



Université du Québec
à Rimouski

Organisation du métabolisme mitochondrial chez huit espèces de poissons dans un gradient thermique

Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats (profil recherche) en vue de l'obtention du grade « maître ès sciences »

PAR

© FLORENCE HUNTER-MANSEAU

Décembre 2019

Composition du jury :

France Dufresne, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski

Pierre Blier, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Daniel Munro, examinateur externe, Université d'Ottawa

Dépôt initial le 10 septembre 2018

Dépôt final le 15 décembre 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

À la mémoire de mon père,
Gaétan Manseau. Merci pour ton
soutien inconditionnel, tu es toujours
avec moi.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, merci à mon directeur, Pierre Blier, de m'avoir permis de réaliser ce projet avec une grande autonomie, d'avoir été disponible et à l'écoute de mes idées pour le concrétiser. Grâce à toi, je suis une meilleure scientifique et une meilleure personne. J'espère que ce projet est le début de plusieurs années de collaboration !

Merci à Denis Chabot à l'IML, ainsi que Tanya Hansen, pour les morues, les loups, ainsi que l'accueil et l'aide pour les dissections. Merci à Nathalie LeFrançois du Biodôme de Montréal pour les cœurs de notothénioïdes, pour les tilapias, les carpes et l'accueil dans les laboratoires. Merci à Mario Lessard de la Station Piscicole de Baldwin-Coaticook pour les bars rayés et l'accès à la station. Merci également aux Écosystèmes Alimentaires Urbains (ÉAU), particulièrement à Olivier Demers-Dubé pour les tilapias. Merci aux membres du jury d'évaluation de mon mémoire, France Dufresne, Pierre Blier et Daniel Munro, d'avoir pris le temps de lire et commenter ce mémoire.

Je suis reconnaissante aux Fonds de recherche du Québec — Nature et Technologie (FRQNT ; 2016-2017) et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG ; 2015-2016) pour les bourses offertes grâce auxquelles j'ai pu me concentrer totalement à ce projet.

Je remercie la vie d'avoir eu la chance d'évoluer dans une si belle équipe de laboratoire. Véronique Desrosiers, merci d'avoir répondu à mes 1001 questions avec le sourire. ☺ Bernard-Antonin, ton aide m'a permis de décrocher quelques bourses et de décrocher tout simplement parfois. Merci de m'avoir accueillie chez toi parmi ta famille (et tes allergènes à quatre pattes) pour me permettre de finir mes analyses, j'ai bien fait de t'avoir enduré tout ce temps au bureau ! Merci, Mirelle, Enrique, Félix, Amélie, Emmanuelle et Gabriel, pour l'ambiance au labo et l'assistance que vous m'avez apportée d'une manière ou d'une autre.

Merci à ma Team de feu pour nos fameuses pauses-café et pour avoir rendu les cours supportables. Merci Mimi, de m'avoir soutenue dans mon projet et de m'avoir écoutée

chialer. Merci Vincent, d'avoir partagé tes connaissances sur le monde de l'aquariophilie et des logiciels informatiques. Merci JM de m'avoir donné une bonne raison de me promener de l'autre côté de la passerelle ! ;) Nos soirées de jeux vont me manquer !

Merci Laurie (ainsi que PA et Yoda) et Virginie (et Alex), de m'avoir offert un cocon chaleureux lors de mes séjours à Rimouski pour finir mes analyses et simplement pour être mes amies depuis toutes ces années !

Merci aux membres de ma famille, de même qu'à mes ami(e)s, pour leur compréhension et leur intérêt face à mon projet (ou plutôt face à mon enthousiasme pour celui-ci). Un merci particulier à ma mère (Denise), mon frère (Francis) et ma sœur (Fannie). Merci Jean et Claudette de m'avoir prêté Biscotte, notre chien partagé, elle m'a accompagnée pour une partie de l'écriture de ce mémoire !

Comme vous le voyez, ce projet n'aurait pu être réalisé sans la contribution de plusieurs personnes merveilleuses et je suis choyée d'avoir été si bien entourée. Il m'en reste tout de même une dernière à remercier. Cette personne a été à mes côtés durant toutes ces journées, semaines et années, bonnes ou mauvaises. Guillaume, tu as été inébranlable et les mots me manquent pour te dire à quel point j'apprécie ton appui et ton amour. J'espère que je réussis à te le rendre tous les jours !

À tous ceux qui ont contribué à ce projet, de près ou de loin, et qui ne sont pas mentionnés dans ces quelques lignes, je suis désolée. Je suis sûre que vous comprenez qu'à la fin d'une entreprise de cette ampleur, mon cerveau est un peu en bouillie !

RÉSUMÉ

L'objectif de ce projet est de caractériser les ajustements phénotypiques mitochondriaux associés à différents optimums thermiques chez les poissons. Pour y arriver, des cœurs de huit espèces de poissons à nageoires à rayons représentant un vaste gradient d'habitats thermiques ont été échantillonnés. Nous y avons mesuré l'activité de quatre enzymes contrôlant l'entrée des substrats dans le cycle de Krebs : la pyruvate kinase (PK), le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc), la carnitine palmitoyl transférase (CPT) et la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD). Nous avons également analysé l'activité d'enzymes clés du système de transport des électrons (STE) : les complexes I, II, I + III et IV. Notre hypothèse est que, afin de compenser une possible limitation due à une faible température, l'activité des enzymes responsables de fournir les substrats au cycle de Krebs (PDHc, CPT et HOAD) est plus élevée par rapport à l'activité des enzymes du STE (complexes I, II, III et IV) chez les espèces adaptées au froid comparativement aux espèces adaptées au chaud. Afin de déterminer si tel est le cas, l'activité des enzymes contrôlant l'entrée des substrats dans la mitochondrie a été normalisée par l'activité des enzymes du STE. Nos résultats ont montré que l'activité de la CPT et de la HOAD, deux enzymes importantes dans le métabolisme des acides gras, est plus élevée chez les espèces de poissons d'eau froide que chez les poissons d'eau chaude par rapport au STE (complexes I + III), lorsque mesuré à la température optimale des espèces. Par contre, du côté du PDHc aucune tendance claire ne se dégage lorsque son activité est normalisée par les CI + CIII et la température. Ces résultats montrent qu'il y a une variabilité significative de l'organisation mitochondriale au sein des espèces pouvant être liée à leur température d'adaptation. Les espèces de poissons adaptées au froid ne semblent pas compenser pour l'activité du PDHc, mais ajustent probablement l'oxydation des acides gras à l'aide d'activités plus élevées de la CPT et de la HOAD relativement aux complexes I + III.

Mots clés : Poisson ; Température ; Adaptation ; Complexe pyruvate déshydrogénase ; Carnitine palmitoyl transférase ; β -Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ; Métabolisme énergétique ; Métabolisme des acides gras.

ABSTRACT

The present study aims to characterize mitochondrial phenotype adjustments associated with different thermal optimum in ray-finned fish. To do so, hearts from eight species of fish representing a wide range of thermal habitat were sampled. Enzymatic assays were conducted on four enzymes that control substrate entrance into the tricarboxylic acid cycle (TCA): pyruvate kinase (PK), pyruvate dehydrogenase complex (PDHc), carnitine palmitoyl transferase (CPT) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD). We also analyzed enzymes of the electron transport system (ETS): complexes I, II, I + III and IV. Our hypothesis is that in order to overcome a possible limitation due to low temperature, the activity of enzymes responsible for providing substrates to the TCA cycle (PDHc, CPT and HOAD), have been increased relatively to those of ETS enzymes (complexes I, II, III and IV), in cold-living species compared to temperate or warm adapted species. To verify this, the activity of substrate entrance enzymes was normalized to the activity of ETS enzymes. Our results showed that the activity of CPT and HOAD, two important components of the fatty acid pathway, were higher in the cold-water fish than in the warmer-adapted fish relative to the ETS (complexes I and III) when measured at the species optimal temperatures. However, PDHc did not show a similar trend with respect to CI + CIII and temperature. Our findings reveal a significant variability of heart mitochondrial organization among species that can be linked to temperature adaptation. Cold-adapted fish do not appear to compensate for PDHc activity but likely adjust fatty acid oxidation through higher activities of CPT and HOAD relative to complexes I + III.

Keywords: Fish; Temperature; Adaptation; Pyruvate dehydrogenase complex; Carnitine palmitoyl transferase; β -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; Energy metabolism; Fatty acid metabolism.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	xi
RÉSUMÉ	xiii
ABSTRACT	xv
TABLE DES MATIÈRES	xvii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xxii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 De l’Afrique à l’Antarctique : Explorer le métabolisme mitochondrial des cœurs de poissons dans un vaste gradient thermique	11
1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L’ARTICLE	11
1.2 ABSTRACT	13
1.3 INTRODUCTION	15
1.4 MATERIALS AND METHODS	17
1.4.1 Experimental animals	17
1.4.2 Tissue/Sample Preparation	18
1.4.3 Enzymatic Activity	19
1.4.4 Chemicals	21
1.4.5 Calculations	22
1.4.6 Statistics	22
1.5 RESULTS	24
1.6 DISCUSSION	30
1.7 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	35
1.8 ETHICS STATEMENT	35
1.9 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT	35

1.10 FUNDING.....	36
1.11 ACKNOWLEDGEMENTS	36
1.12 SUPPLEMENTARY MATERIAL	37
CONCLUSION GÉNÉRALE	47
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 :** Vue d'ensemble du métabolisme mitochondrial. Le métabolisme mitochondrial peut être séparé en quatre blocs fonctionnels : **I)** l'entrée des substrats dans la mitochondrie, **II)** le cycle de Krebs, **III)** le système de transport des électrons et **IV)** l'ATP synthase..... 4
- FIGURE 2.** Activity of mitochondrial substrate entrance enzymes of pyruvate pathway (PDHc and PK) in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish, and warm-adapted fish (right). Activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** Pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) expressed relative to CI + CIII activity. **B)** PDHc expressed relative to CIV activity. **C)** Pyruvate kinase (PK) activity expressed relative to CI + CIII. **D)** PK activity expressed relative to CIV. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). 25
- FIGURE 3.** Activity of mitochondrial substrate entrance enzymes of pyruvate pathway normalized with ETS enzyme activities (CI + CIII and CIV) or PDHc, in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish, and fish species adapted to warmer habitats (right). Enzyme activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** Carnitine palmitoyl transferase (CPT) expressed relative to CI + CIII. **B)** CPT expressed relative to CIV. **C)** β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD) expressed relative to CI + CIII. **D)** HOAD expressed relative to CIV. **E)** CPT expressed relative to pyruvate dehydrogenase complex (PDHc). **F)** HOAD expressed relative to PDHc. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). 27
- FIGURE 4.** Activity ratios of CS and ETS enzymes in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish and fish species adapted to warmer habitats (right). Enzymes activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** CI activity expressed relative to CI + CIII. **B)** CI activity expressed relative to CIV. **C)** CII activity expressed relative to CIV. **D)** CI + CIII activity expressed relative to CIV. **E)** CS activity expressed relative to CI + CIII. **F)** CS activity expressed relative to CIV. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). 29

SUPPLEMENTARY FIGURE S1. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. A) PDHc/CI + CIII. B) PDHc/CIV. C) PK/CI + CIII. D) PK/CIV.	37
SUPPLEMENTARY FIGURE S2. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. A) CPT/CI + CIII. B) CPT/CIV. C) HOAD/CI + CIII. D) HOAD/CIV. E) CPT/PDHc. F) HOAD/PDHc.	38
SUPPLEMENTARY FIGURE S3. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. A) CI/CI + CIII. B) CI/CIV. C) CII/CIV. D) CI + CIII/CIV. E) CS/CI + CIII. F) CS/CIV.	39
SUPPLEMENTARY FIGURE S4. Correlation in activities among different enzymes of mitochondrial oxidative pathway. A) PDHc correlated with CIV. B) CPT correlated with CI + CIII. C) PDHc correlated with CPT. D) HOAD correlated with CI + CIII. E) HOAD correlated with CIV. F) PDHc correlated with HOAD.	40
SUPPLEMENTARY FIGURE S5. Correlation in activities among different enzymes of mitochondrial oxidative pathway. A) CI correlated with CIV. B) CI + CIII correlated with CIV. C) CII correlated with CIV. D) CS correlated with CI + CIII. E) CS correlated with CIV. F) PK correlated with CIV.	41
SUPPLEMENTARY FIGURE S6. Activity of Pyruvate Dehydrogenase complex (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	42
SUPPLEMENTARY FIGURE S7. Activity of Carnitine Palmitoyl Transferase (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	42
SUPPLEMENTARY FIGURE S8. Activiy of β-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	43
SUPPLEMENTARY FIGURE S9. Activity of Pyruvate Kinase (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	43
SUPPLEMENTARY FIGURE S10. Activity of Complex I (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	44
SUPPLEMENTARY FIGURE S11. Activity of Complex II (U mg ⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	44

SUPPLEMENTARY FIGURE S12. Activity of Citrate Synthase (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.....	45
SUPPLEMENTARY FIGURE S13. Activity of Complexes I and III combined (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.	45
SUPPLEMENTARY FIGURE S14. Activity of Complex IV (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.....	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
TCA	Tricarboxylic acid
ETS	Electron transport system
PDHc	Pyruvate dehydrogenase complex / complexe pyruvate déshydrogénase
CPT	Carnitine palmitoyl transférase
HOAD	β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
PK	Pyruvate kinase
CS	Citrate synthase
CI	NADH déshydrogénase ou complexe I
CII	Succinate déshydrogénase ou complexe II
CIII	Coenzyme Q-cytochrome c réductase ou complexe III
CI + CIII	Mesure du complexe I et du complexe III ensemble
CIV	Cytochrome c oxydase ou complexe IV
U	Unité d'activité enzymatique
nm	Nanomètre
sem	Standard error of the mean
STE	Système de transport des électrons
T_{opt}	Température optimale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les changements climatiques envisagés (IPCC, 2013) affecteront plusieurs paramètres physico-chimiques des océans (Somero, 2011). Parmi ceux-ci, on retrouve la salinité, le pH et la température (Somero, 2011). En particulier, la température influence tous les niveaux organisationnels biologiques, de la mitochondrie jusqu'à l'organisme entier. Les organismes ectothermes, comme les poissons, constituent une partie importante des communautés terrestres et marines. Ils possèdent une habileté limitée à réguler leur température corporelle (Hofmann et Todgham, 2010). La température optimale (T_{opt}) d'un ectotherme peut être définie de plusieurs façons. Ce terme sera utilisé ici pour référer à la température à laquelle la capacité aérobie du poisson est la plus élevée, lui permettant d'accomplir différentes fonctions biologiques telles que la croissance, la locomotion, ou encore, la reproduction (Fry, 1971). Les poissons seront particulièrement affectés par les hausses thermiques prévues d'ici 2100 (Hofmann et Todgham, 2010). Plusieurs modèles anticipent une augmentation allant de 2 à 4,5°C avant la fin du siècle, ce qui représente une élévation cinq fois plus importante que lors du siècle précédent (IPCC, 2013). Les changements climatiques envisagés seront accompagnés de vagues de chaleur plus intenses, plus fréquentes et de plus longues durées (IPCC, 2013 ; Hofmann et Todgham, 2010).

Lorsque les organismes sont confrontés à une élévation de température, la demande énergétique corporelle et la consommation d'oxygène augmentent (Farrell, 2009), ce qui exige une augmentation de la circulation sanguine assurée par une augmentation du travail cardiaque (Iftikar et Hickey, 2013). Le transport de l'oxygène déterminerait le seuil thermique critique chez les ectothermes (Pörtner et Knust, 2007). Lorsque la température se rapproche de la limite de tolérance supérieure d'un individu, les fonctions cardiaques commencent à être altérées. Sa consommation en oxygène plafonne, alors que la production d'adénosine triphosphate (ATP) diminue (Iftikar et Hickey, 2013). Dans ces études, on a noté que la température maximale tolérée devance de peu la température à laquelle le cœur cesse de fonctionner (Pörtner et Knust, 2007). Certaines autres études suggèrent que la perte de

fonctionnalité des mitochondries cardiaques induit la détérioration des capacités cardiaques à température élevée (Blier et al., 2014 ; Iftikar et Hickey, 2013). L'énergie nécessaire à la contraction du muscle cardiaque provient notamment du métabolisme aérobie mitochondrial. Les mitochondries peuvent donc potentiellement limiter l'intervalle thermique toléré par les organismes ectothermes (Pörtner et Knust, 2007 ; Guderley, 2004 ; Pörtner, 2002).

La production d'ATP au sein des cellules implique l'intégration de différentes voies métaboliques. Chacune de ces voies comporte plusieurs enzymes qui seront affectées différemment par la température. Dans une voie métabolique, l'étape la plus lente est généralement considérée comme limitante, puisqu'elle détermine la vitesse de la réaction globale (Murdoch, 1981). La sensibilité thermique d'une enzyme est dictée par la réaction qu'elle catalyse, ainsi que ses propriétés cinétiques et structurelles (Aledo et al., 2010). Une variation thermique peut perturber la structure des enzymes, altérer la façon dont elle se lie à son substrat ou modifier la manière dont elle effectue sa réaction (Pörtner et al., 2007 ; Somero, 1995). Toute modification de température devrait donc induire un changement dans le contrôle relatif des étapes clés de la respiration aérobie (Blier et al, 2014). Lorsqu'un organisme affronte un changement de température, il peut se déplacer dans un autre habitat, tolérer les nouvelles conditions grâce à de la plasticité phénotypique ou physiologique, ou s'adapter aux nouvelles conditions (Hofmann et Todgham, 2010). À long terme, des substitutions dans les séquences d'acides aminés composant les protéines (adaptations génétiques) peuvent survenir et favoriser l'utilisation de nouveaux habitats (Fields et Somero, 1998). L'adaptation génétique peut également survenir lorsqu'un changement durable dans une condition abiotique de l'environnement, comme la température, exerce une pression de sélection favorisant les allèles appropriés au sein des populations afin que celle-ci soit adaptée à son environnement. À court terme, pour une acclimatation temporaire, c'est la plasticité phénotypique qui est sollicitée pour faire face à un changement environnemental. Une modification de la composition des membranes (pour changer la fluidité de celle-ci) ou encore un ajustement de la quantité, de la grosseur ou de la densité de la membrane interne des mitochondries (Pörtner et al., 2007 ; Guderley et Blier, 1988) sont des exemples de

plasticité mitochondriale. Afin de déterminer si les organismes pourront s'acclimater ou s'adapter aux réchauffements envisagés, il faut identifier les étapes du métabolisme ayant le plus d'impact sur la physiologie mitochondriale lors de changements de température.

METABOLISME MITOCHONDRIAL

La mitochondrie régénère l'ATP, la forme d'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire, à l'aide d'une chaîne de réactions métaboliques. Le catabolisme des glucides, des acides gras et des protéines s'effectue simultanément, fournissant du substrat à la mitochondrie. L'acétyl-CoA est produit lorsque le pyruvate issu de la glycolyse entre dans la mitochondrie et que le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc) le convertit en acétyl-CoA. Elle peut également provenir de l'acyl-CoA (produit simple de la dégradation des acides gras) importé dans la mitochondrie, par la carnitine palmitoyl transférase (CPT), et se transforme en acétyl-CoA par la β -oxydation. Ces étapes constituent l'entrée du substrat dans la mitochondrie (**Figure 1**). L'acétyl-CoA est utilisé dans le cycle de Krebs qui fournit le système de transport des électrons (STE) en équivalents réducteurs sous forme de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de flavine adénine dinucléotide (FADH₂). Le STE utilise ces molécules pour activer ses pompes à protons, ce qui génère un gradient de protons (la force proton-motrice) de part et d'autre de la membrane interne. Ce gradient fournit à l'ATP synthase l'énergie nécessaire pour régénérer l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. Pour déterminer quelle(s) section(s) ou enzyme(s) limite(nt) le renouvellement d'ATP dans la mitochondrie lors d'un changement de température, chaque étape devra être examinée.

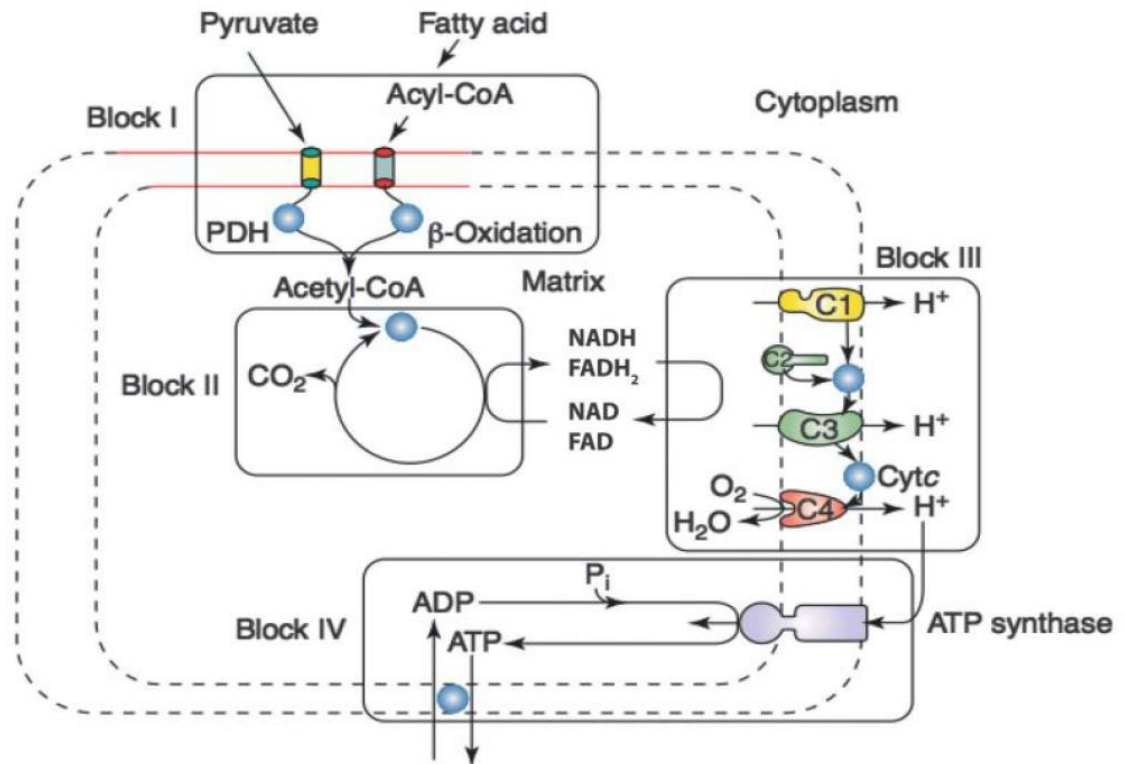


FIGURE 1 : Vue d'ensemble du métabolisme mitochondrial. Le métabolisme mitochondrial peut être séparé en quatre blocs fonctionnels : **I**) l'entrée des substrats dans la mitochondrie, **II**) le cycle de Krebs, **III**) le système de transport des électrons et **IV**) l'ATP synthase. (Figure tirée de Blier et al., 2014)

Dans le cœur de loups de l'Atlantique (*Anarhichas lupus*), un ectotherme adapté à de faibles températures, la sensibilité thermique du stade 3 de la respiration mitochondriale est similaire à celle du PDHc (Lemieux et al., 2010a et 2010b). Elle est également différente de la sensibilité d'autres enzymes mitochondriales comme la citrate synthase (CS), les complexes I à IV, ainsi que l'ATPase (Lemieux et al., 2010a et 2010b). Ces résultats semblent indiquer, comme le suggèrent les auteurs, que le stade 3 pourrait être limité à faible température, en partie, par l'activité du PDHc lorsque la mitochondrie utilise le pyruvate comme substrat. De plus, à basse température, l'activité du PDHc est beaucoup plus faible dans le cœur du rat, un endotherme conservant une température corporelle de 37°C, que pour le loup de l'Atlantique (Lemieux et al., 2010a et 2010b). Ces résultats appuient l'hypothèse

d'un possible ajustement compensatoire de cette enzyme à de faibles températures. Une étude portant sur les drosophiles (*Drosophila simulans*) montre que les mutants ayant une déficience causant une concentration de calcium intracellulaire élevée présentent une plus grande activité du PDHc dans des environnements plus froids que leurs congénères non mutants (Takeuchi et al., 2009). Le calcium est un activateur du PDHc et selon les auteurs, ce serait grâce à cette enzyme que les drosophiles mutantes tolèrent des températures plus faibles. D'autres travaux sur *D. simulans* montrent un excès de la capacité du complexe IV (CIV) à faible température (à 12°C, alors que les drosophiles ont une T_{opt} de 24°C), indiquant une limitation précédant le STE avec le PDHc comme cause probable (Pichaud et al., 2011). Par contre, le CIV exercerait un certain contrôle de la respiration mitochondriale à des températures élevées (28°C), ce qui n'est pas observé aux températures plus faibles (12, 18 et 24°C) (Pichaud et al., 2011 et 2010). Le complexe PDH pourrait donc être une étape limitante universelle du métabolisme mitochondrial aux températures suboptimales des espèces. Des ajustements permettant d'augmenter l'activité de cette enzyme pourraient donc avoir été favorisés par les pressions de sélection chez les espèces vivant dans des environnements froids.

Une autre voie importante pour la bioénergétique des poissons est le métabolisme des lipides. Ceux-ci ont la plus grande densité énergétique des différentes sources d'énergie métaboliques, ce qui en fait des candidats idéals pour les activités exigeant une grande dépense d'énergie (Weber, 2011). Les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au repos auraient des réserves de triglycérides sanguins suffisant pour soutenir une activité physique, ce qui expliquerait qu'aucune augmentation ne soit observée lors d'une nage prolongée (Magnoni et al., 2008). De plus, une prédominance de l'oxydation des lipides par rapport aux protéines et aux glucides chez les truites arc-en-ciel nageant à différentes vitesses montre d'ailleurs l'importance de cette voie métabolique chez les poissons (Lauff et Wood, 1996). Les différentes étapes de la β -oxydation et le transport des acides gras simples pourraient constituer d'autres points de contrôle de l'entrée du substrat dans la mitochondrie. Malgré l'importance du métabolisme des lipides, cette voie métabolique a fait l'objet d'un moins

grand nombre d'études que le PDHc. Les molécules d'acides gras simples n'étant pas solubles, elles nécessitent un transporteur pour traverser la membrane mitochondriale (Weber, 2011). L'enzyme responsable du transport, la CPT, pourrait être particulièrement thermosensible puisqu'elle est enchâssée dans la membrane mitochondriale et que celle-ci tend à devenir plus rigide lors d'un refroidissement (Weber, 2011). Une membrane plus rigide ralentirait le fonctionnement de la CPT puisqu'elle a besoin de mobilité pour effectuer sa réaction (Somero, 1995). D'un autre côté, une capacité plus élevée de la β -oxydation (particulièrement de la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ou HOAD) pourrait favoriser le transport des acides gras par la CPT à basse température en créant un gradient facilitateur pour le transporteur (Weber, 2011). Lorsqu'ils ont comparé le métabolisme mitochondrial de deux espèces de poissons pélagiques, Crockett et Sidell (1990) ont mesuré des activités significativement plus élevées de la CPT (1,9 fois plus élevée) et de la HOAD (27,2 fois plus élevée) chez une espèce polaire (*Trematomus newnesi*) par rapport à une espèce de zone tempérée (*Tautoga onitis*). Ces tendances sont également observées, mais de façon moins prononcée, chez deux espèces de poissons de fond (espèce polaire : *Gobionotothen gibberifrons* et tempérée : *Myoxocephalus octodecimspinosus*) avec une activité 1,3 fois supérieure de la CPT et 6,8 fois supérieure pour la HOAD chez l'espèce polaire (Crockett et Sidell, 1990). Les auteurs ont donc suggéré que l'oxydation des acides gras est une voie importante chez les poissons adaptés au froid.

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

Ce projet de maîtrise a pour but de caractériser les ajustements phénotypiques mitochondriaux associés à un vaste gradient thermique chez les poissons. Les études effectuées précédemment (Weber, 2011 ; Lemieux et al., 2010a et 2010b ; Takeuchi et al., 2009 ; Pichaud et al., 2011) nous permettent de suggérer que l'entrée du substrat dans le cycle de Krebs pourrait limiter le métabolisme mitochondrial lors d'une baisse de température. Notre hypothèse est donc que les enzymes responsables de fournir les substrats au cycle de Krebs auraient une activité plus élevée chez les espèces adaptées au froid comparé aux espèces d'eau chaude afin de compenser cette limitation. Plus précisément, notre prédiction

est que l'activité du PDHc, de la CPT et de la HOAD est plus grande, par rapport à l'activité des complexes I, II, I + III et IV, chez les espèces adaptées au froid comparativement aux espèces adaptées au chaud.

ÉCHANTILLONNAGE

Nous avons utilisé plusieurs espèces de poissons provenant de différents habitats thermiques soit la zone froide antarctique, la zone froide arctique, la zone tempérée et la zone chaude. Deux espèces de notothenoïdes d'eau froide (*Notothenia rossii* : T_{opt} de $-1,9$ à 2°C , Strobel et al., 2012, et *Gobionotothen gibberifrons* : T_{opt} de $-1,9$ à 2°C , Bilyk et De Vries, 2011) ont été échantillonnées à la station américaine Palmer, en Antarctique, par Nathalie LeFrançois. Deux espèces de zones froides arctiques acclimatées à 10°C ont été étudiées, le loup tacheté (*Anarhichas minor* : T_{opt} de $10,3^{\circ}\text{C}$, Hansen et Falk-Petersen, 2002) et la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua* : T_{opt} de 9 à 12°C , Pederson et Jobling, 1989). Ces deux espèces ont été fournies par l'Institut Maurice Lamontagne (Pêches et Océans Canada, Mont-Joli, Québec, Canada). Les deux espèces de zones tempérées sont l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* : T_{opt} de 12 à 15°C , Jobling et al., 1992) et le bar rayé (*Morone saxatilis* : T_{opt} de 18°C , Cox et Coutant, 1981), les deux acclimatées à $13-15^{\circ}\text{C}$. L'omble chevalier provient de la pisciculture des Monts de Bellechasse inc. (Saint-Damien-de-Buckland, Québec, Canada) et le bar rayé a été fourni par le Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP, Station piscicole de Baldwin-Coaticook, Québec, Canada). Finalement, deux espèces de zones chaudes acclimatées à $23-25^{\circ}\text{C}$, soit le tilapia (*Oreochromis niloticus* : T_{opt} de $30,1^{\circ}\text{C}$, Xie et al., 2011) et la carpe commune (*Cyprinus carpio* : T_{opt} de 25°C , Watanabe et al., 1996), ont été utilisées. Certains tilapias proviennent des Écosystèmes Alimentaires Urbains (ÉAU, Montréal, Québec, Canada). Le Biodôme de Montréal (Montréal, Québec, Canada) a fourni d'autres tilapias ainsi que les carpes allemandes.

Une attention particulière a été portée aux liens de parenté unissant les différentes espèces étudiées afin d'éviter de conclure que des propriétés mitochondriales qui semblent

provenir de l'adaptation seraient en fait dues à des contraintes phylogénétiques. Quatre de nos espèces sont des perciformes (*N. rossii*, *G gibberifrons*, *M. saxatilis* et *A. minor*) alors que les quatre autres proviennent de quatre ordres différents. Les non-perciformes utilisés dans notre étude représentent un gradient d'optimums thermiques de 9 à 30°C, tandis que les perciformes couvrent une plage superposant celle des non-perciformes, c'est-à-dire de 0 à 18°C. Les espèces représentées dans cette étude n'ont pas de lien clair entre la température optimale et la phylogénie. Par exemple, notre espèce non perciforme ayant le plus haut optimum thermique (*O. niloticus* avec une T_{opt} de 30°C) est également la plus parente avec le groupe des perciformes, représenté ici avec des températures optimales ne dépassant pas 18°C. De plus, *O. niloticus* est l'espèce la plus phylogénétiquement distante de *C. carpio* qui a l'optimum thermique le plus proche avec une T_{opt} de 25°C (pour plus d'informations concernant la phylogénie des poissons à nageoire à rayons, voir Hughes et al., 2018).

Tous les poissons ont été sacrifiés et puis disséqués et les cœurs congelés à -80°C jusqu'à leur homogénéisation. Plusieurs mesures ont été prises lors de la dissection de chaque individu : la longueur totale (cm), la masse totale (g), la masse de la carcasse (g), le sexe, la masse des gonades (g) et la masse du cœur (g). Afin de satisfaire les besoins en tissus pour toutes les analyses prévues, plusieurs cœurs d'une même espèce ont dû être homogénéisés ensemble. L'homogénéisation s'est déroulée sur glace en chambre froide (température contrôlée à 4°C). Les homogénats ont été séparés en plusieurs aliquots et conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

ANALYSES ENZYMATIQUES

Les enzymes ont été analysées par spectrophotométrie à cinq températures (5, 10, 15, 20 et 25°C) pour chaque groupe d'homogénat de cœurs des différentes espèces. Les analyses de 5 à 20°C ont été faites dans la chambre froide à température contrôlée. Les analyses à 25°C ont été effectuées dans un spectrophotomètre muni d'un porte-cuvette à température contrôlée par circulation d'eau.

Nous avons sélectionné neuf enzymes clés du métabolisme mitochondrial. La capacité glycolytique a été estimée à l'aide de la pyruvate kinase (PK) et l'oxydation du pyruvate par le PDHc. Nous avons évalué l'activité du cycle de Krebs et l'abondance mitochondriale par l'activité de la CS (Thibault et al., 1997). Les capacités catalytiques pour l'importation et l'oxydation des lipides ont été évaluées par la CPT et la HOAD respectivement. Finalement, l'activité du STE a été estimée par l'activité du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), du complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), du complexe IV (Cytochrome c Oxydase), ainsi que par un dosage combiné de l'activité des complexes I et III. Le détail de la méthode utilisée pour mesurer l'activité de chaque enzyme est présenté dans l'article du chapitre 1. Toutes les activités enzymatiques ont été normalisées par la quantité de protéines mesurée avec la méthode de l'acide bicinchoninique (Smith et al., 1985).

ANALYSES STATISTIQUES

Afin de caractériser l'organisation des mitochondries, des ratios d'activités enzymatiques ont été utilisés. Des enzymes responsables de l'entrée des substrats dans la mitochondrie (PDHc, CPT et HOAD), ainsi que la dernière enzyme de la glycolyse (PK), ont été normalisées par l'activité des enzymes du STE (complexes I, II, I + III et IV) à la température d'analyse la plus près de l'optimum thermique de chaque espèce étudiée. Des ANOVAs ont été effectuées sur la plateforme R (R Core Team, 2017), ainsi que des tests HSD de Tukey afin de déterminer les différences significatives entre les groupes. La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées avec des tests de Shapiro-Wilk et Levene respectivement. Au besoin, une transformation en \log_{10} a été appliquée afin de répondre aux conditions d'applications de l'ANOVA. Des corrélations de Pearson ont également été effectuées sur les activités enzymatiques (corrélation entre les enzymes) et avec les ratios mesurés près de la température optimale en fonction de la température optimale estimée des espèces. Un seuil significatif de $\alpha = 0,05$ a été utilisé pour tous les tests.

CHAPITRE 1

DE L'AFRIQUE A L'ANTARCTIQUE : EXPLORER LE METABOLISME MITOCHONDRIAL DES CŒURS DE POISSONS DANS UN VASTE GRADIENT THERMIQUE

1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE

La sensibilité thermique des ectothermes est en grande partie dictée par l'impact de la température sur la bioénergétique cellulaire, en particulier sur les fonctions mitochondriales. La sensibilité des voies bioénergétiques dépend des propriétés structurales et cinétiques des enzymes les composant. On s'attend donc que la sélection favorise une optimisation de leurs fonctions dans différentes niches thermiques. Dans cette étude, nous visons à caractériser les ajustements phénotypiques mitochondriaux en comparant les activités d'enzymes clés du métabolisme mitochondrial dans le cœur de huit espèces de poissons à nageoires à rayons représentant un vaste gradient d'habitats thermiques. Nous avons mesuré l'activité de quatre enzymes contrôlant l'entrée des substrats dans le cycle de Krebs : la pyruvate kinase (PK), le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc), la carnitine palmitoyl transférase (CPT) et la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD). Nous avons également analysé l'activité d'enzymes clés du système de transport des électrons (STE) : les complexes I, II, I + III et IV. Les activités enzymatiques ont été mesurées à cinq températures (5, 10, 15, 20 et 25°C). Nos résultats ont montré que l'activité de la CPT, une enzyme importante dans le métabolisme des acides gras, est plus élevée chez les espèces de poissons d'eau froide que chez les poissons d'eau chaude relativement au STE (complexes I + III) lorsque mesuré à la température optimale des espèces. L'activité de la HOAD montre des tendances similaires relativement au CI + CIII et à la température. En revanche, le PDHc et la PK ne présentent pas de tendances comparables par rapport au CI + CIII et la température. Les espèces de poisson adaptées au froid avaient de fortes activités du CIV comparé aux complexes situés en amont du STE (I, II et I + III), alors que l'inverse est observé pour les espèces adaptées à des températures plus élevées. Nos découvertes révèlent une variabilité significative de l'organisation mitochondriale au sein des espèces pouvant être liée à leur température

d'adaptation. Les espèces de poissons adaptées au froid ne semblent pas compenser pour l'activité du PDHc, mais ajustent probablement l'oxydation des acides gras à l'aide d'activités plus élevées de la CPT et HOAD relativement aux complexes I + III.

L'article qui suit, intitulé « *From Africa to Antarctica: Exploring the Metabolism of Fish Heart Mitochondria across a Wide Thermal Range* », a été soumis au mois de janvier 2019 à la revue *Frontiers in Physiology*. Le manuscrit de l'article a été accepté en avril 2019 pour paraître dans un numéro spécial nommé « *Evolutionary and Integrative Approaches for Revealing Adaptive Mechanisms in Marine Animals along Environmental Gradients* » et a été publié le 4 octobre 2019 dans celui-ci.

En tant que premier auteur, j'ai corédigé l'article, effectué les manipulations de laboratoire, ainsi que les analyses statistiques. Véronique Desrosiers a supervisé les analyses enzymatiques et biochimiques. Nathalie R. LeFrançois a échantillonné les poissons d'Antarctique et révisé l'article. France Dufresne a participé à la planification du projet et a révisé l'article. H. William Detrich III a fourni l'accès à la station d'Antarctique pour l'échantillonnage des poissons et a révisé le manuscrit. Christian Nozais a contribué aux analyses enzymatiques et révisé l'article. Pierre Blier, directeur du projet de recherche et dernier auteur, a corédigé l'article, planifié le projet, obtenu le financement et supervisé le projet.

FROM AFRICA TO ANTARCTICA: EXPLORING THE METABOLISM OF FISH HEART MITOCHONDRIA ACROSS A WIDE THERMAL RANGE

Florence Hunter-Manseau¹, Véronique Desrosiers¹, Nathalie R. Le François², France Dufresne¹, H. William Detrich, III³, Christian Nozais¹ and Pierre U. Blier¹

¹Département de biologie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, QC, Canada.

²Biodôme de Montréal, Montréal, QC, Canada. ³Department of Marine and Environmental Sciences, Northeastern University Marine Science Center, Nahant, MA, United States.

1.2 ABSTRACT

The thermal sensitivity of ectotherms is largely dictated by the impact of temperature on cellular bioenergetics, particularly on mitochondrial functions. As the thermal sensitivity of bioenergetic pathways depends on the structural and kinetic properties of its component enzymes, optimization of their collective function to different thermal niches is expected to have occurred through selection. In the present study, we sought to characterize mitochondrial phenotypic adjustments to thermal niches in eight ray-finned fish species occupying a wide range of thermal habitats by comparing the activities of key mitochondrial enzymes in their hearts. We measured four enzymes that control substrate entrance into the tricarboxylic acid cycle (TCA): pyruvate kinase (PK), pyruvate dehydrogenase complex (PDHc), carnitine palmitoyl transferase (CPT), and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD). We also analyzed enzymes of the electron transport system (ETS): complexes I, II, I + III and IV. Enzymes were assayed at five temperatures (5, 10, 15, 20, and 25°C). Our results showed that the activity of CPT, a gatekeeper of the fatty acid pathway, was higher in the cold-water fish than in the warmer-adapted fish relative to the ETS (complexes I and III) when measured close to the species optimal temperatures. The activity of HOAD showed a similar pattern relative to CI + CIII and thermal environment. By contrast, PDHc and PK did not show the similar patterns with respect to CI + CIII and temperature. Cold-adapted species had high CIV activities compared to those of upstream complexes (I, II, I + III) whereas the converse was true for warm-adapted species. Our findings reveal a significant variability of

heart mitochondrial organization among species that can be linked to temperature adaptation. Cold-adapted fish do not appear to compensate for PDHc activity but likely adjust fatty acid oxidation through higher activities of CPT and HOAD relative to complexes I + III.

1.3 INTRODUCTION

Mitochondrial ATP production depends on the interactions of various metabolic pathways. These pathways contain a variety of enzymes which are differentially affected by temperature. Thus, any changes in temperature will induce a shift in the relative control strength of key steps of aerobic pathways (Blier et al., 2014). Lasting changes in environmental temperature will subject mitochondrial energy production to selective pressure to compensate for the adverse thermal impacts on the limiting or controlling steps of respiration.

In fish, the cardiovascular system is strongly affected by temperature and part of this sensitivity appears to be dictated by mitochondrial functions (Iftikar and Hickey, 2013). The thermal sensitivity of state 3 mitochondrial respiration in the heart of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) has been shown to be similar to that of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) but to differ from the sensitivity of other mitochondrial enzymes (Lemieux et al., 2010a,b). This has led authors to suggest that state 3 may be limited at low temperature in part by the activity of PDHc when mitochondria are fed with pyruvate. Moreover, at low temperature, PDHc activity was much higher in the heart mitochondria of wolffish, a cold-temperate adapted ectotherm than in the rat, consistent with a compensatory adjustment of this enzyme (Lemieux et al., 2010a,b). Further work on *Drosophila simulans* revealed an excess of complex IV (CIV) capacity at low temperature, indicating upstream limitation in the electron transport system (ETS) with PDHc as the likely cause of this limitation (Pichaud et al., 2011). These authors further noted that *Drosophila* CIV controlled mitochondrial metabolism at high temperature but not at low temperature. Takeuchi et al. (2009) showed that *D. simulans* mutants with a deficiency causing elevation of intracellular calcium concentration also had higher PDHc activity in colder environments compared to congeners without the mutation. Since calcium is a PDHc activator, the authors proposed that induction of this enzyme led to tolerance of colder temperatures by the mutants. Together, these results support the hypothesis that an excess of CIV activity at low temperature occurs due to a rate-limiting step upstream in ectotherms (Blier et al., 2014).

Another significant pathway for fish bioenergetics is the lipid metabolism. Lipids are important catabolic substrates for fish hearts as they have the greatest energy density of the different fuels of metabolism, which makes them perfectly suited for energy-expensive activities (Weber, 2011; Magnoni and Weber, 2007). Circulating triacylglycerol (TAG) levels in resting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) have been shown to be sufficient to sustain exercise, which probably explains why TAG levels do not increase with long-term activity (Magnoni et al., 2008). A predominance of lipid oxidation over protein and carbohydrate in rainbow trout swimming at different speeds (Lauff and Wood, 1996) further portrays the importance of lipid oxidation in fish energetics.

Despite the importance of lipid metabolism, relatively few studies have evaluated the impact of temperature on mitochondrial fatty acid oxidation. Fatty acid molecules require a transporter, carnitine palmitoyl transferase (CPT), to translocate them through the mitochondrial membrane. CPT is embedded in the mitochondrial membrane, which tends to become more rigid as temperature declines (Weber, 2011) and therefore impair lipid transport. Conversely, elevation of the activities of enzymes of the β -oxidation pathway [in particular β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD)], by enhancing the concentration gradient of lipids across the inner membrane (Weber, 2011), may offset reduced CPT activity at low temperature. In a comparison of mitochondrial metabolism between two ecotypically similar fishes, one Antarctic (*Trematomus newnesi*) and one temperate (*Tautoga onitis*), Crockett and Sidell (1990) found significantly higher activities of CPT (1.9-fold increase) and HOAD (27.2-fold) in the polar species. Two demersal fish species, the Antarctic *Gobionotothen gibberifrons* and the temperate *Myoxocephalus octodecimspinosus*, gave similar, but less pronounced, trends: the polar fish showed a 1.3-fold higher activity of CPT and a 6.8-fold higher activity of HOAD. Based on these results, Crockett and Sidell (1990) suggested that fatty acids are an important fuel source for metabolism in polar fish.

Determination of the temperature dependence of mitochondrial function and the activities of key enzymes should help us identify components that are able to acclimatize or adapt to thermal variation. Based on previous studies (summarized in Blier et al., 2014), we

hypothesize that the activities of enzymes responsible for providing substrates to the tricarboxylic acid (TCA) cycle (PDHc, CPT and HOAD), have been increased relative to those of ETS enzymes (complexes I, II, III and IV), in cold-living species compared to temperate or warm adapted species. If this hypothesis is correct, then our results will provide a new framework for monitoring evolutionary compensation of mitochondrial metabolism in fish taxa across a wide range of thermal habitats. Any divergence in the relative proportion of key enzymes activities, when measured at or close to optimal temperature, will show the evolutionary plasticity of heart mitochondrial phenotype and point out characters that could be under selective pressure and adapt to changing environmental conditions.

1.4 MATERIALS AND METHODS

1.4.1 Experimental animals

Eight species with different thermal requirements were used to conduct the experiment. Two cold-water notothenioid species, the marbled notothen (*Notothenia rossii*, Richardson, 1844; $T_{\text{opt}} = -1.9$ to 2°C , Strobel et al., 2012) and the humphead notothen (*Gobionotothen gibberifrons*, Lönnberg, 1905; $T_{\text{opt}} = -1.9$ to 2°C , Bilyk and DeVries, 2011), were collected by bottom trawling from the ARSV *Laurence M. Gould* near Palmer Station, Antarctica. Two North Atlantic cold-temperate species acclimated to 10°C , the spotted wolffish (*Anarhichas minor*, Olafsen, 1772; $T_{\text{opt}} = 10.3^{\circ}\text{C}$, Hansen and Falk-Petersen, 2002) and the Atlantic cod (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758; $T_{\text{opt}} = 9$ to 12°C , Pederson and Jobling, 1989), were provided by the Maurice Lamontagne Institute (Department of Fisheries and Oceans of Canada, Mont-Joli, QC, Canada). Two temperate water species acclimated to either 13 or 15°C , the Arctic char (*Salvelinus alpinus*, Linnaeus, 1758, $T_{\text{opt}} = 12$ to 15°C , Jobling et al., 1992) and the striped bass (*Morone saxatilis*, Walbaum, 1792, $T_{\text{opt}} = 18^{\circ}\text{C}$, Cox and Coutant, 1981) were also used. Arctic chars were provided by a fish farm (Pisciculture des Monts de Bellechasse Inc., Saint-Damien-de-Buckland, QC, Canada) and bass by the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec (Fish hatchery of Baldwin-Coaticook, QC, Canada). Two warm-water species, acclimated to 23 – 25°C , Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758; $T_{\text{opt}} = 30.1^{\circ}\text{C}$, Xie et al., 2011) and common carp (*Cyprinus*

carpio, Linnaeus, 1758; $T_{\text{opt}} = 25^{\circ}\text{C}$, Watanabe et al., 1996), were provided by the Biodôme of Montreal (Montreal, QC, Canada). Some Nile tilapia were supplied by Urban Food Ecosystems (Montreal, QC, Canada). All manipulations were performed in agreement with ethical regulation of animals use for research in Canada [permit #CPA–65–16–174 from the animal ethics committee of the Université du Québec à Rimouski (Rimouski, QC, Canada)].

Four of the species belong to the more basal orders of the clupecocephala taxa (*G. morhua*, Gadiformes; *S. alpinus*, Salmoniformes; *C. carpio*, Cypriniformes and *O. niloticus*, Cichliformes) which cover a range of optimal temperatures from 9 to 30°C. The four other species belong to the more derived order of Perciformes and cover a range of optimal temperatures from approximately 0–18°C. In the group of non-perciformes, the species more closely related to perciformes is *O. niloticus* with the highest optimal temperature of 30°C. We chose species in these two groups to ensure overlap in optimal temperature range that would be independent of phylogeny. Furthermore, there is no clear association of optimal temperature with phylogenetic relationship. For example, *O. niloticus* ($T_{\text{opt}} = 30.1^{\circ}\text{C}$) is more distant from *A. minor* ($T_{\text{opt}} = 10.3^{\circ}\text{C}$) than from both notothenoid species (T_{opt} close to 0°C) and the most distant species from *O. niloticus* is *C. carpio*, with the most similar optimal temperature (25°C) (see the phylogeny of ray-finned fishes by Hughes et al., 2018). This allowed us to avoid bias in the relation of metabolic characters with optimal temperature that would be associated with phylogenetic inertia.

1.4.2 Tissue/Sample Preparation

After recording mass and length (total and standard), fish were euthanized with tricaine methanesulfonate (MS–222 0.25 g/L). Hearts were dissected, weighed, flash frozen (in liquid nitrogen) and stored at -80°C until analyses. For each species and analysis, an average of five hearts were pooled to provide sufficient material. The pools were made randomly to amount to comparable weight between the pool of the same species. The majority of the pools contain mature and immature fish. Using this method, three pools ($n = 3$) were made for *N. rossii*, *G. Morhua*, *O. niloticus* and *C. carpio*, four pools ($n = 4$) were made for *S. alpinus*,

G. gibberifrons and *A. minor* and five pools ($n = 5$) were made for *M. saxatilis*. Hearts were thawed on ice in a cold room ($+4^{\circ}\text{C}$) and then homogenized on ice in 50 mM potassium phosphate buffer pH 8.0 (with 1 mM EDTA) using a Polytron (PT 2500E, Kinematica AG, Bohemia, NY, United States) for three periods of 10-s each. Homogenates were flash frozen, then stored at -80°C until use.

1.4.3 Enzymatic Activity

The enzymatic activities were determined at 5, 10, 15, 20 and 25°C for four species (wolfish, cod and the two notothenids); at 10, 15, 20 and 25°C for tilapia, Arctic char and bass; and at only 15 and 25°C for the carp (due to limited quantity of tissue).

Assays at 25°C were performed with a UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 3100pro UV/Visible spectrophotometer, GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) equipped with a temperature-controlled cuvette holder connected to a 25°C water circuit or with a microplate reader with temperature control (EnVision Multilabel Plate Reader 2104-0010A, PerkinElmer, Waltham, MA, United States). Activities at 15 and 20°C were performed with a second microplate reader (Power Wave XS2, Biotek, Winooski, VT, United States), whereas activities at 5 and 10°C were measured in a cold room with a UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 2100pro UV/Visible spectrophotometer, GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada).

Protocols used for enzymatic assays were adapted as follows: PK from Pelletier et al. (1994); CII from Lemieux et al. (2010a); ETS from Madon et al. (1998); CI from Janssen et al. (2007); and PDHc, CPT, HOAD, CS and CIV from Thibault et al. (1997). All measurements were obtained at least in duplicates.

Pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) activity was measured at 340 nm to follow the disappearance of NADH (extinction coefficient $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 50 mM imidazole-HCl, 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 5 mM ADP, 0.15 mM NADH, 5 mM phosphoenolpyruvate and 0.6 U ml^{-1} lactate dehydrogenase, pH 7.4.

Pyruvate dehydrogenase complex (PDHc, EC 1.2.4.1) activity was measured at 500 nm to follow the reduction of *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT, extinction coefficient $\epsilon_{500} = 15.4 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 50 mM tris-HCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM NAD, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM coenzyme A, 0.3 mM oxalate, 0.6 mM INT, 6 U ml^{-1} lipoamide dehydrogenase, 0.2 mM thiamine pyrophosphate and 5 mM pyruvate (omitted for the control), pH 8.0. Samples were incubated on ice with 80 mM MgCl_2 , centrifuged at 10,000 *g* (4°C) and the pellet was discarded prior to the analysis.

Carnitine palmitoyl transferase (CPT, EC 2.3.1.2) activity was measured at 412 nm to follow the reduction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, extinction coefficient $\epsilon_{412} = 14.15 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 75 mM Tris-HCl, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM DTNB, 0.035 mM palmitoyl-CoA and 2 mM L-carnitine (omitted for the control), pH 8.0. Samples were centrifuged at 3000 *g* (4°C) and the pellet was discarded prior to the analysis.

β -hydroxyacyl dehydrogenase (HOAD, EC 1.1.1.35) activity was measured at 340 nm to follow the disappearance of NADH (extinction coefficient $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 100 mM triethanolamine-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM KCN, 0.115 mM NADH and 0.05 mM acetoacetyl-CoA (omitted for the control), pH 7.0. Samples were centrifuged at 3000 *g* (4°C) and the pellet was discarded prior to the analysis.

Citrate synthase (CS, EC 2.3.3.1) activity was measured at 412 nm to follow the reduction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, extinction coefficient $\epsilon_{412} = 14.15 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) using a reaction medium containing 100 mM imidazole-HCl, 0.1 mM DTNB, 0.1 mM acetyl-CoA and 0.15 mM oxaloacetic acid (omitted for the control), pH 8.0.

NADH: ubiquinone reductase (CI, EC 1.6.5.3) activity was measured at 600 nm to follow the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP, extinction coefficient $\epsilon_{600} = 19.1 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$). Homogenates were centrifuged at 3000 *g* (4°C) prior to the

analysis. The supernatants were incubated for 10 min at the proper assay temperature in a reaction medium containing 100 mM imidazole, 2.5 mg ml⁻¹ BSA, 5 mM MgCl₂, 4 μM antimycin A, 10 mM sodium azide, 50 μM DCIP, 65 μM ubiquinone (coenzyme Q1) and 5 μM rotenone (only for the control), pH 8.0. The reaction was initiated by addition of 0.14 mM NADH.

Succinate dehydrogenase (CII, EC 1.3.5.1) activity was measured at 600 nm to follow the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP, extinction coefficient $\epsilon_{600} = 19.1 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$). Homogenates were incubated for 5 min at the desired assay temperature in a reaction medium containing 100 mM imidazole, 20 mM succinate, 4 μM antimycin A, 5 μM rotenone and 10 mM sodium azide, pH 7.2. The reaction was started by addition of 50 μM DCIP and 65 μM ubiquinone (omitted for the control).

CI + CIII activity was measured at 490 nm to follow the reduction of *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT, extinction coefficient $\epsilon_{490} = 15.91 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 100 mM potassium phosphate, 0.85 mM NADH, 2 mM INT and 0.2% (v/v) Triton X-100, pH 8.5.

Cytochrome c Oxidase (CIV, EC 1.9.3.1) activity was measured at 550 nm to follow the oxidation of reduced cytochrome c (extinction coefficient $\epsilon_{550} = 29.5 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in a reaction medium containing 100 mM potassium phosphate, 0.05% (v/v) Tween 20 and 100 μM equine heart cytochrome c, pH 8.0. Just before analysis, cytochrome c was reduced with the addition of sodium dithionite without excess (4.5 mM final concentration). Samples were centrifuged at 3000 g (4°C) and the pellet was discarded prior to the analysis.

1.4.4 Chemicals

Most chemicals were provided by Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). EDTA, KCl, K₂HPO₄ and KH₂PO₄ were obtained from VWR (Ville Mont-Royal, QC, Canada), cytochrome c from equine heart was provided by Alfa Aesar (Tewksbury, MA, United States), and the protein standard was from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada).

1.4.5 Calculations

Enzyme activities were normalized per protein unit. The bicinchoninic acid (BCA) method (Smith et al., 1985) was used to determine protein concentration. To compare the activity of enzymes from upstream of the ETS to the ETS complexes, we used these enzyme ratios: PDHc/CI + CIII, PDHc/CIV, CPT/CI + CIII, CPT/CIV, HOAD/CI + CIII, HOAD/CIV, CPT/PDHc, HOAD/PDHc, PK/CI + CIII, PK/CIV, CI/CIV, CII/CIV, CI/CI + CIII, CI + CIII/CIV, CS/CI + CIII and CS/CIV at the assay temperature closest to the species' optimal temperature (5°C for the two species of notothen, 10°C for wolfish and cod, 15°C for Arctic char, 20°C for bass and 25°C for tilapia and the carp). We express activities as ratios to characterize the organization of mitochondria instead of documenting only the content of each enzyme in different species. We also ran Pearson correlation analyses on enzyme activities (correlation between enzymes) and on the different ratios (ratios measured at close to optimal temperature correlated to the estimated optimal temperature). The objective was to have a picture of mitochondrial organization at different thermal conditions of the different fish species to test our hypothesis that fish adapted to cold environment have to compensate for the limitation at steps upstream of the ETS and therefore should express higher ratio of activities of enzymes responsible for entrance of electrons over the enzymes controlling the oxidative process.

1.4.6 Statistics

All statistics were performed using the R platform (R Core Team, 2017). Significant differences between the activity ratios of the eight species were tested using one-way ANOVA. Tukey HSD tests were used to determine significant differences between groups. Normality and homogeneity of variances were analyzed using Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. When needed, a \log_{10} transformation was used to respect the assumptions of the ANOVA. A statistical significance level of $\alpha = 0.05$ was used for all tests. In all graphs, results are presented without transformations. We also performed a regression analysis to complement ANOVAs. The different ratios of activities measure close to optimal temperature were correlated with estimated optimal temperatures. Strong correlation would

support the prediction of adjustments of the metabolic trait, expressed by a ratio, to environmental temperature.

1.5 RESULTS

The capacity to feed the TCA cycle through PDHc or PK, when measured at a temperature close to the optimum of each species and compared to the activity of the ETS enzymes (CI + CIII or CIV), varied little among most of the species examined (**Figures 2A–C**), although the cold-temperate wolfish (*A. minor*) and the warm-adapted carp (*C. carpio*) showed higher relative levels of PDHc activity. Ratios of activities of PK over Complex IV, the last enzyme of glycolysis which feed mitochondria with pyruvate, were higher for species adapted to warmer temperature with the exception of *G. morhua* (**Figure 2D**). The correlation of PK/CIV with optimal temperature was high and significant (**Supplementary Figure S1D**, $R^2 = 0.56$, $p < 0.001$).

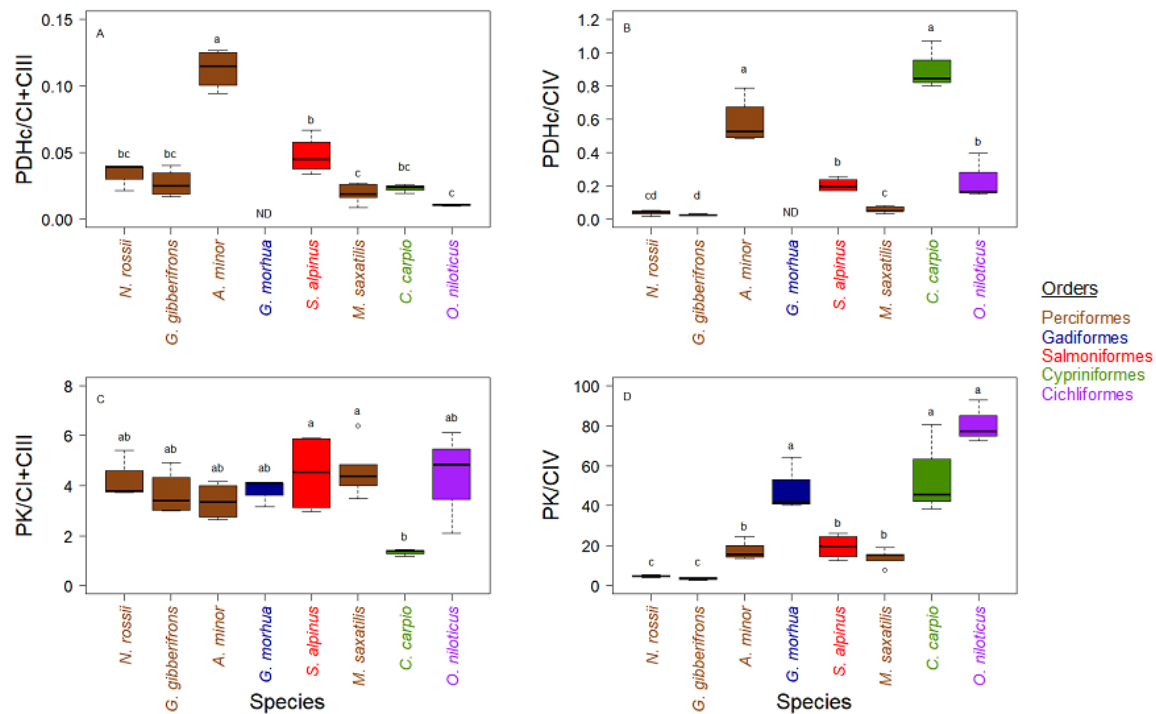


FIGURE 2. Activity of mitochondrial substrate entrance enzymes of pyruvate pathway (PDHc and PK) in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish, and warm-adapted fish (right). Activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** Pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) expressed relative to CI + CIII activity. **B)** PDHc expressed relative to CIV activity. **C)** Pyruvate kinase (PK) activity expressed relative to CI + CIII. **D)** PK activity expressed relative to CIV. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). ND: No data. *Notothernia rossii* ($n = 3$). *Gobionotothen gibberifrons* ($n = 4$). *Anarhichas minor* ($n = 4$). *Gadus morhua* ($n = 3$). *Salvelinus alpinus* ($n = 4$). *Morone saxatilis* ($n = 5$). *Cyprinus carpio* ($n = 3$). *Oreochromis niloticus* ($n = 3$). Brown boxes represent Perciformes, dark blue Gadiforme, red Salmoniforme, green Cypriniformes and purple is Cichliformes.

The capacity to feed TCA by fatty acid oxidation, appears higher in cold-adapted fish since the activities of CPT, relative to CI + CIII are greater for the three species with lowest optimal temperatures when compared to four of the five species adapted to higher temperatures (**Figure 3A**). This difference was lost when CPT was normalized to CIV activity (**Figure 3B**). Two cold-temperate species, *A. minor* and *G. morhua*, had the highest relative CPT/CIV activities. The activity of HOAD, a key enzyme of the β -oxidation

pathway, relative to CI + CIII, partly mimicked the differences observed for CPT (**Figure 3C**). However, this trend disappeared again when HOAD was normalized to CIV activity, with two warm-adapted species (*C. carpio* and *O. niloticus*) expressing higher relative activities (**Figure 3D**). Interestingly, the relative activities of either CPT or HOAD over PDHc did not show any specific trend with temperature (**Figures 3E–F**). Capacities to oxidize fatty acids, compared to pyruvate oxidation, were, however, greater in two cold-adapted species (*N. rossii* and *G. gobionotothens*) and a temperate species (*M. saxatilis*). The correlations of key enzymes of metabolites entrance in oxidative phosphorylation, with CI + CIII or CIV (**Supplementary Figure S4**) show the same relations. They reveal a strong correlation of HOAD activity with CI + CIII (**Supplementary Figure S4D**).

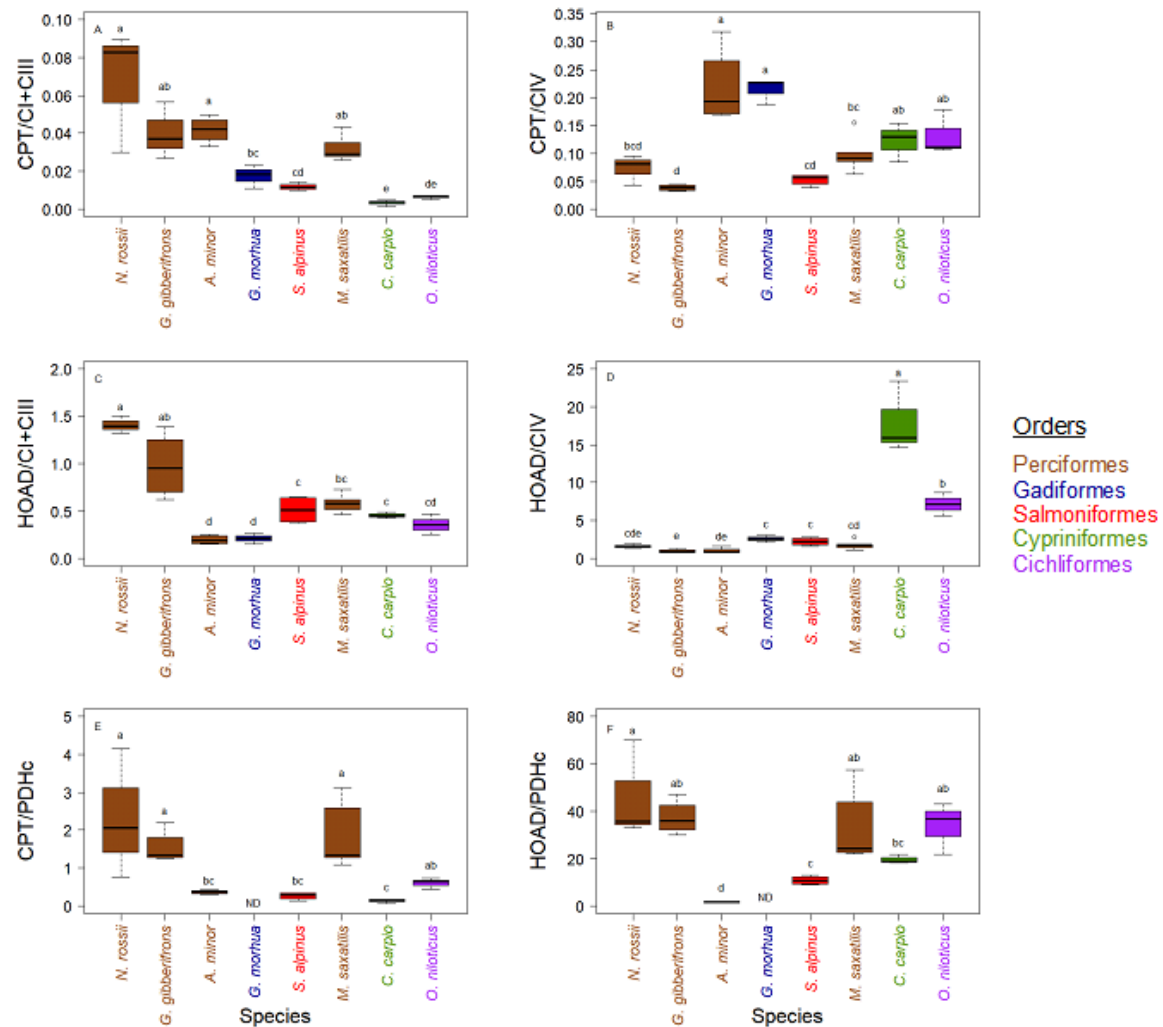


FIGURE 3. Activity of mitochondrial substrate entrance enzymes of pyruvate pathway normalized with ETS enzyme activities (CI + CIII and CIV) or PDHc, in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish, and fish species adapted to warmer habitats (right). Enzyme activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** Carnitine palmitoyl transferase (CPT) expressed relative to CI + CIII. **B)** CPT expressed relative to CIV. **C)** β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD) expressed relative to CI + CIII. **D)** HOAD expressed relative to CIV. **E)** CPT expressed relative to pyruvate dehydrogenase complex (PDHc). **F)** HOAD expressed relative to PDHc. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). ND: no data. *Notothernia rossii* ($n = 3$). *Gobionotothen gibberifrons* ($n = 4$). *Anarhichas minor* ($n = 4$). *Gadus morhua* ($n = 3$). *Salvelinus alpinus* ($n = 4$). *Morone saxatilis* ($n = 5$). *Cyprinus carpio* ($n = 3$). *Oreochromis niloticus* ($n = 3$). Brown boxes represent Perciformes, dark blue Gadiforme, red Salmoniforme, green Cypriniformes and purple is Cichliformes.

With respect to the ETS, activities of CI relative to CIV were higher for the two warm-adapted species and lower for the cold-adapted species, and this trend was repeated for CII (**Figure 4B–C**), for example *C. carpio* showed higher activity than *O. niloticus*. When normalized to CI + CIII, activities of CI did not display any trend with thermal optimum of the different species (**Figure 4A**). Relative activities of CI + CIII normalized to CIV were greater for warm-adapted species (*C. carpio* and *O. niloticus*) than for the other species at their optimal temperatures (**Figure 4D**). Quite interestingly, when normalizing activities with either CI + CIII or CIV, very different and often opposite trends with estimated optimal temperatures are observed. CPT, HOAD and CS all decrease with increases in optimal temperature when normalized per CI + CIII while HOAD, PK, CS as well as CI and CII increase when normalized per CIV (see **Supplementary Figures S1–S3**).

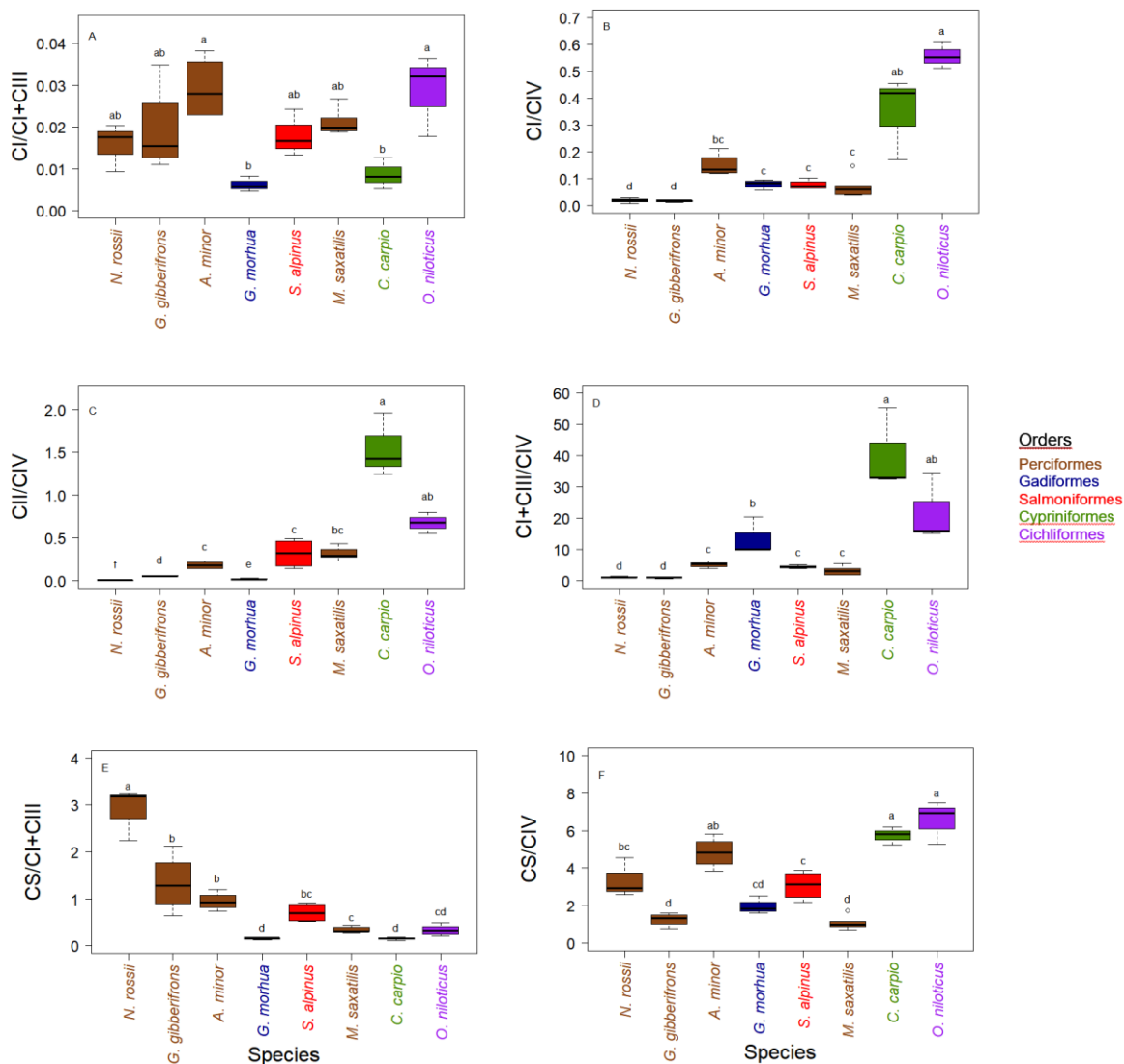


FIGURE 4. Activity ratios of CS and ETS enzymes in hearts of cold-adapted fish (left), cold-temperate adapted fish and fish species adapted to warmer habitats (right). Enzymes activities were measured at temperature near their thermal optimum. **A)** CI activity expressed relative to CI + CIII. **B)** CI activity expressed relative to CIV. **C)** CII activity expressed relative to CIV. **D)** CI + CIII activity expressed relative to CIV. **E)** CS activity expressed relative to CI + CIII. **F)** CS activity expressed relative to CIV. Values are represented as mean \pm sem. Statistical differences are represented with letters ($p < 0.05$). *Notothernia rossii* ($n = 3$). *Gobionotothen gibberifrons* ($n = 4$). *Anarhichas minor* ($n = 4$). *Gadus morhua* ($n = 3$). *Salvelinus alpinus* ($n = 4$). *Morone saxatilis* ($n = 5$). *Cyprinus carpio* ($n = 3$). *Oreochromis niloticus* ($n = 3$). Brown boxes represent Perciformes, dark blue Gadiforme, red Salmoniforme, green Cypriniformes and purple is Cichliformes.

Activities of CS, a TCA cycle enzyme, tended to decrease with optimal species temperature when compared to activities of CI + CIII (**Figure 4E**). This is also observed when CS/CI + CIII ratios are correlated with optimal temperature (**Supplementary Figure S3E**, $R^2 = 0.48$, $p < 0.001$). For CS/CIV ratio (**Figure 4F**) the correlation with optimal temperature was significantly reversed but the relationship was not as strong (**Supplementary Figure S3F**, $R^2 = 0.26$, $p < 0.003$). When correlating the different enzymes measured at optimal temperatures to identify those for which activities co-vary (**Supplementary Figures S4–S5**), the only correlation we identified was HOAD with CI + CIII (**Supplementary Figure SD**, $R^2 = 0.82$; $p < 0.001$) and CII with CIV (**Supplementary Figure S5C**; $R^2 = 0.62$; $p < 0.001$). Enzyme activities (expressed per mg of proteins) for each species and measured at different temperatures are presented in **Supplementary Figures S6–S14**.

1.6 DISCUSSION

In this report, we characterize the cardiac mitochondrial pathways of eight ray-finned fish species that inhabit thermal niches spanning most of the range occupied by the Actinopterygii. Our goal was to identify potential evolutionary adjustment of mitochondrial metabolism in fish taxa across a wide range of thermal habitats. Knowing key characters of mitochondria associated to specific thermal niche should help to point out steps needed to adapt to changes in habitat temperatures and therefore refine further studies on adaptability of ectotherms to temperature.

Prior work on the thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in fish have often focused on enzymes of OXPHOS, the PDHc and some enzymes of TCA cycle such as CS, but have largely neglected fatty acid oxidation pathways (Blier et al., 2014; Lemieux et al., 2010a,b; Takeuchi et al., 2009, but see Ekström et al., 2017). Here we have investigated enzymes that control substrate entrance, including lipids and carbohydrates, into the TCA cycle, as well as enzyme complexes of the electron transport chain. PDHc, the gatekeeper of the glucose oxidation pathway, showed no evidence of compensation, relative to ETS

enzyme activities, in cold-adapted fish species, compared to temperate or warm adapted species, refuting our prediction based on prior work (Lemieux et al., 2010a,b; Takeuchi et al., 2009). Rather, the activity of CPT, a gatekeeper of the fatty acid oxidation pathway, when normalized with respect to the ETS (CI + CIII), revealed a strong compensation of fatty acid oxidation in heart mitochondria of cold-water fish species. Two of the three species adapted to the coldest environment showed ratios more than two times higher than those of four of the five species adapted to higher temperature. This is even more evident when the ratios are correlated to the estimated optimal temperatures. Similarly, HOAD activity appeared to be adjusted, with some variation, to maintain fatty acid oxidation capacity at low temperature. The correlation of HOAD with CI + CIII activities among species might suggest a coevolution in the regulation of the expression of these enzymes leading to coordination of fatty acid oxidation capacity with ETS. The ratio obtained for either CPT or HOAD over CI + CIII were, however, calculated with activities measured at 5°C in both cold-adapted notothenioid fish due to the technical difficulties to measure at 0°C. These fish are adapted to temperature close to or below 0°C. A temperature of 5°C is significantly higher than “optimal” temperature and these ratios may represent heat shock conditions. To examine this possibility as well as the physiological significance of the ratios obtained from assays at 5°C, we estimated the activities of enzymes at 0°C by extrapolating from regression of activities at 5, 10 and 15°C. From these extrapolations the CPT/CI + CIII ratio is lower at 0°C in *N. rossii* than at 5°C (0.03 instead of 0.06) with no significant difference between both temperatures. In *G. gibberifrons*, the ratio from extrapolated activities at 0°C is, however, almost three times higher than at 5°C (0.11 instead of 0.04, with 0.11 being outside the range of standard deviation of the ratio at 5°C). Ratios calculated for 0°C are still higher than the ratios of four of the five fish species adapted at higher temperatures. For the ratios of HOAD over CI + CIII, extrapolation at 0°C show a higher ratio only for *G. gibberifrons* (1.3 instead of 0.9, but within the range of standard deviation of the ratio at 5°C). These observations suggest that temperature sensitivity of lipid oxidation, which provides a high proportion of the energy requirements of fish heart, could be compensated at key steps (CPT and HOAD) likely to maintain mitochondrial capacity at low temperature. All the fish were collected or

acclimated at temperatures close to the estimated optimal temperatures. We suspect that these ratios approximate mitochondrial characters allowing optimal capacity to oxidize fatty acids in the range of temperature encountered during their life cycle. Comparison of the activity of PK, the final glycolytic enzyme, to complexes I + III suggests that the relative capacity to provide pyruvate to mitochondria is conserved among the eight species at their respective optimal temperatures. However, warm-living fish have PK/CIV ratios that are much larger than those of cold-adapted species.

The relation of the ratios of gatekeeper enzymes over ETS enzymes with temperature is, however, dependent on the complex used to normalize the activity (denominator of the ratio). As mentioned, CPT, HOAD and CS decrease with increases in optimal temperature when normalized per CI + CIII while HOAD, PK, CS as well as CI and CII increase when normalized per CIV. This is partly explained by the relation of CI + CIII with CIV at different temperatures of adaptation. The ratio of CI + CIII over CIV rise with increases of optimal temperatures (**Supplementary Figure S5B**). This clearly shows that the organization of the ETS in fish heart mitochondria is variable and appears to be associated to environmental temperature. The predicted pattern of organization (higher gatekeeper enzymes over oxidative capacity) is revealed only when their activities are normalized by CI + CIII.

In mouse heart, Lemieux et al. (2017) measured a weak control of oxidative phosphorylation by Cytochrome c Oxidase at physiological temperature, while they showed (Lemieux et al., 2008) that the thermal sensitivity of Cytochrome c Oxidase cannot drive the thermal sensitivity of mitochondrial respiration, ruling out significant control of oxidative phosphorylation at this level. An excess of Cytochrome c Oxidase capacity relative to OXPHOS of at least 1.5-fold have been reported for the heart mitochondria of three fish species (*Bellapiscis medius*, *Forsterygion varium* and *F. malcolmi*) at three temperatures (15, 25 and 30°C; Hilton et al., 2010). Much higher activities of Cytochrome c Oxidase than the whole Electron Transfer System have also been reported in the heart of three species of wrasses (*Notolabrus celidotus*, *Notolabrus fucicola* and *Thalassoma lunare*) by Iftikar et al. (2014). This excess of Cytochrome c Oxidase may suggest low control by CIV over maximal

respiration (but see Blier and Lemieux, 2001). If CIV insures low level of control over the maxima catalytic capacity of mitochondria, the ratios expressed per CI + CIII activity might be more physiologically significant and the trend observed among species could reveal a higher increased capacity to provide electrons to CI and CII through fatty acid oxidation. The increase in the ratio of CI + CIII/CIV at higher temperatures is, however, intriguing. One hypothesis is that ETS over CIV ratio could evolve to insure proper reduction state and associated catalytic capacity and regulatory properties.

Compensation of mitochondrial energy production in cold-living fish can occur at the organellar level via increases in mitochondrial volume density (Strobel et al., 2013), greater inner membrane surface density (St-Pierre et al., 1998), and modifications in membrane composition (Grim et al., 2010; Kraffe et al., 2007). Mitochondrial content is often evaluated using CS activity, and cristae surface area can be estimated from CIV activity (Larsen et al., 2012). The trend observed in our CS/CI + CIII ratio data suggest higher volume/surface ratio for cold-adapted species, consistent with higher mitochondrial content, and an increase in mitochondria surface density in warm-adapted species. However, based on the CS/CIV ratios, the species studied are likely to have similar mitochondrial volume/surface ratios, with the exception of the two warm-adapted species. We suggest that thermal adaptation of mitochondrial metabolism in fish most likely results from compensation at the level of enzymatic properties, quantities and metabolic organization rather than organellar quantity or volume.

Homeoviscous adaptation through changes in the lipid composition of mitochondrial membranes can play an important role in acclimation and adaptation of energy metabolism to cold and warm temperatures (Grim et al., 2010; Hofmann and Todgham, 2010; Kraffe et al., 2007; Pörtner et al., 2007; Guderley and St-Pierre, 2002;). Such remodeling can have big impacts on the activities of enzymes that are embedded in the mitochondrial membranes, including CPT and the four respiratory complexes. However, our data cannot address whether the activities of these enzymes from the species that we have examined are

modulated through temperature-dependent adjustments of membrane composition and properties.

In this study, we have characterized heart mitochondrial phenotypes from eight fish species adapted to different thermal habitats by comparing the activities of enzymes from different steps of mitochondrial respiration and electron transport. We suggest that natural selection driven by habitat temperature has shaped mitochondrial function and regulation (Lemieux et al., 2017; Blier et al., 2014) such that distinct mitochondrial pathways allow cold- and warm-living fish to optimize aerobic capacity and regulation. Our results demonstrate important variability of organization in the heart mitochondrial pathway among fish species of various thermal habitats. Among the characters, two appear related to optimal temperature; ratios of CPT/CI + CIII and ratios of HOAD/CI + CIII. These increases in activities of fatty acid oxidation enzymes in cold-adapted fish are complemented by increase in a key enzyme of TCA (CS). It is unlikely that these relationships are induced by phylogenetic relationship since fish from four basal orders (Gadiformes, Salmoniformes, Cypriniformes and Cichliformes) cover an optimal temperature range from 9 to 30°C while the four other species are all from the Perciforme order and cover a temperature range from 0 to 18°C, with the Cichliformes (*O. niloticus* ; 30°C) being closer to Perciformes than to others. Furthermore, the optimal temperatures in the perciformes fish from the present study are independent of the phylogenetic distance (see the phylogeny of Hughes et al., 2018). The strong correlation that we observe between CPT/CI + CIII or HOAD/CI + CIII and optimal temperature could therefore likely be associated to adaptation to the temperature regime. These results are in line with the demonstration of higher ability to oxidize fatty acids in the muscle of two temperate fish species (*M. saxatilis* and *O. mykiss*) following acclimation to low temperature (St-Pierre et al., 1998; Rodnick and Sidell, 1994). Before concluding that these ratios represent clear improvement of the ability to oxidize fatty acids in cold-adapted species through increments of gatekeeper steps, we need to know which character set the oxidative capacity of mitochondria (CI + CIII or CIV). One way to address this question would be to estimate the control strength of different steps of mitochondrial pathways and to

compare the ability to oxidize fatty acids at different temperatures in different species from a wide range of thermal habitats.

The changing thermal environments that will result from climate change might therefore affect mitochondrial functions differently according to the thermal niche of the species. For example, a fish species adapted to cold environment may therefore be more affected by the thermal sensitivity of gatekeepers of fatty acid oxidation (CPT) while warm adapted species could be more impaired by the impact of temperature on CIV. A corollary of this is that following rapid temperature changes, populations might face an excess of these key enzymes potentially resulting in an increase in reduction status of ETS and thus a burst of ROS production (see Christen et al., 2018). This study clearly reveals the urgency of further studies scrutinizing the extent to which selection could remodel mitochondrial organization rather than only accommodate mitochondrial content.

1.7 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1.8 ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration and recommendations of Canadian Council of Animal Care. The protocol was approved by the Comité de Protection des Animaux de l'UQAR.

1.9 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

FH-M carried out the experiments, statistical analyses, and drafted the manuscript. PB designed the study, obtained the funding, supervised the analysis, and revised the manuscript. VD supervised FH-M during biochemical analysis. NL and HD conducted the field research program that obtained the Antarctic fish samples and revised the manuscript. NL sampled Arctic fish and provided the tilapia. FD and CN participated in the analysis and revised the manuscript. HD helped to get access to the biological material and revised the manuscript.

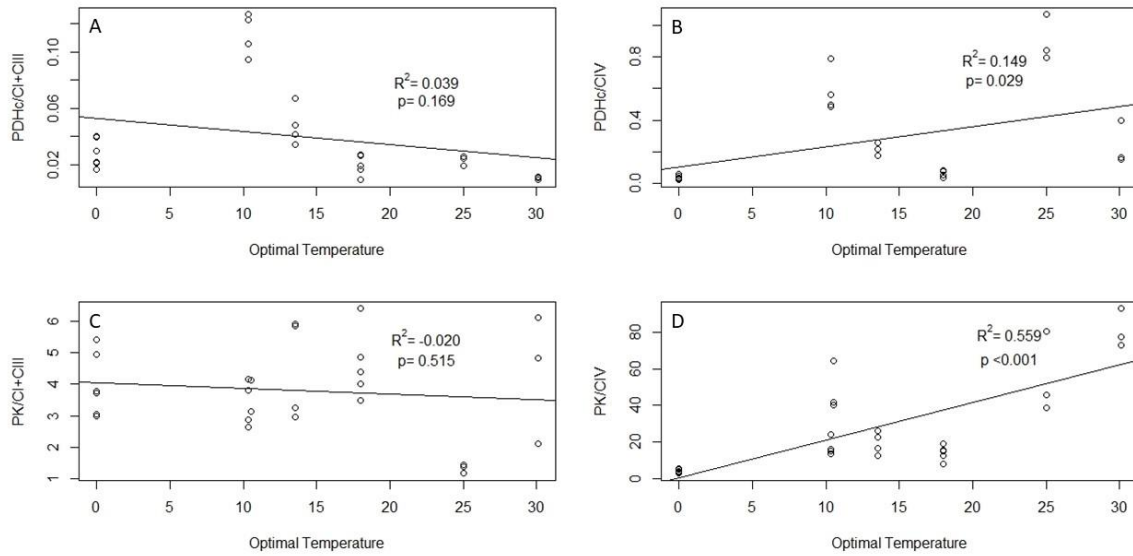
1.10 FUNDING

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant from the discovery program to PB (RGPIN 155926). FH-M obtained graduate scholarships from the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). HD and NL were supported by U.S. National Science Foundation grant PLR-1444167 from the Office/Division of Polar Programs. The dean of Research at Université du Québec à Rimouski provided \$1,000 for publication.

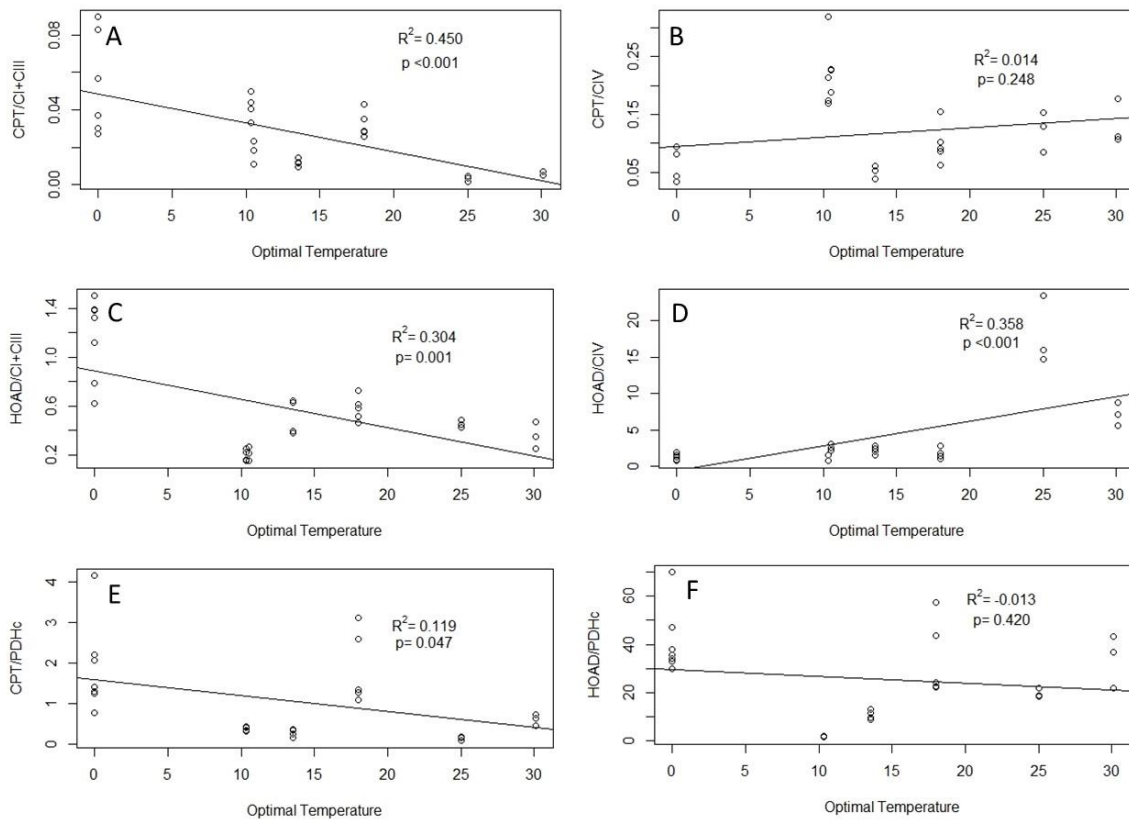
1.11 ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the assistance of the staff of the Biodôme of Montreal, the Maurice-Lamontagne Institute (especially to Denis Chabot) and the Fish hatchery of Baldwin-Coaticook (notably to Mario Lessard) while working at these locations and for the fish provided for this project. We are thankful to our colleagues at the Université du Québec à Rimouski for their assistance in every aspect of the project. We gratefully acknowledge the logistic support provided by the staff of the Division of Polar Programs of the U.S. National Science Foundation, by the personnel of the Antarctic Support Contract group, and by the captains and crews of the Antarctic Research and Supply Vessel *Laurence M. Gould*.

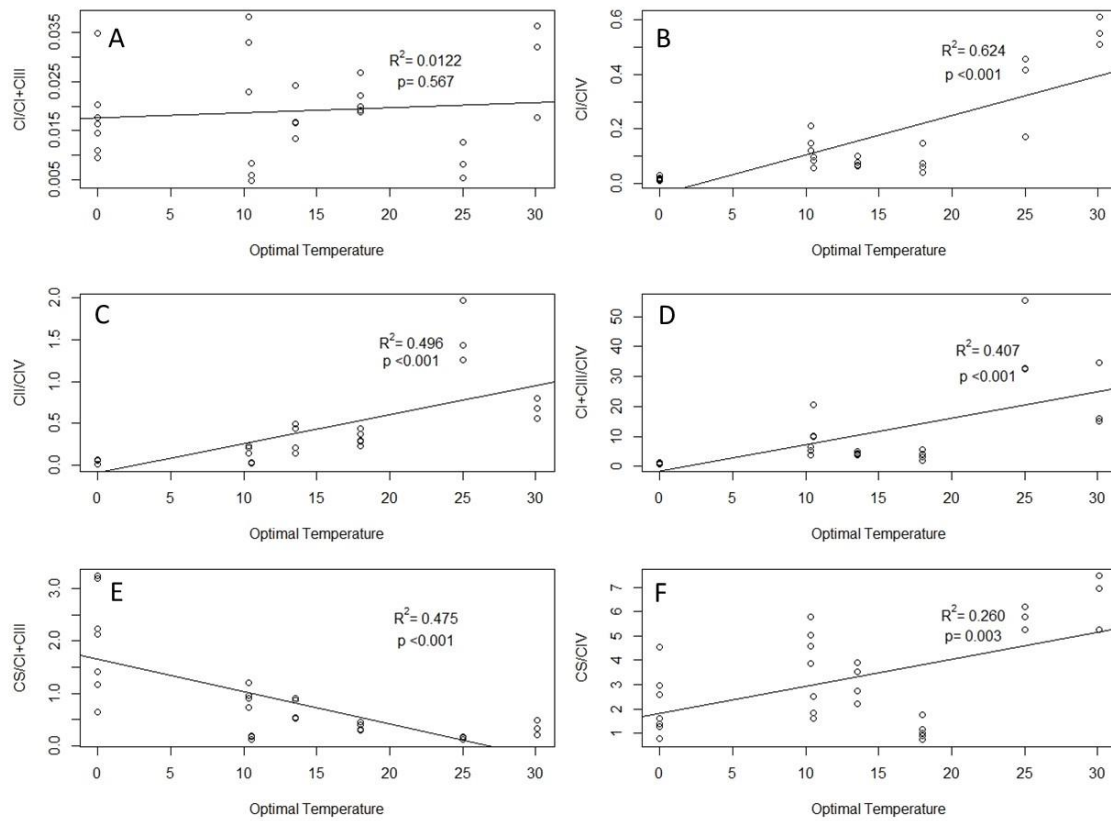
1.12 SUPPLEMENTARY MATERIAL



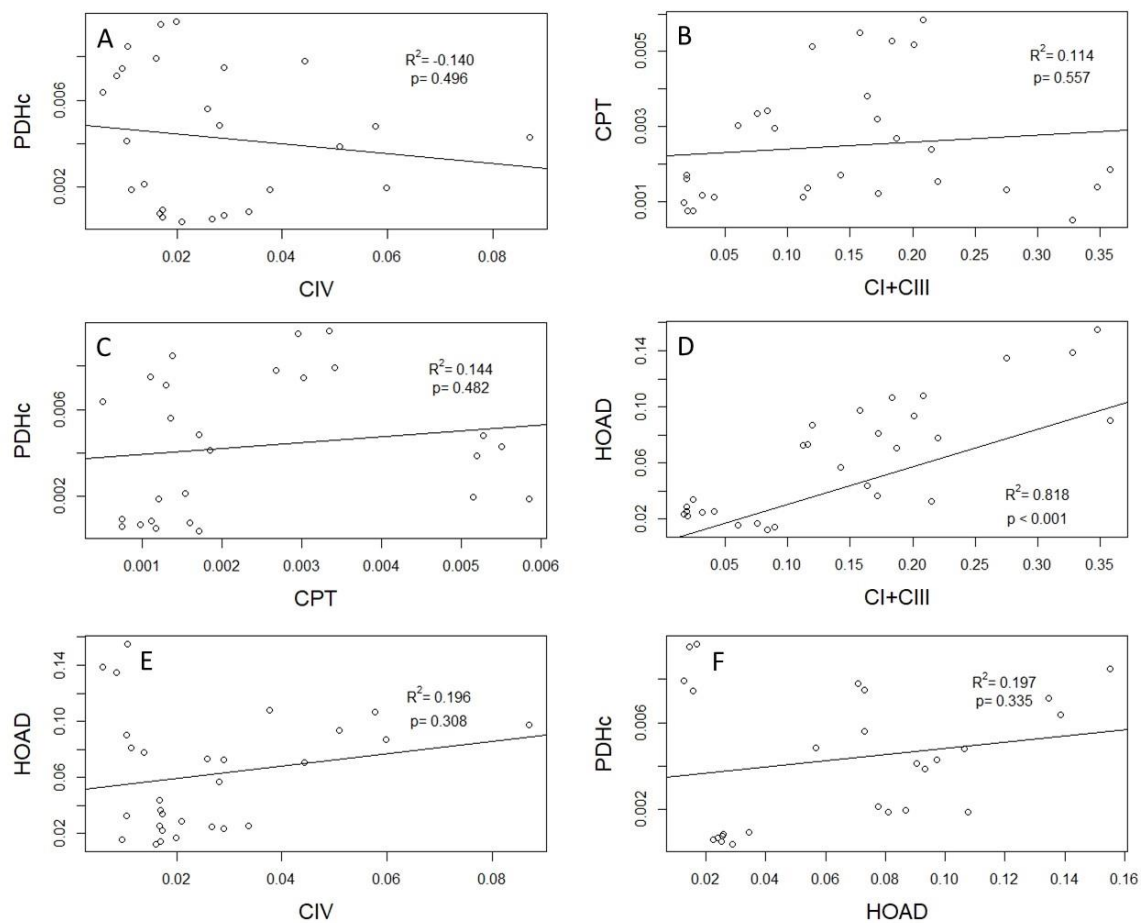
SUPPLEMENTARY FIGURE S1. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. **A)** PDHc/CI + CIII. **B)** PDHc/CIV. **C)** PK/CI + CIII. **D)** PK/CIV.



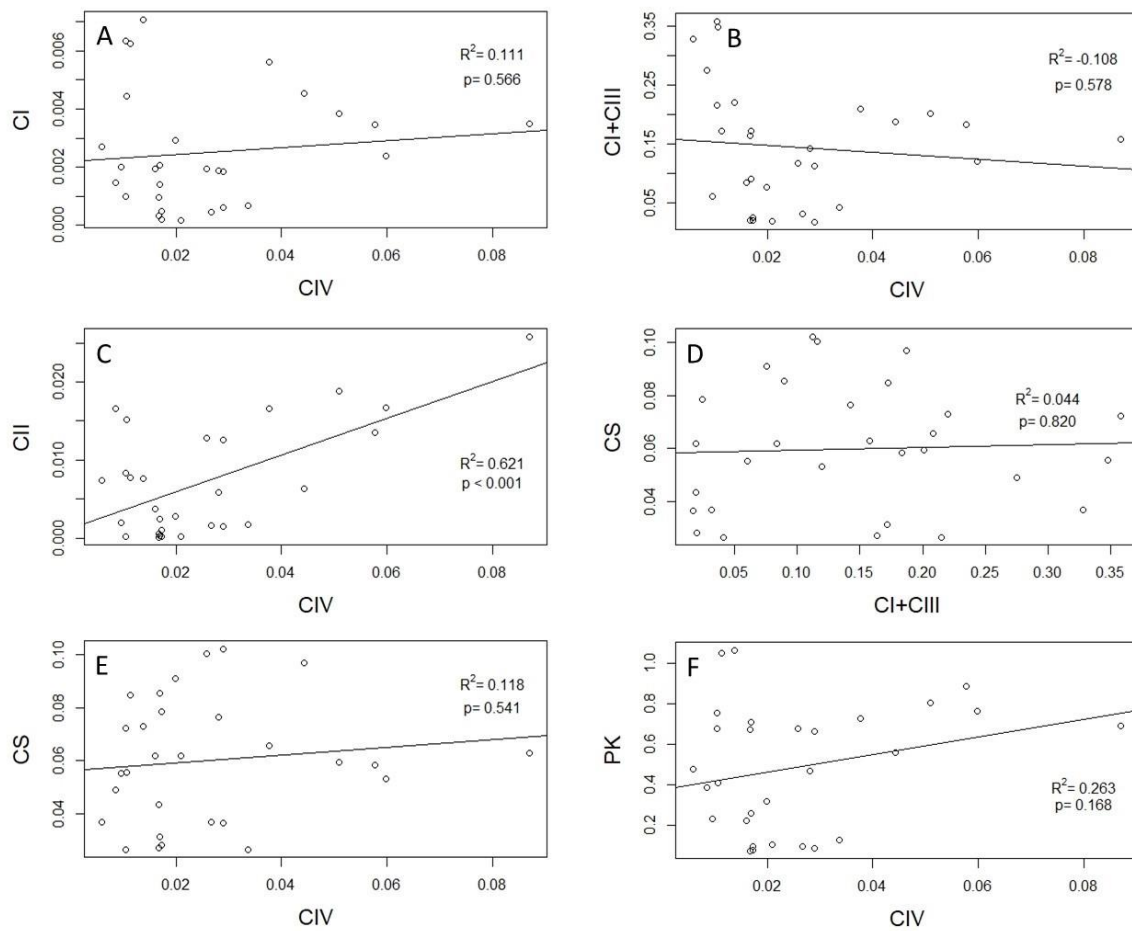
SUPPLEMENTARY FIGURE S2. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. **A)** CPT/CI + CIII. **B)** CPT/CIV. **C)** HOAD/CI + CIII. **D)** HOAD/CIV. **E)** CPT/PDHc. **F)** HOAD/PDHc.



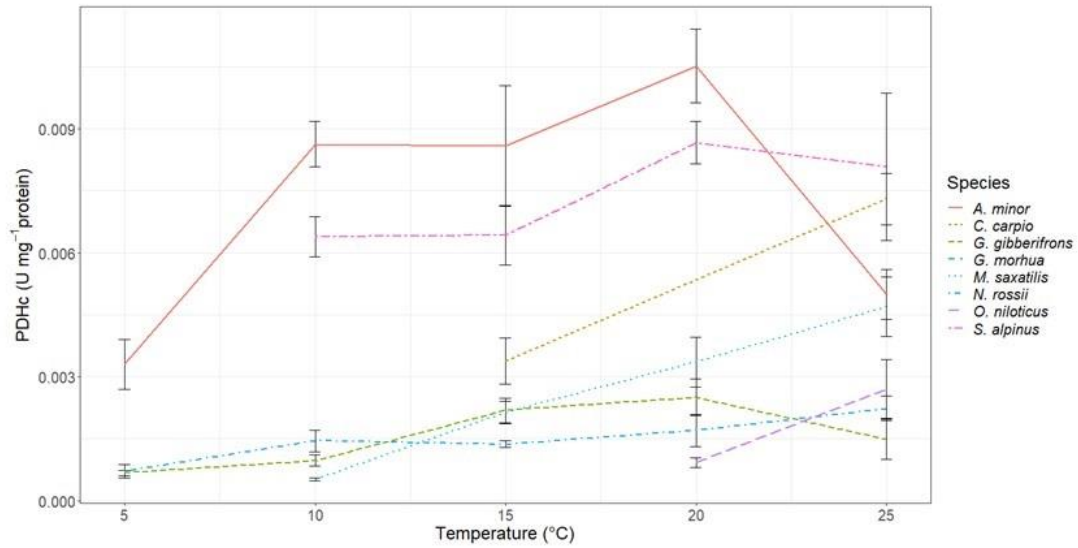
SUPPLEMENTARY FIGURE S3. Correlation among enzyme ratios activities and estimated optimal temperatures of the fish. **A)** CI/CI + CIII. **B)** CI/CIV. **C)** CII/CIV. **D)** CI + CIII/CIV. **E)** CS/CI + CIII. **F)** CS/CIV.



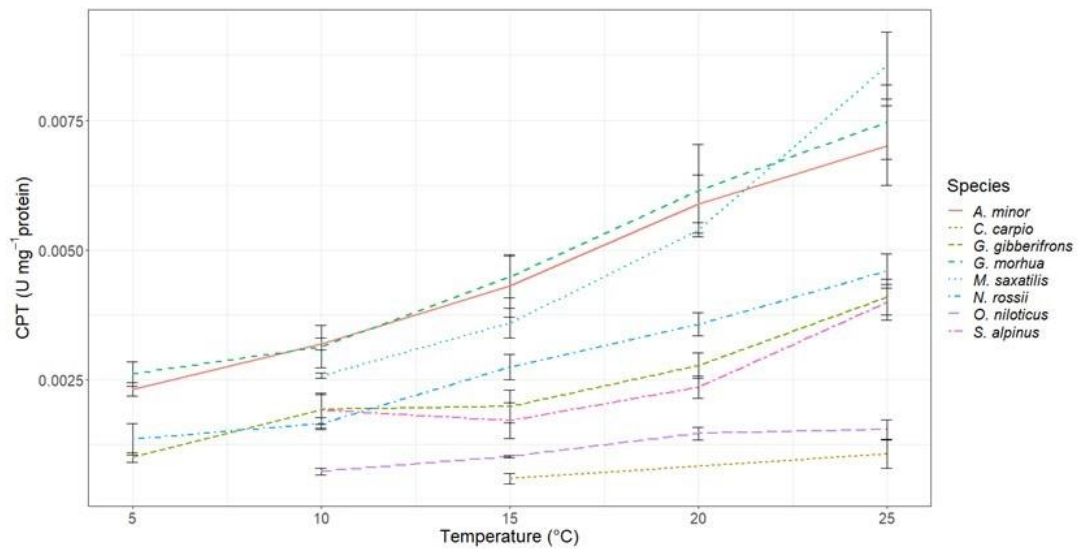
SUPPLEMENTARY FIGURE S4. Correlation in activities among different enzymes of mitochondrial oxidative pathway. **A)** PDHc correlated with CIV. **B)** CPT correlated with CI + CIII. **C)** PDHc correlated with CPT. **D)** HOAD correlated with CI + CIII. **E)** HOAD correlated with CIV. **F)** PDHc correlated with HOAD.



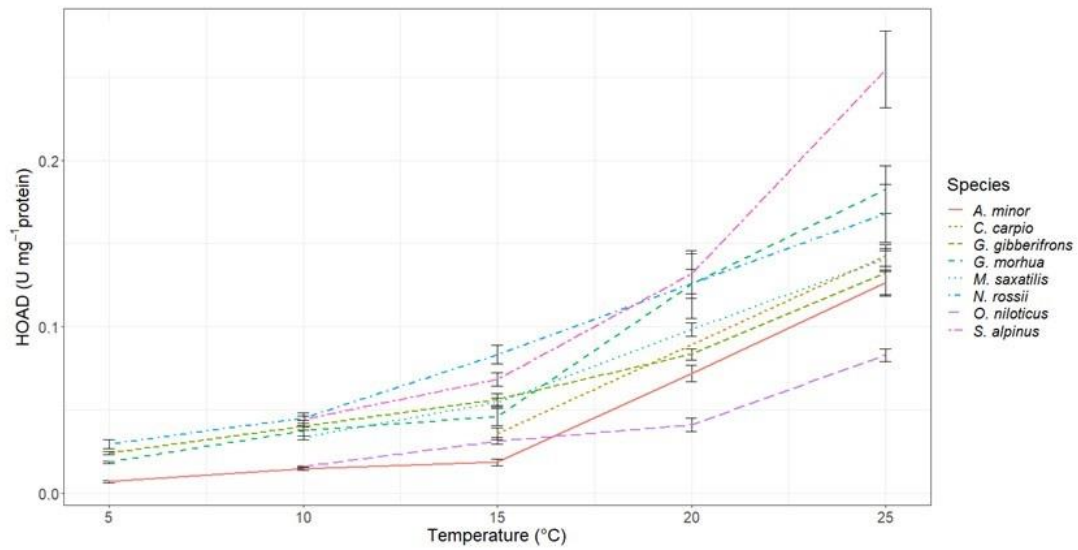
SUPPLEMENTARY FIGURE S5. Correlation in activities among different enzymes of mitochondrial oxidative pathway. **A)** CI correlated with CIV. **B)** CI + CIII correlated with CIV. **C)** CII correlated with CIV. **D)** CS correlated with CI + CIII. **E)** CS correlated with CIV. **F)** PK correlated with CIV.



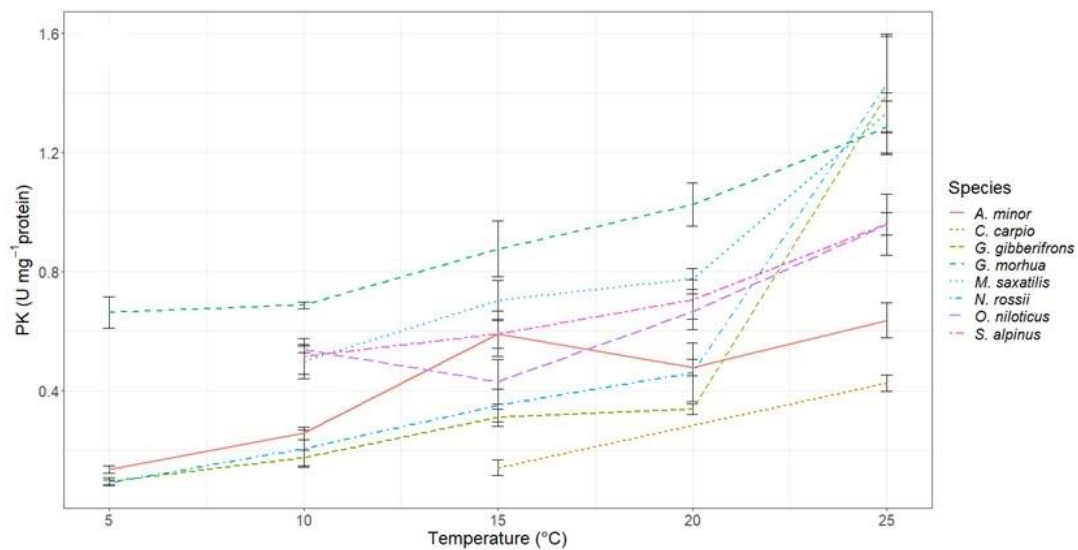
SUPPLEMENTARY FIGURE S6. Activity of Pyruvate Dehydrogenase complex (U mg⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



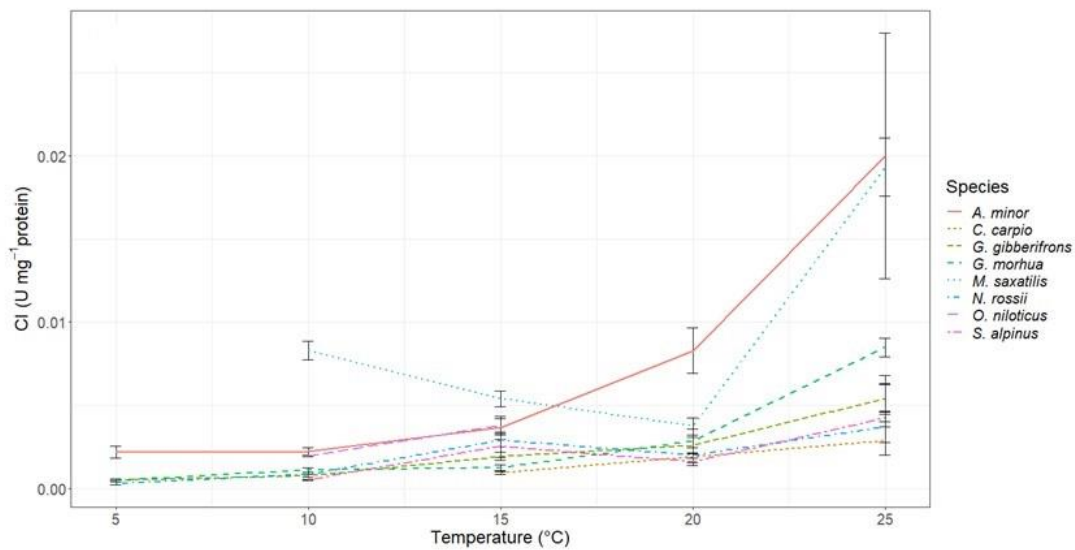
SUPPLEMENTARY FIGURE S7. Activity of Carnitine Palmitoyl Transferase (U mg⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



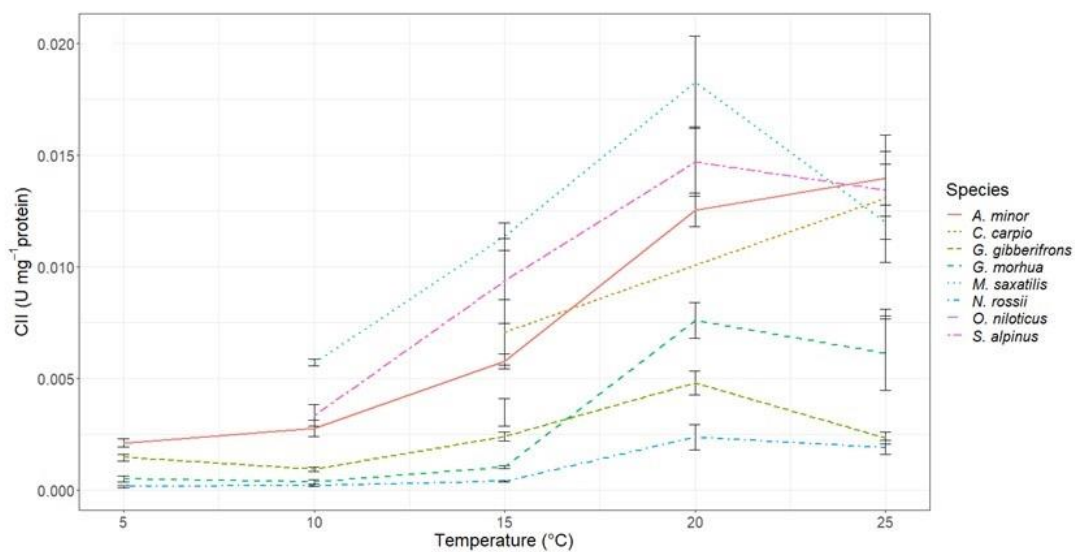
SUPPLEMENTARY FIGURE S8. Activity of β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



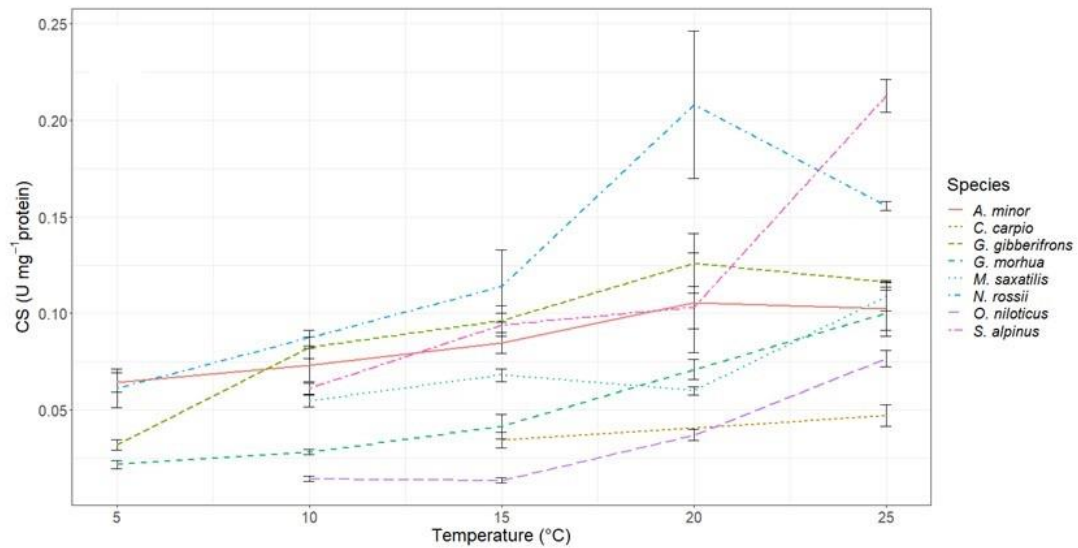
SUPPLEMENTARY FIGURE S9. Activity of Pyruvate Kinase (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



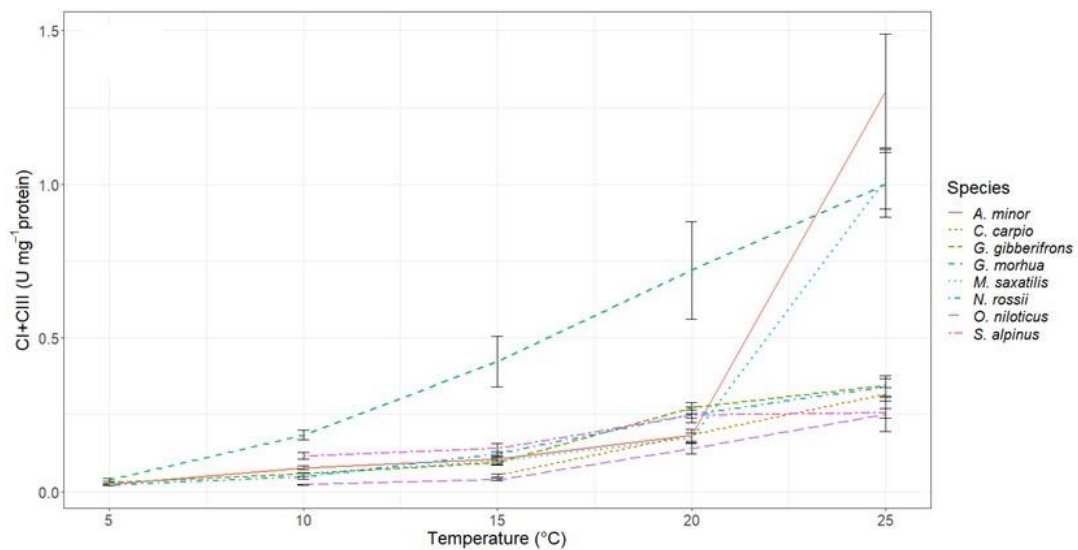
SUPPLEMENTARY FIGURE S10. Activity of Complex I (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



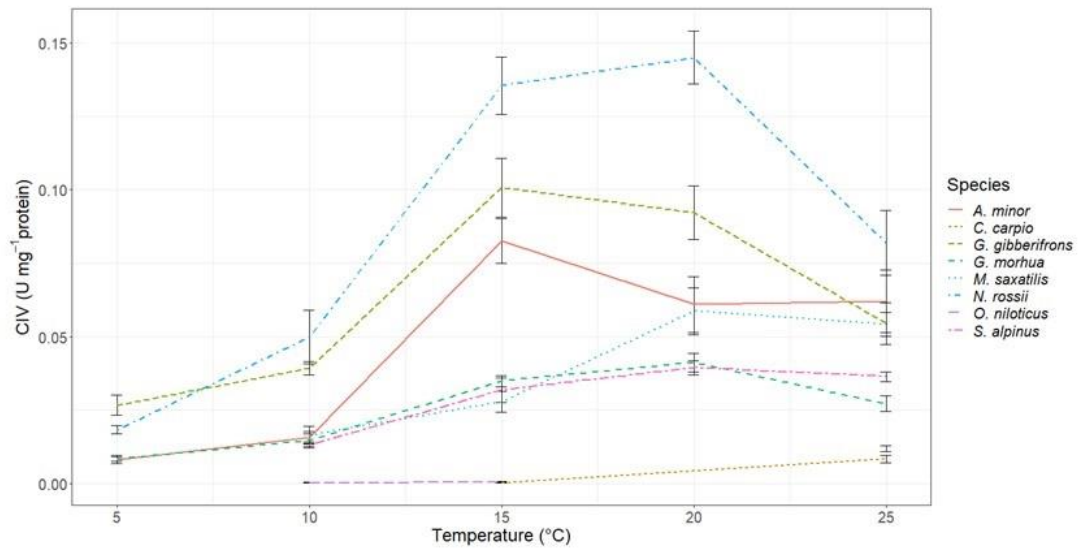
SUPPLEMENTARY FIGURE S11. Activity of Complex II (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



SUPPLEMENTARY FIGURE S12. Activity of Citrate Synthase (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



SUPPLEMENTARY FIGURE S13. Activity of Complexes I and III combined (U mg^{-1} protein) in eight species of fish measured at different temperatures.



SUPPLEMENTARY FIGURE S14. Activity of Complex IV (U mg⁻¹ protein) in eight species of fish measured at different temperatures.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise avait pour but d'identifier des ajustements évolutifs potentiels du métabolisme mitochondrial chez des poissons provenant d'un large intervalle d'habitats thermiques. Il a permis de caractériser les voies du métabolisme mitochondrial cardiaque associées à un vaste gradient thermique. Nous avons émis l'hypothèse que les enzymes responsables de fournir les substrats au cycle de Krebs auraient une activité plus élevée chez les espèces adaptées au froid comparé aux espèces d'eau chaude afin de compenser une possible limitation. Nous nous attendions donc que l'activité du PDHc, de la CPT et de la HOAD soient plus élevées, par rapport à l'activité des complexes I, II, I + III et IV, chez les espèces adaptées au froid comparativement aux espèces adaptées au chaud.

Les résultats obtenus ne sont que partiellement conformes à notre prédiction. Contrairement à celle-ci et à ce qui a été postulé par des travaux antérieurs (Lemieux et al., 2010a et 2010b ; Takeuchi et al., 2009), l'activité du PDHc ne présente pas d'évidence de compensation pouvant être associée aux températures d'adaptation des espèces de poisson. Par contre, l'activité de la CPT révèle, lorsque normalisée par celle du STE (CI + CIII), une compensation du transport des acides gras dans les mitochondries des cœurs de poissons d'eau froide. Deux des trois espèces adaptées aux environnements froids montrent un ratio d'activité plus de deux fois plus élevé que celui de quatre des cinq espèces adaptées à des températures plus élevées. L'HOAD présente des signes de compensation associée à la température d'adaptation des espèces de poissons sensiblement de la même façon que la CPT. Ces résultats sont supportés par les corrélations effectuées entre les ratios d'activité enzymatique et les températures optimales estimées des espèces. Toutes ces observations suggèrent que la sensibilité des enzymes de l'oxydation des lipides pourrait être compensée à certaines étapes (comme la CPT et la HOAD) afin de maintenir un bon fonctionnement des mitochondries à basse température.

LIMITES DE L'ETUDE

Le choix des espèces de poissons utilisées dans cette étude était limité à la disponibilité d'espèces de bonnes tailles (afin d'avoir assez de tissu cardiaque) dans l'est du Canada. C'est pour cette raison que la majorité des espèces échantillonnées ont un potentiel d'aquaculture. Bien que la littérature associée à ces espèces soit souvent considérable, l'utilisation de poissons d'aquaculture amène d'autres contraintes. Entre autres, la température d'acclimatation des individus dépend de l'éleveur et n'était pas toujours la température optimale de l'espèce. Par exemple, le bar rayé a une température optimale autour de 18°C, mais était maintenu à 13°C et le tilapia élevé à 25°C a une température optimale de 30°C. Cela pourrait expliquer une partie de la variation observée entre les ratios d'activité enzymatique de ces espèces et celles ayant des optimums thermiques semblables (voir **Figures 2 à 4**).

Bien que la température optimale ait été définie précédemment comme la température à laquelle la capacité aérobique du poisson est la plus élevée, cette information n'était pas toujours disponible pour les espèces utilisées. Dans de tels cas, la température optimale de croissance, généralement facile d'accès pour les espèces d'aquaculture, a été utilisée à la place. Dans le cas des espèces d'Antarctique, aucune de ces deux mesures n'a été repérée dans la littérature, la température de leur habitat a donc été employée. En dépit du fait que les organismes ne vivent pas nécessairement dans un environnement où la température leur est optimale (Angiletta, 2009), cette valeur ne devrait pas en être trop éloignée puisque les notothenioïdes sont des poissons sténothermes (ne tolérant pas de fortes variations de température). La température optimale estimée des espèces a principalement servi à classer les différentes espèces entre elles afin de voir les tendances dégagées en fonction des optimums thermiques. L'utilisation de la température optimale de croissance et d'habitat pour les poissons d'Antarctique, au lieu de la température de capacité aérobique maximale, devrait être convenable pour y arriver.

Au niveau des analyses des activités enzymatiques, il nous était impossible de travailler à 0°C, c'est pourquoi l'activité a été mesurée à 5°C pour les notothénioides. Les valeurs des ratios enzymatiques ont tout de même été estimées à 0°C en extrapolant à partir des valeurs d'activités à 5, 10 et 15°C. Les différences entre les ratios estimés à 0°C et mesurés à 5°C n'étaient pas significatives.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Ce projet a permis de mettre en évidence de possibles adaptations au niveau de l'organisation mitochondriale pouvant être associées à la température d'adaptation de certaines espèces. Par contre, avant de déterminer s'il s'agit effectivement d'adaptations, d'autres analyses seront à faire. Entre autres, des analyses comparatives de la respiration mitochondriale des espèces provenant de différents habitats thermiques seront nécessaires. De plus, il serait idéal d'étendre les analyses effectuées dans ce projet à d'autres espèces et de travailler avec un plus grand nombre d'échantillons lorsque possible afin de vérifier si les conclusions de notre étude sont applicables à un plus vaste bassin d'espèces. Un plus grand nombre d'échantillons par espèce permettrait également de réduire la variance et d'affiner les résultats des comparaisons de groupe.

Comme discuter précédemment, l'adaptation homéovisqueuse est une façon importante de moduler l'activité des enzymes imbriquées dans la membrane mitochondriale. Notre étude ne mesure aucun paramètre permettant de comparer sa composition ou sa fluidité en fonction de la température optimale des espèces. De telles analyses seraient un atout pour notre compréhension des ajustements de la mitochondrie à différentes températures.

IMPLICATIONS POUR LA RECHERCHE

Ce projet a permis de mettre en évidence que, contrairement à la majorité des études antérieures, les prochains travaux portant sur la bioénergétique des poissons doivent porter une attention particulière aux autres voies métaboliques et ne pas se restreindre à l'oxydation du glucose.

De plus, l'identification d'étapes limitantes du métabolisme mitochondrial lors d'une variation de température est une étape essentielle afin de cibler les loci génétiques qui seront potentiellement sous pression sélective lors d'un changement thermique. Il est donc primordial d'étudier plus en profondeur un lien possible entre le métabolisme des lipides et son rôle dans l'adaptation des espèces de poissons à différents régimes thermiques.

Finalement, les changements climatiques envisagés affecteront les fonctions mitochondriales différemment selon l'habitat thermique des espèces. Une des conséquences de ceux-ci pourrait être qu'après un changement de température, les populations pourraient subir un excès de capacité d'enzymes clés de l'entrée des substrats dans la mitochondrie entraînant un excès d'électrons dans le STE. Cet excès pourrait hypothéquer l'intégrité de la membrane mitochondriale et augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène, des espèces chimiques oxygénées, comme les radicaux libres, pouvant causer des dommages à d'autres composantes de la cellule. Ce problème pourrait s'ajouter aux autres difficultés que les espèces rencontreront lors d'un réchauffement de leur environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALEDO, J.C., S. JIMÉNEZ-RIVERES et M. TENA. 2010. The effect of temperature on the enzyme-catalyzed reaction: insights from thermodynamics. *J. Chem. Educ.* 87(3): 296–298.
- ANGILETTA, M. 2009. Thermal Adaptation. A Theoretical And Empirical Synthesis, 289 pp. Oxford: Oxford University Press.
- BILYK, K. T. et A.L. DEVRIES. 2011. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 158(4): 382–390.
- BLIER, P. U. et H. LEMIEUX. 2001. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 171(3): 247–253.
- BLIER, P. U., H. LEMIEUX et N. PICHAUD. 2014. Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes? *Can. J. Zool.* 92(7): 591–601.
- CHRISTEN, F., V. DESROSIERS, B.A. DUPONT-CYR, G.W. VANDENBERG, N.R. LEFRANÇOIS, J.C. TARDIF et al. 2018. Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radic. Biol. Med.* 116: 11–18.
- COX, D. K. et C.C. Coutant. 1981. Growth dynamics of juvenile striped bass as functions of temperature and ration. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110(2): 226–238.
- CROCKETT, E.L. et B.D. SIDELL. 1990. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 63: 472–488.
- EKSTRÖM, A., E. SANDBLOM, P.U. BLIER, B.A. DUPONT-CYR, J. BRIJS et N. PICHAUD. 2017. Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in european perch, *Perca fluviatilis*. *J. Exp. Biol.* 220(3): 386–396.
- FARRELL, A.P. 2009. Environment, antecedents and climate change: lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids. *J. Exp. Biol.* 212(23): 3771–3780.
- FIELDS, P.A. et G.N. SOMERO. 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(19): 11476–11481.

- FRY, F.E.J. 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. *Fish Physiol.* 1–98.
- GRIM, J.M., D.R.B. MILES et E.L. Crockett. 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J. Exp. Biol.* 213: 445–452.
- GUDERLEY, H. et P. BLIER. 1988. Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. *Can. J. Zool.* 66(5): 1105–1115.
- GUDERLEY, H. et J. ST-PIERRE. 2002. Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *J. Exp. Biol.* 205: 2237–2249.
- GUDERLEY, H. 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev.* 79(2): 409–427.
- HANSEN, T.K. et I.B. FALK-PETERSEN. 2002. Growth and survival of first-feeding spotted wolffish (*Anarhichas minor*, Olafsen) at various temperature regimes. *Aquacult. Res.* 33: 1119–1127.
- HILTON, Z., K.D. CLEMENTS et A.J. HICKEY. 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol. B.* 180(7): 979–990.
- HOFMANN, G.E. et A.E. TODGHAM. 2010. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. physiol.* 72: 127–145.
- HUGHES, L.C., G. ORTÍ, Y. Huang, Y. SUN, C.C. BALDWIN, A.W. THOMPSON et al. 2018. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *PNAS.* 115(24): 6249–6254.
- IFTIKAR, F.I. et A. J. HICKEY. 2013. Do mitochondria limit hot fish hearts? Understanding the role of mitochondrial function with heat stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS ONE.* 8(5): e64120.
- IFTIKAR, F.I., J.R. MACDONALD, D.W. BAKER, G.M.C. RENSHAW et A.J.R. HICKEY. 2014. Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *J. Exp. Biol.* 217: 2348–2357.
- IPCC. 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex et P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

- JANSSEN, A.J.M., F.J.M. TRIJBELS, R.C.A. SENGERS, J.A.M. SMEITINK, L.P. VAN DEN HEUVEL, L.T.M. WINTJES, B.J.M. STOLTENBORG-HOGENKAMP et R.J.T. RODENBURG. 2007. Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clin. Chem.* 53: 729–734.
- JOBLING, M., E.H. JØRGENSEN, J.S. CHRISTIANSEN, A.M. ARNESEN et J.Ø. PALSSON. 1992. Investigation of growth requirements and aquaculture potential of Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Icel. Agric. Sci.* 6: 47–62.
- KRAFFE, E., Y. MARTY et H. GUDERLEY. 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J. Exp. Biol.* 210: 149–165.
- LARSEN, S., J. NIELSEN, C.N. HANSEN, L.B. NIELSEN, F. WIBRAND, N. STRIDE et al. 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590(14): 3349–3360.
- LAUFF, R.F. et G.H. WOOD. 1996. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* 166(8): 501–509.
- LEMIEUX, H., P.U. BLIER et J.C. TARDIF. 2008. Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial functions and their thermal sensitivities? *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 149(1): 20–29.
- LEMIEUX, H., J.C. TARDIF, J.D. DUTIL et P.U. BLIER. 2010a. Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 384(1): 113–118.
- LEMIEUX, H., J.C. TARDIF et P.U. BLIER. 2010b. Thermal sensitivity of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria: Does pyruvate dehydrogenase dictate the response to temperature? *J. Therm. Biol.* 35(2): 105–111.
- LEMIEUX, H., P.U. BLIER et E. GNAIGER. 2017. Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Sci. Rep.* 7(1): 2840.
- MADON, S.P., D.W. SCHNEIDER et J.A. STOECKEL. 1998. In-situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J. Shell. Res.* 17(1): 195–204.

- MAGNONI, L., E. VAILLANCOURT et J.M. WEBER. 2008. High resting triacylglycerol turnover of rainbow trout exceeds the energy requirements of endurance swimming. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295(1): R309–R315.
- MAGNONI, L. et J.M. WEBER. 2007. Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *J. Exp. Biol.* 210(22): 4016–4023.
- MURDOCH, J.R. 1981. What is the rate-limiting step of a multistep reaction? *J Chem Educ.* 58(1): 32.
- PEDERSON, T. et M. JOBLING. 1989. Growth rates of large, sexually mature cod, *Gadus morhua*, in relation to condition and temperature during an annual cycle. *Aquaculture.* 81: 161–168.
- PELLETIER, D., J.D. DUTIL, P. BLIER et H. GUDERLEY. 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B.* 164: 179–190.
- PICHAUD, N., E.H. CHATELAIN, J.W. BALLARD, R. TANGUAY, G. MORROW et P.U. BLIER. 2010. Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. *J. Exp. Biol.* 213(10): 1665–1675.
- PICHAUD, N., BALLARD, J.W., TANGUAY, R.M., et P.U. BLIER. 2011. Thermal sensitivity of mitochondrial functions in permeabilized muscle fibers from two populations of *Drosophila simulans* with divergent mitotypes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301(1): R48–R59.
- PÖRTNER, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Phys. A.* 132(4): 739–761.
- PÖRTNER, H.O., L. PECK et G. SOMERO. 2007. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362(1488): 2233–2258.
- PÖRTNER, H.O. et R. KNUST. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science.* 315(5808): 95–97.
- R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>.
- RODNICK, K.J. et B.D. Sidell. 1994. Cold acclimation increases carnitine palmitoyltransferase I activity in oxidative muscle of striped bass. *Am. J. Physiol.* 266(2 35-2): R405–R412.

- SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, A.K. MALLIA, F.H. GARTNER, M.D. PROVENZANO, E.K. FUJIMOTO, N.M. GOEKE, B.J. OLSON et D.C. KLENK. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76–85.
- SOMERO, G.N. 1995. Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 43–68.
- SOMERO, G. N. 2011. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 301(1): R1–R14.
- ST-PIERRE, J., P.M. CHAREST et H. GUDERLEY. 1998. Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 201: 2961–2970.
- STROBEL, A., S. BENNECKE, E. LEO, K. MINTENBECK, H.O. PÖRTNER et F.C. MARK. 2012. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO₂. *Front. Zool.* 9(1): 28.
- STROBEL, A., E. LEO, H.O. PÖRTNER et F.C. MARK. 2013. Elevated temperature and PCO₂ shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 166(1): 48–57.
- TAKEUCHI, K.-I., Y. NAKANO, U. KATO, M. KANEDA, M. AIZU, W. AWANO, S. YONEMURA, S. KIYONAK, Y. MORI, D. YAMAMOTO et M. UMEDA. 2009. Changes in temperature preferences and energy homeostasis in dystroglycan mutants. *Science.* 323(5922): 1740–1743.
- THIBAUT, M., P.U. BLIER et H. GUDERLEY. 1997. Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16(2): 139–155.
- WATANABE, T., T. TAKEUCHI, S. SATOH et V. KIRON. 1996. Digestible crude protein contents in various feedstuffs determined with four freshwater fish species. *Fish. Sci.* 62: 278–282.
- WEBER, J.M. 2011. Metabolic fuels: regulating fluxes to select mix. *J. Exp. Biol.* 214(Pt 2): 286–294.
- XIE, S., K. ZHENG, J. CHEN, Z. ZHANG, X. ZHU et Y. YANG. 2011. Effect of water temperature on energy budget of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Nutr.* 17(3): e683–e690.

