214: 191-199. 10.1242/jeb.047951.
- Roberts R.J, (1989) *esc Fish Pathology* (second ed.), Bailliere Tindall, London 467 pp.
- Rogers, N. J., Urbina, M. A., Reardon, E. E., McKenzie, D. J., & Wilson, R. W. (2016). A new analysis of hypoxia tolerance in fishes using a database of critical oxygen level ( $P_{crit}$ ). *Conservation physiology*, 4(1), cow012.
- Rondelaud D, Titi A, Vignoles P, Mekroud A, Dreyfuss G. (2013); Consequence of temperature changes on cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica* or *Paramphistomum daubneyi*. *Parasite*. doi: 10.1051/parasite/2013009. Epub PMID: 23497989; PMCID: PMC3718537.
- Rummer, J. L., Binning, S. A., Roche, D. G. and Johansen, J. L. (2016). Methods matter: Considering locomotory mode and respirometry technique when estimating metabolic rates of fishes. *Conserv. Physiol.* 4, 1–13

- Ryberg, M. P., Skov, P. V., Vendramin, N., Buchmann, K., Nielsen, A. and Behrens, J. W. (2020). Physiological condition of Eastern Baltic cod, *Gadus morhua*, infected with the parasitic nematode *Contracaecum osculatum*. *Conserv. Physiol.* 8, 1–14.
- Secombes, C. A., & Chappell, L. H. (1996). Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 167-177.
- Schulte, P M., Davies, S A., Dow, J A. T., Lukowiak, K; (2014) What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J Exp Biol* 217 (1): 23–34. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.089722>
- Schultz, E.T., Topper, M. & Heins, D.C. (2006). Decreased reproductive investment in female threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* infected with the cestode *Schistocephalus solidus*: parasite adaptation, host adaptation or side effect? - *Oikos* 1 14: 303-310
- Scott, W. B. et Crossman, E. J. (1974). Poissons d'eau douce du Canada. *Office des recherches sur les pêcheries du Canada*
- Sheridan, M. A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(4), 679-690.
- Slavík, O., Horký, P., Douda, K., Velíšek, J., Kolářová, J., & Lepič, P. (2017). Parasite-induced increases in the energy costs of movement of host freshwater fish. *Physiology & Behavior*, 171, 127-134.
- Sneddon, L. U., Wolfenden, D. C., & Thomson, J. S. (2016). Stress management and welfare. In *Fish physiology* (35, 463-539). Academic Press.
- Song, H., Kemp, D. B., Tian, L., Chu, D., Song, H., & Dai, X. (2021). Thresholds of temperature change for mass extinctions. *Nature communications*, 12(1), 4694.

- Tara L. McBryan, Timothy M. Healy, Kristen L. Haakons, Patricia M. Schulte. (2016); Warm acclimation improves hypoxia tolerance in *Fundulus heteroclitus*. *J Exp Biol* 219 (4): 474–484. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.133413>
- Tarbiat, B., Jansson, D. S., & Höglund, J. (2015). Environmental tolerance of free-living stages of the poultry roundworm *Ascaridia galli*. *Veterinary parasitology*, 209(1-2), 101-107.
- Thambithurai, D., Lanthier, I., Contant, E., Killen, S. S., & Binning, S. A. (2022). Fish vulnerability to capture by trapping is modulated by individual parasite density. *Proceedings of the Royal Society B*, 289, 20221956.
- Thomas, M. B., & Blanford, S. (2003). Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(7), 344-350.
- Thompson, B. L., Gilbert, R. J., Mejia, M., Shukla, N., Haverstick, D. M., Garner, G. T., & Landers, J. P. (2016). Hematocrit analysis through the use of an inexpensive centrifugal polyester-toner device with finger-to-chip blood loading capability. *Analytica Chimica Acta*, 924, 1-8.
- Timothy D. Clark, Erik Sandblom, Fredrik Jutfelt. (2013) Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *J Exp Biol* ; 216 (15): 2771–2782. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.084251>
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375.
- Turko, A. J., Firth, B. L., Craig, P. M., Eliason, E. J., Raby, G. D., & Borowiec, B. G. (2023). Physiological differences between wild and captive animals: a century-old dilemma. *Journal of Experimental Biology*, 226(23).
- “Two-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 10.1.0 for Windows, (2023), GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)”.
- Ultsch, G. R., & Regan, M. D. (2019). The utility and determination of P crit in fishes. *Journal of Experimental Biology*, 222(22), jeb203646.



- van Ginneken, V., & van den Thillart, G. (2009). Metabolic depression in fish measured by direct calorimetry: a review. *Thermochimica Acta*, 483(1-2), 1-7.
- Vindas, M. A., Midttun, H. L., Nadler, L. E., Fontaine, R., Weltzien, F. A., Øverli, Ø., & Johansen, I. B. (2023). Brain-infecting parasites leave lasting effects on behaviour even in resistant hosts. *Functional Ecology*, 37(4), 852-859.
- Virani, N. A., & Rees, B. B. (2000). Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(3), 397-405.
- Vornanen, M., Stecyk, J. A., & Nilsson, G. E. (2009). The anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). In *Fish physiology* 27, 397-441. Academic Press.
- Ward, A. J., Duff, A. J., Krause, J., & Barber, I. (2005). Shoaling behaviour of sticklebacks infected with the microsporidian parasite, *Glugea anomala*. *Environmental Biology of Fishes*, 72, 155-160.
- Wegner, N. C., Drawbridge, M. A., & Hyde, J. R. (2018). Reduced swimming and metabolic fitness of aquaculture-reared California Yellowtail (*Seriola dorsalis*) in comparison to wild-caught conspecifics. *Aquaculture*, 486, 51-56.
- Woo, P. T. (1992). Immunological responses of fish to parasitic organisms. *Annual review of fish diseases*, 2, 339-366
- Wood, C. L., Welicky, R. L., Preisser, W. C., Leslie, K. L., Mastick, N., Greene, C., ... & Essington, T. E. (2023). A reconstruction of parasite burden reveals one century of climate-associated parasite decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(3), e2211903120.

Yang, B. (2022). Physical Processes in Ice-covered Lakes (Doctoral dissertation, University of Toronto (Canada)).

Yi-Teng Xia, Edwin Hok-Chi Cheng, Ying-Jie Xia, Qi-Yun Wu, Lynn Hoi-Lam Zhang, Sheng-Ying Lin, Tina Ting-Xia Dong, Qi-Wei Qin, Wen-Xiong Wang, Karl Wah-Keung Tsim, (2021) Characterization of a macrophagic-like cell line derived from rabbit fish (*Siganus fuscescens*): An illustration of anti-inflammatory responses of the herbal extract of *Scutellaria baicalensis*, *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2-100036, ISSN 2667-0119, <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100036>.

Zhu, Z. Y., Zhang, J., Wu, Y., Zhang, Y. Y., Lin, J., & Liu, S. M. (2011). Hypoxia off the Changjiang (Yangtze River) Estuary: Oxygen depletion and organic matter decomposition. *Marine Chemistry*, 125(1-4), 108-116.

Zhu, W., Wang, S., Luo, P., Zha, X., Cao, Z., Lyu, J., ... & Nover, D. (2022). A quantitative analysis of the influence of temperature change on the extreme precipitation. *Atmosphere*, 13(4), 612.

## Annexe

Tableau A1. Moyenne de la masse des individus infectés et non infectés en fonction du jour d'expérimentation

day of infection	mass infected	mass non-infected
Day 3	3,32	3,02
Day 14	4,98	3,64
Day 28	3,87	2,68
Day 42	2,62	2,99
Day 56	2,91	2,99

Tableau A2. Liste exhaustive des résultats des ANOVAs sur toutes les variables étudiées

	DF	F-value	P-value
<b>SMR</b>			
Interaction	4	0,2016	0,9368
Treatment	1	0,05574	0,814
Day of experiment	4	2,202	0,0766
<b>MMR</b>			
Interaction	4	1,218	0,3101
Treatment	1	0,008047	0,9288
Day of experiment	4	1,128	0,3498
<b>Absolute AS</b>			
Interaction	4	1,609	0,1805
Treatment	1	0,02947	0,8641
<b>Day of experiment</b>	4	2,519	<b>0,048</b>
Day 3 vs. Day 14			0,6213
Day 3 vs. Day 28			0,3703
Day 3 vs. Day 42			0,5634
<b>Day 3 vs. Day 56</b>			<b>0,0195</b>
Day 14 vs. Day 28			0,9942
Day 14 vs. Day 42			1
Day 14 vs. Day 56			0,3827
Day 28 vs. Day 42			0,9978
Day 28 vs. Day 56			0,6228
Day 42 vs. Day 56			0,4333
<b>Factorial AS</b>			
Interaction	4	0,5488	0,7004
Treatment	1	0,2879	0,5932
<b>Day of experiment</b>	4	4,883	<b>0,0015</b>
Day 3 vs. Day 14			0,9932
Day 3 vs. Day 28			0,2061
<b>Day 3 vs. Day 42</b>			<b>0,0169</b>
<b>Day 3 vs. Day 56</b>			<b>0,0099</b>
Day 14 vs. Day 28			0,4171

			0,0519
			<b>0,0311</b>
			0,8222
			0,6792
			0,9985
<b>P<sub>crit</sub></b>			
Interaction	4	0,9617	0,434
Treatment	1	1,169	0,2833
Day of experiment	4	0,07239	0,9903
<b>LOE</b>			
Interaction	4	1,259	0,2943
Treatment	1	0,0135	0,9078
Day of experiment	4	2,371	0,0605
<b>Lactate</b>			
Interaction	4	0,2611	0,9019
Treatment	1	0,0391	0,8438
Day of experiment	4	1,242	0,3007
<b>Hematocrit</b>			
Interaction	4	0,1356	0,9685
Treatment	1	0,4783	0,4919
Day of experiment	4	3,863	0,0075
			0,5145
			0,9967
			0,3371
			<b>0,0335</b>
			0,499
			0,9935
			0,314
			0,2769
			<b>0,0103</b>
			0,551

---